

Hovedfagsoppgave i Molekylær biovitenskap
studieretning biokjemi

**Heterolog ekspressjon av
to-peptidbakteriosinet
lactococcin G**

Lisbeth Thorbek

Institutt for molekylær biovitenskap
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO
mai/2006



Forord

Denne hovedoppgaven ble utført ved Institutt for molekylær biovitenskap, Universitetet i Oslo.

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder Jon Nissen-Meyer for hans gode veiledning gjennom prosjektet. Og for hans tålmodighet og hjelpsomhet med å få skrevet denne oppgaven.

Gunnar Fimland fortjener en stor takk. Gunnar har gitt god veiledning på laben og har alltid vært full av optimisme, engasjement og pågangsmot.

Takk til min elskede samboer Morten for hans emosjonelle og økonomiske støtte gjennom både opp- og nedturer. Og takk til resten av familien.

Anne Hege, Guro og Ragnhild fortjener også en helt spesiell takk for deres hjelp, støtte og optimisme på mine vegne.

Sammendrag

Lactococcin G er et to-peptid bakteriosin produsert av melkesyrebakterien *Lactococcus lactis* LMG2081. Peptidene dette bakteriosin består av kalles α og β . Genene lagA og lagB som koder for henholdsvis α - og β -peptidene ble amplifisert, koblet sammen med ledersekvensen til bakteriosinet sakacin A, satt inn i hver sin pLPV111 ekspressjonsvektor og transformert inn i *Lactobasillus sake* Lb790/pSAK20. pLPV111 og *Lactobasillus sake*Lb790/pSAK20 er deler av et ekspressjonssystem med utgangspunkt i bakteriosinet sakacin A og det er velegnet til ekspressjon av bakteriosiner. Ved å flytte lagA- og lagB-genene til ekspressjonsvektorer og derved få α - og β -peptidene uttrykt hver for seg blir det enklere å foreta funksjons- og strukturstudier av lactococcin G. Det blir vesentlig enklere å rense peptidene som ellers med sine like ladninger, lignende størrelse og hydrofobisitet kan være vanskelige å separere fra hverandre.

Da dette arbeidet ble utført var det uklart hvilket gen som kodet for lactococcin G-immunitetsproteinet. Det var antatt at det tredje genet i lactococcin G-operonet (lagC) kodet for et immunitetsprotein ut fra dets størrelse og plassering i operonet. I dette arbeidet ble lagC-genet amplifisert, satt inn i ekspressjonsvektoren pMG36e og transformert inn i den lactococcin G-følsomme stammen *Lactococcus lactis* IL1403. Transformanter med lagC-genet viste økt motstandsdyktighet mot lactococcin G og det kan dermed konkluderes at lagC-genet koder for et immunitetsprotein.

Innhold

| | |
|--|------------|
| FORORD | III |
| SAMMENDRAG | V |
| INNHOOLD | VII |
| 1. INNLEDNING | 1 |
| 1.1 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDER | 1 |
| 1.1.1 Antimikrobielle peptider fra bakterier – bakteriosiner | 2 |
| 1.2 BAKTERIOSINER FRA MELKESYREBAKTERIER | 3 |
| 1.2.1 Klassifisering av bakteriosiner produsert av melkesyrebakterier | 4 |
| 1.2.2 Gruppe II-bakteriosinenes virkningsmekanisme og regulering | 9 |
| 1.3 BAKTERIOSINGENER OG GENPRODUKTER | 12 |
| 1.3.1 Bakteriosingenene | 12 |
| 1.3.2 Immunitetsproteinet | 14 |
| 1.3.3 ABC-transporterproteinet | 14 |
| 1.3.4 Accessory-protein | 15 |
| 1.4 LACTOCOCCIN G | 15 |
| 1.4.1 Strukturstudier av to-peptidbakteriosinene | 16 |
| 1.4.2 Likheter mellom lactococcin G, lactococcin Q og enterocin 1071 | 18 |
| 1.4.3 Genetisk oversikt over lactococcin G og enterocin 1071 | 19 |
| 2. HENSIKT | 21 |
| 3. METODER | 23 |
| 3.1 GENTEKNOLOGISKE METODER | 23 |
| 3.1.1 Polymerase chain reaction – PCR | 23 |
| 3.1.2 Plasmidisolering – Miniprep | 24 |
| 3.1.3 Agarosegelelektroforese | 25 |
| 3.1.4 Restriksjonskutting | 26 |
| 3.1.5 Defosforilyering av vektor | 26 |
| 3.1.6 Ligering | 27 |
| 3.1.7 Sete-dirigert mutagenese | 27 |
| 3.1.8 Megaprimermetoden | 29 |
| 3.1.9 DNA sekvensering | 31 |
| 3.1.10 Protein ekspressjon | 31 |
| 3.1.11 Bakteriekultivering | 38 |
| 3.1.12 Tillaging av kompetente celler og transformering | 39 |
| 3.2 PROTEINRENSING | 43 |
| 3.2.1 Kromatografi | 43 |
| 3.2.2 SMART- OG FPLC-systemene | 45 |
| 3.2.3 Renseprosedyrer | 45 |
| 3.3 KVANTIFISERINGSMETODER | 47 |
| 3.3.1 Bestemmelse av bakteriosinkonsentrasjon | 47 |
| 3.3.2 Aktivitetsmålinger | 47 |
| 3.3.3 MALDI-TOF Massespektometri | 48 |
| 4. RESULTATER OG DISKUSJON | 50 |
| 4.1 PRODUKSJON AV LACTOCOCCIN G-PEPTIDENE | 51 |
| 4.1.1 Konstruksjon av pLT101 og pLT201 | 51 |
| 4.1.2 Konstruksjon av pLT100 og pLT200: Test om immunitetsgen er nødvendig for god produksjon av lactococcin G-peptidene | 55 |
| 4.1.3 Produksjon og rensing av lactococcin G | 60 |
| 4.2 LACTOCOCCIN G-IMMUNITETSPROTEINET | 69 |
| 4.2.1 Konstruksjon av pLT300 | 69 |
| 4.2.2 Påvisning av immunitetsgenets effekt | 71 |
| FORKORTELSER | 75 |
| KILDELISTE | 77 |
| VEDLEGG | 83 |

1. Innledning

1.1 Antimikrobielle peptider

Hvis en organisme vil overleve i naturen må den kunne forsvare seg mot patogene organismer. Det adaptive immunsystemet hos mennesket og andre virveldyr er en måte å forsvare seg på, men ikke den eneste. B- og T-celler i immunsystemet hos mennesket bruker dager for å dele seg og bli klar til å respondere på en infeksjon, mens en bakteriecelle med en generasjonstid på 50 minutter kan bli til 5×10^8 bakterier i løpet av 24 timer. Da er de en alvorlig trussel mot menneskekroppen (Hancock og Diamond, 2000). I tiden inntil det adaptive immunsystemet er klar til aksjon har kroppen et medfødt immunsystem med antimikrobielle peptider som en essensiell del. Antimikrobielle peptider kan dannes mer enn 100 ganger raskere enn proteiner som IgM og kan diffundere raskere enn de store IgM-proteinene og immuncellene (Papagianni 2003; Zasloff 2002; Hancock og Scott, 2000). De antimikrobielle peptidene er ikke så spesifikke som immunglobulinene, men de kan brukes mot mange forskjellige patogene organismer som bakterier, sopp, parasitter (som trypanosomes og plasmodia), virus med membran (eksempelvis herpes og HIV) og kreftceller (Hancock og Diamond, 2000). Ingen av de antimikrobielle peptidene kan dog brukes mot alle patogene organismer (Hancock og Scott, 2000). I vertebrater finnes antimikrobielle peptider ofte i de vev der det er stor sannsynlighet for å komme i kontakt med patogene organismer som hud, øye, øre, epitelvev i tungen, luftrør, lunger, magesekk, beinmarg og testikler (Hancock og Scott, 2000). De kan være lagret i vesikler for å være klar til bruk (Nissen-Meyer og Nes, 1997). Alternativt kan genene som koder for de antimikrobielle peptidene også induseres av den infeksjøs bakterien selv (Hancock og Scott, 2000; Hancock og Diamond, 2000).

De første antimikrobielle peptidene ble oppdaget for ca 25 år siden og nå kjenner man over 500 forskjellige typer bare fra padder og frosker (Papagianni, 2003). De er funnet i organismetyper som planter, vertebrater, fisk, amfibier, insekter og mikroorganismer (Papagianni, 2003; Hancock og Scott, 2000) og et enkelt individ som for eksempel en ku kan produsere så mange som 36 forskjellige antimikrobielle peptider (Hong og Hancock, 2000). De antimikrobielle peptidene kan ha en synergistisk effekt enten med andre antimikrobielle

peptider eller med konvensjonelle antibiotika eller lysozym (Hong og Hancock, 2001; Zasloff, 2003). Lysozym kan sammen med visse antimikrobielle peptider lysere Gram-negative bakterier (Hancock og Scott, 2000). Det er til og med indikasjoner på at en organisme kan sekretere en blanding av antimikrobielle peptider som er optimalisert for akkurat den bakterien som angriper (Hancock og Diamond, 2000).

Antimikrobielle peptider er vanligvis kationiske peptider på 12-50 aminosyreresiduer og har ofte hydrofobe eller amfifile områder (Hancock og Diamond, 2000). De er ribosomalt syntetisert og bør ikke forveksles med antibiotika, som syntetiseres enzymatisk og inneholder spesielle peptidbindinger. I de senere år har antimikrobielle peptider fått mye oppmerksomhet på grunn av økende problemer med resistens mot antibiotika.

Antimikrobielle peptider har en rekke fordeler. De har et bredt virkespektrum og de dreper bakterier raskt. I tillegg er det vanskelig for bakterier å utvikle resistens ved mutasjoner. (Hancock og Scott, 2000). Grunnen til dette ligger kanskje i virkemåten. De antimikrobielle peptidene bindes til bakteriemembranen og det er vanskelig for bakterien å forandre på membranen uten at det krever mye energi (Zasloff, 2003). Det er også muligheter for å bruke antimikrobielle peptider i næringsmiddelindustrien som beskrevet i kapittel 1.2. Ulempene ved å bruke antimikrobielle peptider innen medisin er at de er store i forhold til antibiotika, de må nesten produseres rekombinant for å holde nede produksjonsutgiftene, de er veldig utsatt for proteaser i kroppen og visse antimikrobielle peptider som melittin fra biegift er veldig giftig for mennesker (Hancock og Scott, 2000).

1.1.1 Antimikrobielle peptider fra bakterier – bakteriosiner

Ribosomalt syntetiserte antimikrobielle peptider produsert av bakterier kalles for bakteriosiner. Mikroorganismer bruker mange forskjellige mekanismer for å forsvare seg mot andre mikroorganismer. De kan danne antibiotika, de kan bruke metabolske biprodukter som laktat, lyserende stoffer som lysozym, protein-exotoksiner og bakteriosiner (Riley og Wertz, 2002). Bakteriosiner dreper oftest bakterier som er nært beslektet til produsentbakterien, men kan også drepe ikke-beslektede bakterier. Antimikrobielle peptider fra bakterier har i motsetning til de eukaryote antimikrobielle peptidene en smalspekteret aktivitet. De dreper for eksempel enten Gram-positive eller Gram-negative bakterier. Men de er langt mer potente enn eukaryote antimikrobielle peptider. Mens eukaryote antimikrobielle peptider dreper ved konsentrasjoner på mikromolar skala dreper bakteriosiner ved

konsentrasjoner på picomolar til nanomolar skala (Papagianni, 2003). En mulig forklaring på dette kan være at bakteriosiner virker ved å binde seg til en reseptor på målcellen.

De fleste bakterier produserer bakteriosiner, og så langt er de fleste bakteriosiner funnet hos Gram-positive bakterier (Riley og Wertz, 2002). Bakteriosiner produsert av Gram-positive bakterier er ofte peptider på mindre enn 6 kDa, mens bakteriosinene produsert av Gram-negative bakterier ofte er proteiner som er større enn 20 kDa. Det er dog visse unntak som colicin V og microciner som begge er mindre enn 10 kDa og produsert av *Escherichia coli* (Nissen-Meyer og Nes, 1997).

1.2 Bakteriosiner fra melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier er Gram-positive bakterier og de produserer antimikrobielle peptider. Melkesyrebakteriene er som bakteriosinprodusenter ekstra interessante da bakteriene har vært i bruk i årtusener til fermentering av mat. Man har lenge visst at den økte holdbarheten i næringsmidlene etter fermenteringen blant annet skyldes dannelsen av laktat som gir et surt miljø. Senere oppdaget man at det var flere grunner til at næringsmidlene fikk økt holdbarhet. Melkesyrebakteriene produserer antimikrobielle peptider som en del av forsvaret mot andre bakterier. På grunn av den meget langvarige bruk av melkesyrebakterier i matproduksjon kan man gå ut ifra at bakteriosinene fra disse ikke er giftige. Bakteriene produserer heller ikke andre toksiske produkter. I matproduksjon har man blant annet brukt melkesyrebakterier av typene *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* og *Enterococcus* og *Streptococcus* (Nes et al., 2001). Melkesyrebakterier kan i tillegg overleve i tarmen hvor de kan ha mange positive effekter. De kan utkonkurrere patogene bakterier ved å ta opp plass på tarmveggen, ta næring fra de patogene bakteriene og dermed ha en positiv effekt på immunsystemet under stress (Marcos et al., 2004), de danner stoffer kroppen har bruk for som lysin, folsyre og laktase og de kan til og med redusere risikoen for tynntarmskreft ved å detoksifisere karsinogene og giftige stoffer. Dette er grunnlaget for flere typer ”funksjonell mat” på markedet (for eksempel Biola fra Tine som inneholder flere bakteriestammer blant annet *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG®) og Actimel® yoghurt fra Danone som inneholder *Lactobacillus casei* DN-114001 (Marcos et al., 2004).

Bakteriosiner fra melkesyrebakterier er ofte på 25-60 aminosyreresiduer og er ofte kationiske.

1.2.1 Klassifisering av bakteriosiner produsert av melkesyrebakterier

Bakteriosinene fra melkesyrebakterier inndeles i grupper etter primærstruktur og molekylmasse (Nes et al., 2001).

1.2.1.1 Gruppe I: Modifiserte bakteriosiner (Lantibiotika)

Disse bakteriosinene er små og inneholder modifiserte aminosyreresiduer som lantionin og 3-metyllantionin som dannes ved posttranslasjonell modifisering. (Guder et al., 2000; Riley og Wertz, 2003). Lantionin dannes ved at et serinresidue eller threoninresidue dehydreres og danner en thioeterbinding med et cysteinresidue. Begge reaksjonene katalyseres av spesifikke enzymer (Guder et al., 2000).

Visse lantibiotika består av 2 peptider og begge peptidene må være tilstede for å oppnå antibakteriell aktivitet. Disse bakteriosinene kalles to-peptidbakteriosiner. Det er funnet flere to-peptid lantibiotika, blant annet plantaricin W (Holo et al., 2001), staphylococcin C55 (Navaratna et al., 1998) og lacticin 3147 (McAuliffe et al., 2000). Lactococcin G som denne oppgaven omhandler er også et to-peptidbakteriosin, men har ikke modifiserte aminosyreresiduer og tilhører dermed en annen gruppe bakteriosiner.

Gruppe I deles i to undergrupper basert på struktur og virkningsmekanisme.

Gruppe Ia:

Gruppe Ia lantibiotika dreper ved permeabilisering og etterfølgende depolarisering av cytoplasma-membranen og er på 21-38 aminosyrer (Riley og Wertz, 2002). Nisin er det grundigst studerte bakteriosinet som tilhører denne gruppen. Nisin har vært brukt som konserveringsmiddel i mat og er kommersielt tilgjengelig (Nisaplin®). Nisin har også vært vurdert for behandling av magesår som skyldes infeksjon av *Helicobacter pylori* (Hancock og Chapple, 1999). Nisin er avhengig av en reseptor (lipid II) for funksjon. Er det ikke lipid II i bakterien vil den heller ikke bli drept av nisin (Guder et al., 2000).

Gruppe Ib:

Lantibiotika fra gruppe Ib er mindre enn gruppe Ia lantibiotikaene (ingen er over 19 aminosyreresiduer). De har en globulær struktur og dreper trolig ved enzyminhibering (Riley og Wertz, 2003).

1.2.1.2 Gruppe II: Umodifiserte bakteriosiner

I motsetning til gruppe I bakteriosinene inneholder bakteriosinene som tilhører gruppe II ikke modifiserte aminosyreresiduer. De er kationiske ved nøytral pH, består av 30-70 aminosyreresiduer og er varmestabile. Ofte har de en hydrofob og/eller amfifil region. Gruppe II er delt opp i tre undergrupper etter sekvenslikheter, målcellespesifisitet, eller virkningsmekanisme (en-peptid- eller to-peptidbakteriosiner). Tabell 1.1 inneholder et utvalg av gruppe II bakteriosinene med produsentbakterie.

| Bakteriosin | Produsent |
|--|---|
| <u>Gruppe IIa: Pediocinlignende bakteriosiner</u> | |
| Leucocin A | <i>Leuconsostoc gelidum</i> UAL 187 |
| ” | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA33a |
| Leucocin C-TA33a | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA33a |
| Pediocin PA-1 | <i>Pediococcus acidilactici</i> PAC 1.0 |
| ” | <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE 92 |
| Sakacin P | <i>Lactobacillus sake</i> LTH673 |
| ” | <i>Lactobacillus sake</i> Lb674 |
| Bavaricin A | <i>Lactobacillus bavaricus</i> MI401 |
| Curvacin A | <i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174 |
| Sakacin A | <i>Lactobacillus sake</i> Lb706 |
| Mesentericin Y105 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105 |
| Carnobacteriocin B2 | <i>Carnobacterium piscicola</i> LV17B |
| Carnobacteriocin BM1 | <i>Carnobacterium piscicola</i> LV17B |
| Piscicocin V1b | <i>Carnobacterium piscicola</i> V1 |
| Acidocin A | <i>Lactobacillus acidophilus</i> TK9201 |
| Enterocin A | <i>Enterococcus faecium</i> CTC492 |
| ” | <i>Enterococcus faecium</i> DPC1146 |

| | |
|---|--|
| Bavaricin MN | <i>Lactobacillus sake</i> MN |
| Piscicolin 126 | <i>Carnobacterium piscicola</i> JG126 |
| Piscicocin V1a | <i>Carnobacterium piscicola</i> V1 |
| Mundticin | <i>Enterococcus mundtii</i> AT06 |
| Divercin V41 | <i>Carnobacterium divergens</i> V41 |
| <u>Gruppe IIb: Umodifiserte to-peptidbakteriosiner</u> | |
| Lactococcin G (LcnGa og LcnGβ) | <i>Lactococcus lactis</i> LMG2081 |
| Lactococcin MN (LcnM og LcnN) | <i>Lactococcus lactis</i> 9B4 |
| Lactococcin Q (LcnQα og LcnQβ) | <i>Lactococcus lactis</i> QU 4 |
| Lactacin F (LafA og LafX) | <i>Lactobacillus johnsonii</i> VPI11088 |
| Thermophilin 13 (ThmA og ThmB) | <i>Streptococcus thermophilus</i> ST134 |
| Plantaricin S (PlsA og PlsB) | <i>Lactobacillus plantarum</i> LCP010 |
| Plantaricin EF (PlnE og PlnF) | <i>Lactobacillus plantarum</i> C11 |
| Plantaricin JK (PlnJ og PlnK) | <i>Lactobacillus plantarum</i> C11 |
| Enterocin 1071 (Ent1071A og Ent1071B) | <i>Enterococcus faecalis</i> BFE 1071 og |
| ” | <i>Enterococcus faecalis</i> FAIR-E309 |
| Lactocin 705 (705α og 704β) | <i>Lactobacillus casei</i> CRL 705 |
| Leucocin H (Hα og Hβ) | <i>Leuconostoc</i> MF215B |
| Brochocin-C (BrcA og BrcB) | <i>Brochothrix campestris</i> ATCC 43754 |
| ABP-118 (Abp118α og Abp118β) | <i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> UCC118 |
| Plantaricin NC8 (PLNC8α og PLNC8β) | <i>Lactobacillus plantarum</i> NC8 |
| Enterocin L50 (L50A og L50B) | <i>Enterococcus faecium</i> L50 |
| <u>Gruppe IIc: Umodifiserte ikke-pediocinlignende en-peptidbakteriosiner</u> | |
| Lactococcin A | <i>Lactococcus lactis</i> |
| Lactococcin B | <i>Lactococcus lactis</i> |
| Carnobacteriocin A | <i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A |
| Piscicolin 61 | <i>Carnobacterium piscicola</i> LV61 |
| Lactobin A | <i>Lactobacillus amylovorus</i> LMG P-13139 |
| Divergicin 750 | <i>Carnobacterium divergens</i> 750 |
| Enterocin B | <i>Enterococcus faecium</i> T136/CTC492 |

| | |
|------------------|--|
| Leucocin B-TA33a | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA33a |
| Acidocin B | <i>Lactobacillus acidophilus</i> M46 |
| Divergicin A | <i>Carnobacterium piscicola</i> V1 |
| Enterocin P13 | <i>Enterococcus faecium</i> P13 |
| Bacteriocin 31 | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| Lactococcin 972 | <i>Lactococcus lactis</i> IPLA 972 |

Tabell 1.1: Utvalg av gruppe II bakteriosiner og deres produsentbakterie (Nes et al., 2001; McCormick et al., 1998; Flynn et al., 2002; Maldonado et al., 2002; Cintas et al., 1998; Balla et al., 2000).

Gruppe IIa : Umodifiserte, pediocinlignende en-peptidbakteriosiner

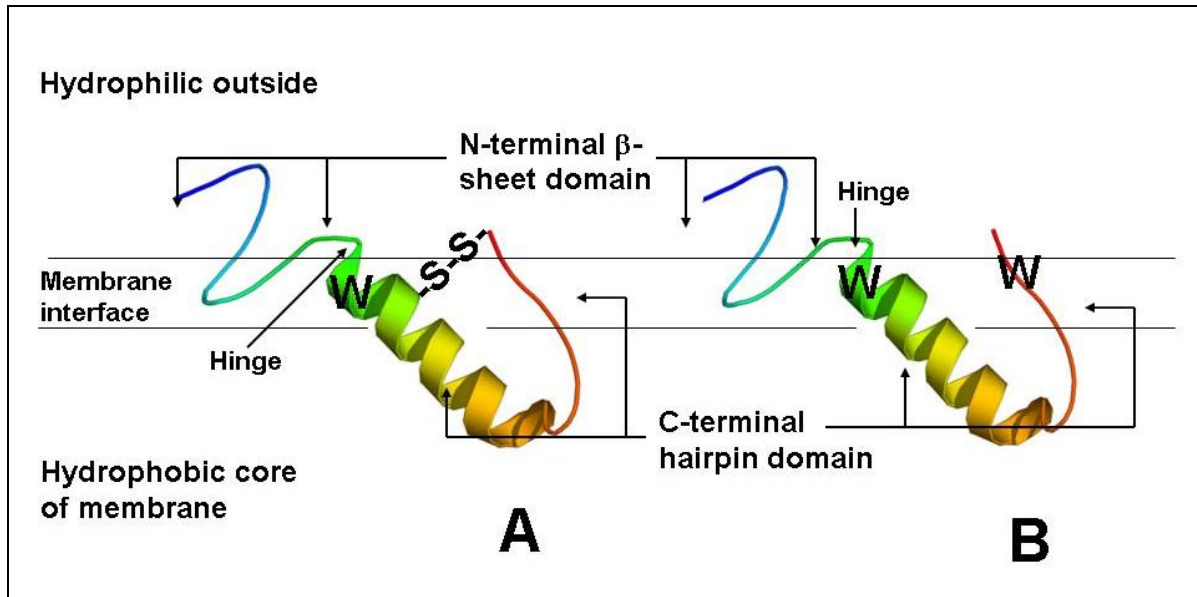
Denne gruppen er den mest studerte undergruppen av de umodifiserte bakteriosiner. De har stor grad av sekvenslikhet (40-60 %), er alle kationiske og på mellom 37-48 aminosyreresiduer. Det er spesielt stor sekvenslikhet i den N-terminale delen der det er en konsensussekvens med motivet YGNGV og en konservert disulfidbro (Nes et al., 2001). Den C-terminale delen har større sekvensvariasjon og den er hydrofob eller amfifil i motsetning til den N-terminale delen som er hydrofil. De dreper sannsynligvis ved å lage en pore i cellemembranen eller på annen måte destabilisere den.

De pediocinlignende bakteriosinene har flere gode kandidater til kommersielt bruk i næringsmiddelindustrien. Alle kjente pediocinlignende bakteriosiner er for eksempel aktive mot *Listeria* (Riley og Wertz, 2002).

Strukturstudier av pediocinlignende-bakteriosiner

Kjernemagnetisk resonans (Nuclear Magnetic Resonans: NMR)-studier av leucocin A (Fregeau Gallagher et al., 1997), carnobacteriocin B2 (Wang et al., 1999), sakacin P og en sakacin P-mutant (Uteng et al., 2003) som alle tilhører gruppe IIa viser at de har α -heliksstruktur fra ca midten av bakteriosinet og halvveis mot C-terminal ende (se Figur 1.1). Den N-terminale delen hos gruppe IIa bakteriosinene som danner en β -plate liknende struktur (se Figur 1.1) er forholdsvis konservert og kationisk. Man tror det er denne delen av bakteriosinet som binder seg til den negativt ladede celleveggen eller cellemembranen hos målcellen ved hjelp av elektrostatiske interaksjoner (Chen et al., 1997, Kazazic et al., 2002). Den C-terminale delen med α -heliksen er hydrofob og/eller amfifil og det er denne delen som trenger inn i cellemembranen hos målcellen (se Figur 1.1) (Fimland et al., 1996; Miller et al., 1998). Den C-terminale delen er også den delen som bestemmer bakteriosinets

spesifisitet (Johnsen et al., 2005b). Hybridbakteriosiner med N-terminal del fra et bakteriosin og C-terminal del fra et annet bakteriosin dreper de samme bakteriene som det bakteriosinet den C-terminale delen kommer fra (Fimland et al., 1996; Johnsen et al., 2005b).



Figur 1.1: 3-dimensjonal struktur av **A**: Sakacin P mutant og **B**: Sakacin P villtype og hvordan de formodes å ligge i en membran. N-terminal del av bakteriosinet danner en β -plate, som ligger uten for membranen. Den hydrofobe C-terminale delen ligger i membranen. På figuren er posisjonen til tryptofanresiduer (W), en disulfidbro og formodede hengselregioner vist. Figuren er utlånt av Gunnar Fimland.

Gruppe IIb : Umodifiserte to-peptidbakteriosiner.

Disse bakteriosinene består av 2 peptider som virker sammen, men de er ikke bare to synergistisk virkende en-peptidbakteriosiner (Oppegård et al., 2006). Hos noen to-peptidbakteriosiner må de to peptidene begge være tilstede for at bakteriosinet skal ha aktivitet, hos andre bakteriosiner har enkelt-peptidene svak aktivitet alene. To-peptidbakteriosinene er kationiske og amfile og på de punktene ligner de gruppe IIa-bakteriosinene. Optimal aktivitet nås når de to peptidene er til stede i omtrent samme mengde (Nissen-Meyer et al., 1992; Andersen et al., 1998). Det er bare ett immunitetsprotein til begge peptidene hvilket indikerer at de to peptidene til sammen utgjør en antimikrobiell enhet. Genene som koder for de to peptidene transkriberes også som en enhet (Nes et al., 1995; Diep et al., 1996).

To-peptidbakteriosinene kan ha utviklet seg fra to en-peptidbakteriosiner med synergistisk effekt. Hvis to synergistisk virkende en-peptidbakteriosiner produseres av samme bakterie

vil det være stor fordel for bakterien å forandre enkeltpeptidene på en måte som gjør dem mer effektive sammen men som kanskje går på bekostning av enkeltpeptidets effekt. (Oppegård et al., 2006).

Til denne gruppen tilhører lactococcin G, hvilket er det bakteriosinet dette arbeidet omhandler.

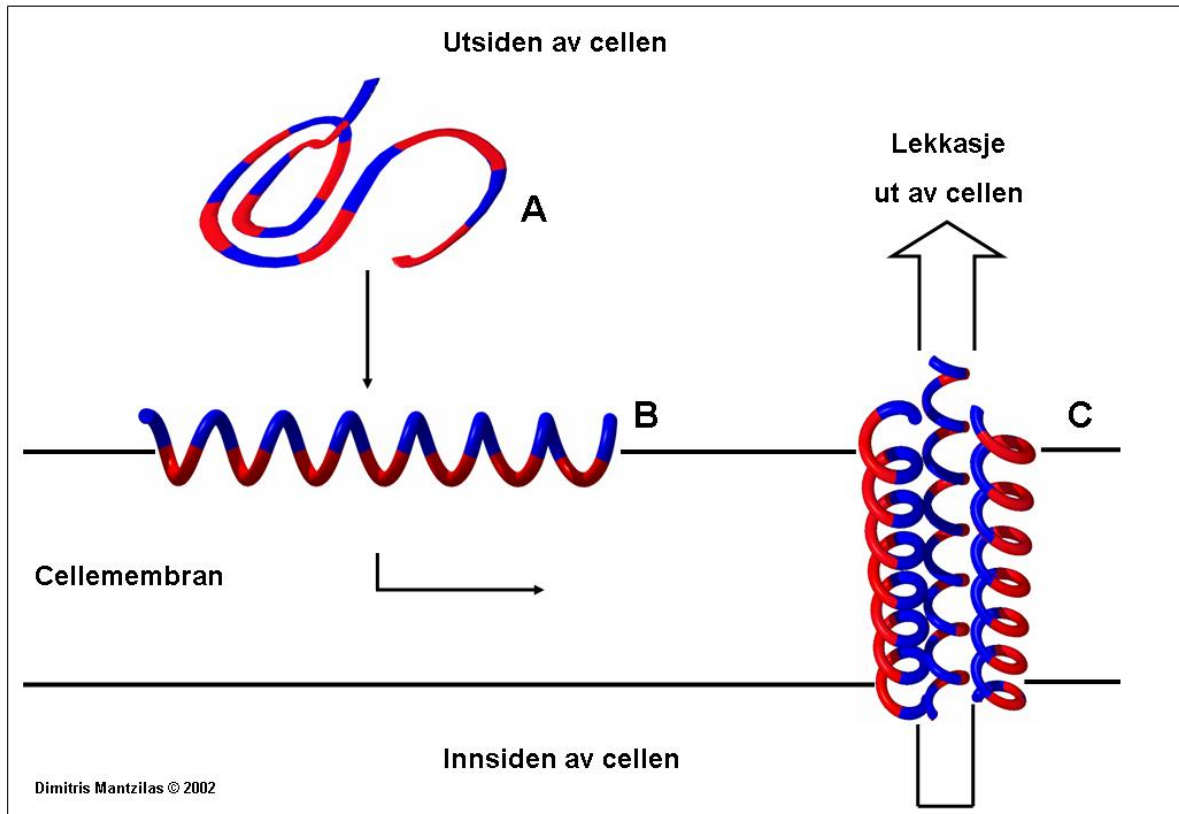
Gruppe IIc: Umodifiserte, ikke-pediocinlignende en-peptidbakteriosiner

Det er flere umodifiserte en-peptidbakteriosiner som ikke har sekvenslikhet med de pediocinlignende bakteriosinene. Disse er samlet i en egen undergruppe.

1.2.2 Gruppe II-bakteriosinenes virkningsmekanisme og regulering

1.2.2.1 Virkningsmekanisme for gruppe II-bakteriosiner

Nøyaktig hvordan bakteriosinet dreper målcellen vites ikke, men undersøkelser indikerer at gruppe II-bakteriosinene dreper ved å gjøre cellemembranen permeabel for små molekyler (Hancock og Chapple, 1999; Nes et al., 2001). Det er flere teorier som beskriver hvordan membranpermeabiliseringen skjer. Tønne-stav-mekanismen innebærer at peptidene danner amfifile α -helikser som penetrerer cellemembranen (se Figur 1.2). Disse assosieres i en tønnestruktur som danner en pore i cellemembranen med de hydrofobe sidekjedene mot lipidene i membranen og de hydrofile sidekjedene inn mot sentrum av poren. Poren lekker da essensielle ioner og andre vannløselige stoffer ut av cellen hvor etter cellen dør.



Figur 1.2: Fremstilling av tønne-stav-mekanismen. De hydrofile segmentene er blå mens de hydrofobe er rød. Figuren er utlånt av Dimitris Mantzilas.

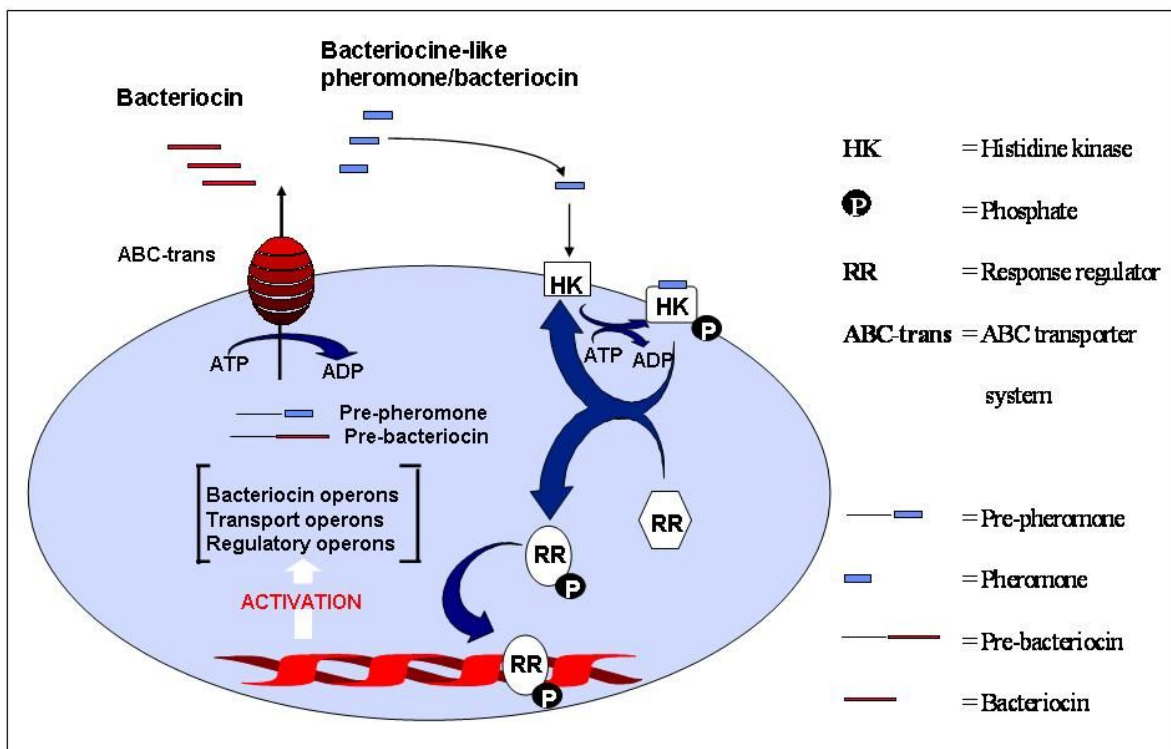
Teppemodellen innebærer at de amfifile α -heliksene ”flyter” på overflaten av cellemembranen med de hydrofobe sidekjedene ned mot og inn i cellemembranen og de hydrofile sidekjedene ut mot løsningen rundt cellen. Når bakteriosin-konsentrasjonen er høy nok i et lokalt område blir fosfolipidene dyttet tilside og membranen kollapser (Nes et al., 2001).

1.2.2.2 Regulering av bakteriosinproduksjon

Bakteriosinproduksjon av mange av gruppe II-bakteriosinene som sakacin A, sakacin P, carnobacterocin B2, enterocin A, enterocin B, plantaricin EF og plantaricin JK er regulert (Nes et al., 2001). Produksjonen aktiveres ved ytre påvirkninger som for eksempel høy celledetthet. Bakterien danner peptidferomoner (også kalt induksjonsfaktorer) som strukturelt ligner et bakteriosin og som lages ribosomalt som et peptid med en ledersekvens av Gly-Gly-typen. Ved høy celledetthet eller andre miljøforandringer vil det akkumuleres peptidferomoner som til slutt utløser en respons hos cellen (også kalt Quorum-sensing). Peptidferomonet aktiverer en membranbundet histidinkinase (HK) som deretter autofosforyleres. Fosfatgruppen overføres deretter til et nytt protein, en responsregulator

(RR), som aktiverer transkripsjon av både genene involvert i produksjon av bakteriosin og peptidferomonproduksjon (se Figur 1.3). Siden akkumulering av peptidferomonet også aktiverer sin egen produksjon vil det raskt bli en økning i mengden av bakteriosin (Nes et al., 2001). Plantaricin A er peptidferomonet som induserer produksjon av bakteriosinene plantaricin EF og plantaricin JK i *Lacobacillus plantarum* C11 (Hauge, 1998b). Plantaricin A interagerer først på en ikke-kiral måte med membranlipidene hvorefter det dannes α -heliksstruktur i den C-terminale delen av peptidet (Kristiansen et al., 2005). Struktureringen og posisjoneringen av peptidet gjør det mulig for det å interagere kiralt med reseptoren i eller nær membran-vann interfasen. Måten plantaricin A interagerer med membranen på kan forklare hvorfor plantaricin A og liknende peptidferomoner noen ganger har antimikrobiell aktivitet i tillegg til feromonaktiviteten. Plantaricin As antimikrobielle aktivitet er ikke avhengig av kiraliteten til peptidet (Hauge, 1998b; Kristiansen et al., 2005).

Om produksjon av lactococcin G er regulert er ikke kjent.



Figur 1.3: Skjematisk oversikt over regulering av bakteriosinproduksjon hos noen gruppe II-bakteriosiner (Hauge, 1998b).

1.3 Bakteriosingener og genprodukter

1.3.1 Bakteriosingenene

Fire gener kreves som et minimum for produksjon av et en-peptidbakteriosin mens fem gener er minimum for to-peptidbakteriosinene (lantibiotika krever minst syv gener (Nes et al., 1995)). De fire eller fem genene som er nødvendig for gruppe II-bakteriosiner er (i) genet som koder for selve bakteriosinet (to gener for to-peptidbakteriosinene) (ii) et gen som koder for et immunitetsprotein som beskytter bakteriosinprodusenten mot bakteriosinet (iii) et gen som koder for en membranassosiert ABC-transportprotein som transporterer bakteriosinet ut av cellen og kutter av ledersekvensen og (iv) et gen som koder for et protein som er nødvendig for bakteriosintransport ut av cellen men hvis rolle ikke er forstått ennå. Dette siste proteinet kalles accessory-protein (Nes et al., 2001).

Genene er oftest samlet i ett eller to operoner, som kan være lokalisert på enten kromosomet eller på plasmider. Genene for lactococcin G og pediocin PA-1 er alle samlet i ett og samme operon. For de fleste andre gruppe II-bakteriosiner er bakteriosingenene og immunitetsproteingenet i ett operon og ABC-transporterproteingenet og accessory-proteingenet i et annet, men nærliggende operon (Nes et al., 2001). Dette er for eksempel tilfellet for lactococcin A (Nes et al., 1995).

Bakteriosiner syntetiseres ofte som et prepeptid med et N-terminalt lederpeptid på 15-30 aminosyreresiduer (se Tabell 1.2) ofte med en konsensussekvens (Håvarstein et al., 1995; Nes et al., 1996; Nissen-Meyer et al., 1997). Lederpeptidet kuttes ofte fra det umodne bakteriosinet etter et konserverte Gly-Gly-motiv. Hvorfor bakteriosinene har denne ledersekvensen vet man ikke, men det er foreslått at det øker interaksjonene mellom prepeptidet og transporterproteinet og dermed får bakteriosinet prosessert og sekretert (Nes et al., 1996). En annen forklaring kan være at lederpeptidet hindrer bakteriosinet i å være aktivt til det er sekretert ut av cellen (Nes et al., 1996). Inntil 1994 var det bare funnet ledersekvenser med Gly-Gly-motivet, men senere er det også funnet *sec*-ledersekvenstyper (Worobo et al., 1995; Leer et al., 1995).

| Bakteriosin | Ledersekvens |
|-------------------------|--------------------------------|
| lactococcin G- α | MKELSEKELRECVGG |
| lactococcin Q- α | MKELSEKELRECVGG |
| enterocin 1071A | MKQYKVLNEKEMKKPIGG |
| lactococcin G- β | MKNNNNFFKGM EIIEDQELVSITGG |
| lactococcin Q- β | MKNNNNFFKDM EIIEDQELVSITGG |
| enterocin 1071B | MKNIKNASNIKVIEDNELKAITGG |
| lactacin FA | MKQFN YLSHKDLAVVVG |
| lactacin FX | MKLNDKELSKIIVGG |
| plantaricin J | MTVNKMIKDL DVDAFAPISNNKLN GVVG |
| plantaricin K | MKIKLTVLNEFEELTADAEKNISGG |
| plantaricin SA | MDKIIKFQGISDDQLNAVIGG |
| plantaricin SB | MNNALSFEQQFTDFSTLSDSELESVEGG |
| thermophilin A | MNTITICKFDVLD AELLSTVEGG |
| thermophilin B | MKQYNGFEVLHELDLANVTGG |
| lactococcin A | MKNQLN FNIVSDEELSEANGG |
| divergicin 750 | MIKREKNRTISSLGYEEISNHKLQEIQGG |
| sakacin A | MEKFIELSLKEVTAITGG |
| sakacin P | MEKFIELSLKEVTAITGG |
| enterocin B | MQNVKELSTKEMKQIIGG |
| carnobacteriocin A | MNNVKELSIKEMQQVTGG |
| carnobacteriocin B1 | MKSVKELNKKEMQQIIGG |
| carnobacteriocin B2 | MNSVKELNVKEMKQLHGG |
| enterocin A | MKHLKILSIKETQLIYGG |
| pediocin PA-1 | MKKIEKLTEKEMANIIGG |
| leucocin A | MMNMKPTESYEQLDNSALEQVVGG |
| mesentericin Y | MKSVEAYQQLDNQNLKKVVG |

Tabell 1.2: Utvalg av ledersekvenser med Gly-Gly-motiv. Tabellen er utlånt av Gunnar Fimland.

1.3.2 Immunitetsproteinet

Immunitetsproteinet gjør bakteriene motstandsdyktige mot sitt eget bakteriosin.

Immunitetsproteinene til carnobacteriocin B2 (Quadri et al., 1995) og enterocin A (Johnsen et al., 2005a) (begge pediocinlignende en-peptidbakteriosiner) og lactococcin A (Venema et al., 1994; Nissen-Meyer et al., 1993) (et umodifisert ikke-pediocinlignende en-peptidbakteriosin) er isolert og karakterisert. Strukturene til enterocin A- og carnobacteriocin B2-immunitetsproteinene er bestemt ved henholdsvis røntgendiffraktion og NMR-spektroskopi (Johnsen et al., 2005a; Sprules et al., 2004). Begge er ”4-helix-bundle-proteiner”, hvilket indikerer det er et konservert strukturelt motiv i pediocinlignende immunitetsproteiner (Johnsen et al., 2005a).

Lactococcin A immunitetsproteinet syntetiseres uten ledersekvens og uten posttranslasjonell modifisering. Immunitetsproteinet utgjør en stor del av cytosolisk protein og i noen tilfeller er likt fordelt mellom cytosol og cellemembranen (Nissen-Meyer et al. 1993). En modell foreslår at lactococcin A-immunitetsproteinet har en transmembran α -heliks slik at C-terminal del er på utsiden av cellen og kan interagere med bakteriosinet. For å gjøre sensitive celler immune mot lactococcin A eller carnobacteriocin B2 er det ikke tilstrekkelig å tilsette lactococcin A immunitetsproteinet eller carnobacteriocin B2 immunitetsproteinet ekstracellulært, men man kan gjøre celler immune ved å sette inn et plasmid med immunitetsgenet på (Fimland et al., 2002). Hos de pediocinlignende bakteriosiner er det den C-terminale delen av immunitetsproteinet som bestemmer hvilke bakteriosiner det gjør cellen immun over for (Johnsen et al., 2005b).

1.3.3 ABC-transporterproteinet

ABC-transporterproteinet transporterer bakteriosinet ut av cellen og kutter samtidig av ledersekvensen. Proteinet er membranassosiert og tilhører ATP binding cassette (ABC)-transporter-superfamilien. Dette er den største gruppen av proteiner som selektivt transporterer forbindelser over en biologisk membran og de finnes både hos prokaryoter og eukaryoter. ABC-transportene er meget spesifikke for hva de sekreterer (Nes et al., 2001).

De fleste kjente bakteriosiner og peptidferomoner produsert av melkesyrebakterier sekreteres av ABC-transportere. Eksempel på unntak er enterocin P, bakteriosin 31, acidocin

B, divergicin A og lactococcin 972 som har en *sec*-avhengig ledersekvens i stedet, og dermed formodentlig også har sitt eget *sec*-avhengige transportsystem (Nes et al., 2001).

Dedikerte ABC-transportere for bakteriosinsekresjon skiller seg ofte fra de fleste andre ABC-transportere ved å ha et N-terminalt domene på ca 150 residuer. Dette N-terminale domenet kan spesifikt kutte av ledersekvensen til bakteriosinet på C-terminal side av Gly-Gly-motivet (Oppegård et al., 2006). ABC-transportene til lactococcin A, pediocin PA-1 og lactococcin G er alle på ca 700 aminosyreresiduer, mens mange av ABC-transportene til lantibiotika er på 550-600 aminosyreresiduer. Forskjellen i størrelsen ligger i den N-terminale delen (Nes et al., 1995), hvor man tror kuttingen foregår.

1.3.4 Accessory-protein

Funksjonen til dette proteinet er ikke kjent, men proteinet er nødvendig for å transportere bakteriosinet ut av cellen. Uten et funksjonelt accessory-protein vil for eksempel ikke lactococcin A og pediocin PA-1 sekreteres av cellen (Stoddard et al., 1992; Franke et al., 1996; Nes et al., 2001).

1.4 Lactococcin G

Lactococcin G produseres av melkesyrebakterien *Lactococcus lactis* LMG 2081.

Lactococcin G var det første to-peptidbakteriosinet som ble identifisert og isolert (Nissen-Meyer et al., 1992). Det består av to peptider som kalles α og β som er på henholdsvis 39 og 35 aminosyreresiduer (sekvensen til lactococcin G er vist i Figur 1.5). Molekylmassene er på henholdsvis 4346 Da og 4110 Da og pI på henholdsvis 10,9 og 10,4 (Nissen-Meyer et al., 1992).

Verken α - eller β -peptidet har noen antimikrobiell aktivitet alene mot de bakterier de er testet mot til nå i konsentrasjoner opp til 50 μ M (Moll et al., 1996; Hauge, 1998b). Optimal aktivitet oppnås ved å ha α - og β -peptidene i et 1:1 forhold. Ikke alle to-peptidbakteriosiner er uten aktivitet når de er uten det komplementære peptidet. For eksempel har peptidene i plantaricin JK, plantaricin EF, lactacin F og enterocin L50 en viss antimikrobiell aktivitet uten at det komplementære peptidet er til stede, men sammen med det komplementære peptidet er den antimikrobielle aktiviteten langt større (Andersen et al., 1998; Cintas et al.,

1998; Hauge, 1998b). Aktiviteten til enterocin L50 øker opp til 500 ganger (Cintas et al., 1998), og aktiviteten til plantaricin EF og plataricin øker minst 10^3 ganger (Andersen et al., 1998) når begge peptidene er tilstede. PlnF-peptidet i plantaricin EF, β -peptidet i plantaricin S og ThmA-peptidet i thermophilin 13 har antimikrobiell aktivitet alene. Det komplementære peptidet til disse har ikke aktivitet alene, men sammen har de to komplementære langt større antimikrobiell aktivitet enn det aktive av peptidene har alene (Anderssen et al., 1998; Marciset et al., 1997; Hauge, 1998b). Thm B-peptidet øker aktiviteten til Thm A-peptidet med ca 40 ganger samtidig som overskudd av Thm B-peptidet kan hemme aktiviteten til thermophilin (Maciset et al., 1997).

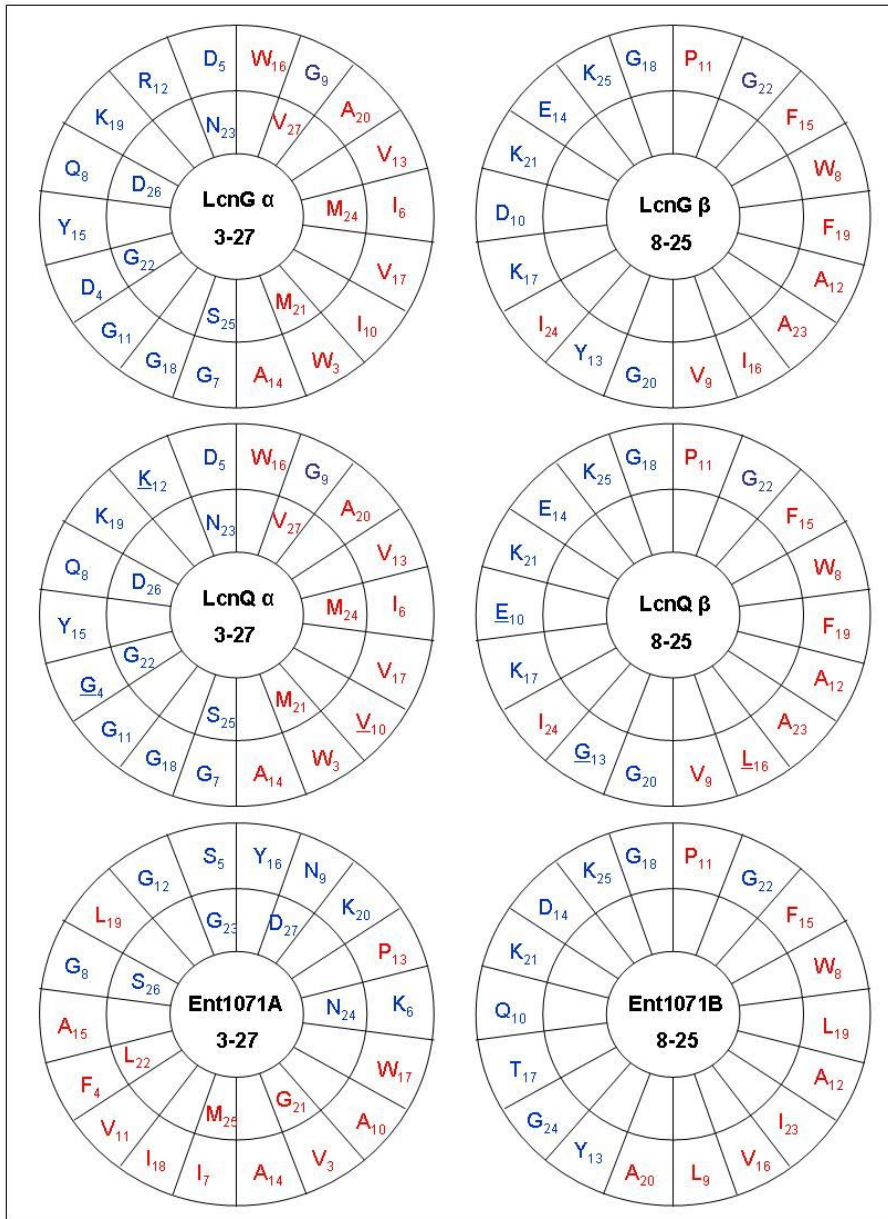
1.4.1 Strukturstudier av to-peptidbakteriosinene

Lactococcin G

Strukturstudier av lactococcin G ved hjelp av sirkulær-dikronisme (CD) viser at peptidene ikke har noen struktur eller har interaksjoner med hverandre når de er i vandig løsning. Når det tilsettes forbindelser som ligner membraner som dodesylfosfocholin-miceller eller negativt ladete dioleoylglycerofosfoglycerol ($Ole_2GroPGro$)-liposomer får peptidene struktur (Hauge et al., 1998a). Det dannes amfifile α -helikser i den N-terminale delen av begge peptidene og når det er liposomer tilstede begynner de to peptidene å interagere med hverandre og får mer α -heliksstruktur. Den ekstra struktureringen kommer bare når de to peptidene blir tilsatt samtidig og ikke hvis de blir tilsatt etter hverandre eller hvis to liposomprøver som var behandlet med hvert sitt peptid blir blandet sammen (Hauge, 1998b). De har likevel antimikrobiell aktivitet hvis celler behandles med et av peptidene, vaskes og deretter behandles med det andre peptidet. Man kan tenke seg at peptidene binder seg til celleoverflaten hver for seg og først deretter interagerer med hverandre og får ekstra struktur og antimikrobiell aktivitet (Moll et al., 1998).

Det er ennå ikke publisert undersøkelser av to-peptidbakteriosinenes tredimensjonale struktur. Men primærstrukturen til to-peptidbakteriosinene indikerer at de på samme måte som de pediocinlignende bakteriosiner har α -heliksstruktur i minst et av peptidene (Hauge et al., 1998a; Hauge et al., 1999). NMR-undersøkelser av lactococcin G-peptidene sammen med miceller indikerer også at de har α -heliksstruktur. α -peptidet har α -heliksstruktur mellom residue 3 og 22 med et mulig knekk i den glycinrike delen mellom residue 7 og 12, og β -peptidet har trolig α -heliksstruktur fra prolin i posisjon 11 og 3-5 residuer på hver side

(Rogne et al., upubliserte resultater). Settes det opp Edmunson-hjul for peptidene i to-peptidbakteriosinene (se Figur 1.4) viser de amfifil karakter for α -heliksene i flere av peptidene i to-peptidbakteriosinene (Hauge, 1998b).



Figur 1.4: Edmunson-hjul som viser den formodede amfifile α -heliksstruktur i lactococcin G (Hauge, 1998b), lactococcin Q (Zendo et al., 2006) og enterocin 1071 (Balla et al., 2000). Hydrofile aminosyreresiduer er farget blå og hydrofobe aminosyreresiduer er farget rød. Aminosyreresiduer som er forskjellig i lactococcin G i forhold til i lactococcin Q er understreket.

Struktur til andre to-peptidbakteriosiner

Noen to-peptidbakteriosiner som sannsynligvis ikke danner amfifile α -helikser finnes også. CD og NMR-studier av brochocin-C-peptidene indikerer de danner en del β -platestruktur. Det er sannsynligvis også tilfellet for thermophilin 13 siden den har mange likheter i sekvensen til brochocin-C (Oppegård et al., 2006).

Virkningsmekanisme til to-peptidbakteriosinene

De to-peptidbakteriosinene hvis virkningsmekanisme som til nå er studert er lactococcin G (Moll et al., 1996; Moll et al., 1998), plantaricin EF og plantaricin JK (Moll et al., 1999a), lactacin F (Abee et al., 1994) og thermophilin 13 (Marciset et al., 1997). De gjør alle cellemembranen permeabel for diverse små molekyler. Dette ødelegger cellens elektrokjemiske gradient ved å fjerne det elektriske potensialet over cellemembranen og/eller den transmembrane pH-gradienten. Men alle bakteriosiner gjør ikke målcellen permeabel for de samme ioner hvilket indikerer at de har en viss spesifisitet for hvilke ioner som kommer over membranen. Lactococcin G permabiliserer cellemembranen for mange monovalente kationer som Na^+ , Li^+ , K^+ , Cs^+ , Rb^+ og choline, men ikke for anioner, divalente kationer (Mg^{2+}) eller H^+ (Moll et al., 1996; Moll et al., 1998). Plantaricin EF og plantaricin JK permabiliserer også cellemembranen for monovalente kationer (også H^+), men ikke for divalente kationer (Moll et al., 1999a), mens lactacin F permabiliserer for K^+ og fosfat (Moll et al., 1999b).

1.4.2 Likheter mellom lactococcin G, lactococcin Q og enterocin 1071

Det er veldig store sekvenslikheter mellom lactococcin G og to nylig oppdagede bakteriosiner (se Figur 1.5): enterocin 1071 (Balla et al., 2000) og lactococcin Q (Zendo et al., 2006). De to peptidene i enterocin 1071 kalles enterocin 1071A og enterocin 1071B. Enterocin 1071A er 56 % identisk med og har 60 % likhet med lactococcin G- α -peptidet (Franz et al., 2002), og enterocin 1071B har 61 % likhet med lactococcin G- β -peptidet (Balla et al., 2000).

| | | |
|---------------------------|--|----|
| Lactococcin G- α : | GT-WDDIGQGIGRVAYWVGKAMGNMSDVNQASRINRKKKH | 39 |
| Lactococcin Q- α : | SIWGDIGQGVGKAAAYWVGKAMGNMSDVNQASRINRKKKH | 39 |
| Enterocin 1071A: | ESVFSKIGNAVGPAAYWILKGLGNMSDVNQADRINRKK-H | 39 |
| Lactococcin G- β : | KKWGWLAWVDPAYEFIKGFSGKAIKEGNKDKWKNI | 35 |
| Lactococcin Q- β : | KKWGWLAWVEPAGEFLKGFSGKAIKEGNKDKWKNI | 35 |
| Enterocin 1071B: | GPGKWLPWLQPAYDFVTGLAKGIGKEGNKDKWKNV | 35 |

Figur 1.5: Sammenlikning av sekvensene til lactococcin G fra *Lactococcus lactis* LMG2081, lactococcin Q fra *Lactococcus lactis* QU 4 og enterocin 1071 fra *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. Identiske aminosyreresiduer er farget rød, aminosyreresiduer som har liknende ladning, hydrofobisitet, hydrofilisitet eller aromatisk karakter er farget blå og aminosyreresiduer med likheter i polaritet, men forskjeller i struktur er farget grønne (Oppegård et al., 2006).

Enterocin 1071 og lactococcin G har forskjellige virkningspektre (Balla et al., 2000). Enterocin 1071 er aktive mot flere *Enterococcer* og blant annet *Listeria innocua*. En interessant likhet mellom lactococcin G- α -peptidet, enterocin 1071A-peptidet, lactococcin Q- α -peptidet og andre bakteriosiner (lactococcin A og lactococcin S) er at de alle har et histidinresidue i C-terminal ende av peptidet (Balla et al., 2000).

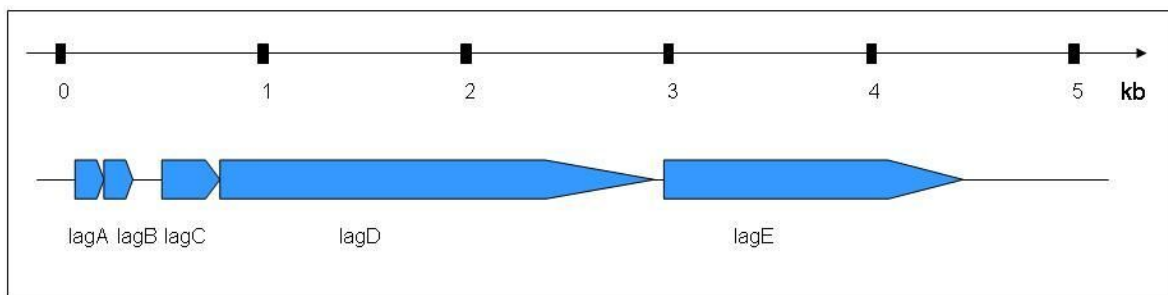
Lactococcin G-peptidene kan blandes med peptidene til lactococcin Q og framdeles være aktive. En blanding av lactococcin Q- α -peptidet med lactococcin G- β -peptidet er for eksempel 32-ganger mer potent enn lactococcin Q mot visse stammer (Zendo et al., 2006).

1.4.3 Genetisk oversikt over lactococcin G og enterocin 1071

1.4.3.1 Lactococcin G-operonet

Lactococcin G-operonet er sekvensert av Hårvarstein et al. (ikke-publiserte data – se vedlegg for sekvensen til deler av operonet). Lactococcin G-operonet er lokalisert på kromosomet (Nes et al., 1995) og inneholder 5 åpne leserammer kontrollert av samme promotor (se Figur 1.6). De to første genene i operonet (lagA og lagB) er genene som koder for α - og β -peptidene til lactococcin G. Sammenlikner man lactococcin G-operonet med operonene til pediocin PA-1 og lactococcin A kan man anta at det tredje genet i lactococcin G-operonet (lagC) koder for et lactococcin G-immunitetsprotein (Hauge, 1998b). Antakelsen er da basert på lagC-genets posisjon i operonet, lagC-proteinets størrelse på 110

aminosyreresiduer, hvilket er tilsvarende størrelse som immunitetsproteinene til pediocin PA-1 og lactococcin A, og at proteinet muligvis danner 4 transmembrane helikser (Nes et al., 1995). Det fjerde gen i lactococcin G-operonet (lagD) koder for et protein på 703 aminosyreresiduer som har 44 % sekvenslikhet med ABC-transporteren til lactococcin A. Det femte gen i lactococcin G-operonet (lagE) har 25 % sekvenslikhet med et protein som er nødvendig for transport av bakteriosinet ut av cellen i *Lactococcus lactis* (Hauge, 1998b; Franke et al., 1996). Proteinene kalles accessory-protein.



Figur 1.6: Lactococcin G-operonet. Operonets fem åpne leserammer er vist i blått, hvor genet som koder for α -peptidet kalles lagA, β -peptidet (lagB), det formodede immunitetsproteinene (lagD), ABC-transporterproteinene (lagD) og accessory-protein (lagE).

1.4.3.2 Genetisk organisering av enterocin 1071

Enterocin 1071 er lokalisert på det ca 10 kb store plasmidet pEF1071 (Balla et al., 2005). Det er funnet to operoner tilknyttet bakteriosinet. Det første operonet inneholder genene som koder for prepeptidene til enterocin 1071, ent1071A og ent1071B og et gen (entI) som koder for et immunitetsprotein på 125 aminosyreresiduer og som gir resistens mot enterocin 1071. Det andre operonet er involvert i prosessering og transport av enterocin 1071 og det er transkribert i motsatt retning av det første operonet. Genene entT koder for en ABC-transporter på 697 aminosyreresiduer og genet entD koder for et accessory-protein på 455 aminosyreresiduer. I tillegg er det 4 andre gener i det andre operonet som man tror er involvert i plasmidtransport og plasmidreplikasjon (Balla et al., 2005). Begge prepeptidene har dobbel glycin-ledersekvenser på samme måte som lactococcin G (se Tabell 1.2).

2. Hensikt

Hensikten med oppgaven var å få til produksjon av peptidene i 2-peptidbakteriosinet lactococcin G hver for seg. Ved rensing av lactococcin G fra villtype (*Lactococcus lactis* LMG2081) er det problemer med kryss-kontaminering. Dette viste seg ved at det så ut som om lactococcin G-peptidene hadde en viss aktivitet alene. Senere forsøk med syntetiske peptider viste at lactococcin G-peptidene ikke har aktivitet uten at det komplementære peptidet er tilstede (Moll et al., 1996; Hauge, 1998b). Ved å lage et rekombinant ekspressjonssystem for hvert av peptidene fjernes problemene med forurensing av det andre peptidet. I tillegg er det enkelt å mutere genene som koder for de to lactococcin G-peptidene, slik at man kan se på interaksjon og struktur.

Det var også et mål å undersøke om uttrykk av det antatte immunitetsgenet (lagC) er nødvendig for produksjon av α - og β -peptidet hver for seg. Og å uttrykke det antatte immunitetsgen i en lactococcin G-følsom stamme for å verifisere at det virkelig koder for et immunitetsprotein. Da dette arbeidet var påbegyndt var det ikke kjent om lagC-genet faktisk kodet for et immunitetsprotein. Det var kun anslått ut fra dets størrelse og plassering i operonet (Nes et al., 1995).

3. Metoder

3.1 Genteknologiske metoder

3.1.1 Polymerase chain reaction – PCR

Metoden brukes til amplifisering av et ønsket DNA-fragment. Ut fra sekvensen til det ønskede fragment konstrueres to primere med komplementær sekvens til endene av det ønskede produkt. Sekvensene til endestykkene må således være kjent på forhånd.

PCR-reaksjonsblandingen består av templat (plasmid eller kromosommalt DNA), to oligonukleotider, de fire deoksynukleotider (dNTP), termostabil DNA-polymerase og en buffer optimalisert for DNA-polymerasen. I PCR-maskinen (MJ Research) varmes blandingen til 94-95 °C for å inhibere proteaser og å smelte templat-DNA og etter 2 minutter tilsettes DNA-polymerasen. DNA er denaturert ved denne temperatur (denaturering). Neste steg er en avkjøling av løsningen til en temperatur hvor oligonukleotidene bindes spesifikt til DNA-trådene (annealing). Under tredje steg økes temperaturen til en temperatur som er optimal for DNA-polymerasen slik at elongeringen er rask og med lav feilinkorporering av deoksynukleotider (elongering). Vanligvis brukes 25-30 sykluser med denaturering, annealing og elongering. Temperaturene, konsentrasjonene til reaktantene, magnesiumionkonsentrasjonen og tiden de enkelte trinnene bruker kan varieres for å optimalisere reaksjonen. I oppgaven er det brukt 3 forskjellige DNA-polymeraser. *Pfu Turbo* DNA-polymerase (Stratagene), *Taq* DNA-polymerase (Fermentas) og VENT DNA-polymerase (New England BioLabs). *Pfu Turbo* DNA-polymerase (Stratagene) og VENT DNA-polymerase (New England BioLabs) gir ”blunt-ends” og har korrekturlesing. *Taq* DNA-polymerase (Fermentas) gir ikke ”blunt-ends”, har ikke korrekturlesing, men er tilgjengelig vesentlig billigere enn de andre.

Reaksjonsblanding for *Pfu Turbo* DNA-polymerase (Stratagene)

1-2 µl templat (5-50 ng avhengig av konsentrasjonen)

5 µl forward primer (20 pmol/µl)

5 µl reverse primer (20 pmol/µl)

5 µl 10x *Pfu Turbo* DNA-polymerasebuffer

8 µl av 5 mM dNTP-miks (1,25 mM av hver dNTP)

1 µl *Pfu Turbo* DNA-polymerase (10 U/µl)

dH₂O til sluttvolumen på 50 µl

Reaksjonsblandingen for *Taq* DNA-polymerase (Fermentas) og VENT DNA-polymerase (New England BioLabs) er tilsvarende denne men med små tilpasninger. Til *Taq* DNA-polymerasen tilsettes MgCl₂ i reaksjonsblandingen og til VENT DNA-polymerasen tilsettes MgSO₄. Bufferen byttes med buffer som er optimalisert for nettopp dette enzymet.

DNA-polymerasen tilsettes først reaksjonsblandingen etter 2 minutters ”hotstart” ved 95 °C. ”Hotstart” brukes for å inhibere eventuelle proteaser i reaksjonsblandingen.

Reaksjonsblandingen ble kjørt på en PCR cyclus (MJ Resrarch) etter følgende program (Tabell 3.1):

| Segment | Antall sykluser | Temperatur | Tid |
|---------|-----------------|------------|-----------------------|
| 1 | 1 | 95 °C | 2 min (hotstart) |
| 2 | 30 | 95 °C | 45 sek (denaturering) |
| | | 50 °C | 45 min (annealing) |
| | | 72 °C | 1 min (elongering) |

Tabell 3.1: Parametere for PCR-program.

3.1.2 Plasmidisolering – Miniprep

Plasmider isoleres ved å bruke et QUIquick Spin Kit (Quiagen).

Escherichia coli dyrkes over natten ved 37 °C og melkesyrebakterier dyrkes ved 30 °C. 1-5 ml av cellekulturen spinnes ned i en bordsentrifuge (Heraus Instrument) ved 13000 rpm i 2

minutter. Cellepelleten resuspenderes i 250 µl av buffer P1 (Resuspension solution). 250 µl P2-buffer (lysis buffer) tilsettes og blandes forsiktig ved å snu eppendorfrøret opp ned noen ganger. 350 µl N3-buffer (Neutralisation buffer) tilsettes og løsningen blandes forsiktig. N3-bufferen feller proteiner, lipider og kromosommalt DNA mens plasmider fortsatt er i løsning. Utfelt materiale spinnes ned ved 13000 rpm i 10 minutter. Supernatanten overføres til en spinn-kolonnie som binder plasmidene. Kolonnen sentrifugeres og ”flow-through” kastes. Kolonnen tilsettes PE-buffer (Wash buffer) og sentrifugeres igjen. Kolonnen overføres til et nytt eppendorfrør, tilsettes 50 µl sterilt, destillert vann og sentrifugeres på nytt. Plasmidene elueres i vannet.

Ved isolering av plasmid fra melkesyrebakterier innføres et ekstra trinn. Etter at cellepelleten er løst i P1-buffer (Resuspension solution) tilsettes 20 µl lysozym (40 µg/ml) og løsningen settes på 37 °C i 10-15 minutter. Behandling med lysozym ødelegger celleveggen i de gram-positive bakteriene. Det undersøkes om cellene er lyserte før det fortsettes med protokollen som beskrevet over. 10 µl P2-buffer (Lysis buffer) blandes med 10 µl av celledøsningen. Blir blandingen viskøs er cellene lysert på grunn av frigjort DNA.

3.1.3 Agarosegelelektroforese

Agarosegelelektroforese blir brukt både til rensing av PCR-produkter, kontroll av størrelse på PCR-produktene og renheten av plasmider etter plasmidrensing. Agarose er et lineært polysakkarid som ved koking i elektroforesebuffer og etterfølgende avkjøling danner et nettverk. Tettheten til nettverket bestemmes av agarosekonsentrasjonen. For å visualisere DNA i gelen tilsettes etidiumbromid (EtBr) før gelen stivner. EtBr legger seg mellom basene i DNA-dobbelheliksen og ved UV-bestråling lyser DNA oransje mot blå bakgrunn. DNA som er applisert på gelen vil når det utsettes for et elektrisk felt vandre mot anoden da DNA er negativt ladet ved nøytral pH. De korteste DNA-fragmentene vil vandre raskere enn de lange. Vandringshastigheten bestemmes også av agarosekonsentrasjonen, spenning og ionestyrke. Det brukes geler med agarosekonsentrasjon på 0,8 %. Ved bestemmelse av et DNA-fragments størrelse brukes det GeneRuler 1Kb DNA-Ladder (Fermentas) som standard. En Hoefer Mini Horizontal Submarine Unit (GE Healthcare) ble brukt sammen med en EPS600 (GE Healthcare) som strømkilde.

3.1.4 Restriksjonskutting

Restriksjonsenzymmer er endonukleaser som gjenkjenner dobbeltrådet DNA med en spesifikk sekvens og kutter begge trådene i eller nær denne sekvensen. Type I og type III restriksjonsenzymmer er ikke sekvensspesifikke nok til at de egner seg til molekylær kloning. Type II restriksjonsenzymmer kutter under de rette betingelsene alltid det samme sted relativt til gjenkjennelsesekvensen. Gjenkjennelsesekvensen har ofte palindrom symmetri. Restriksjonsenzymene kan lage ”blunt-ends”, det vil si begge trådene er kuttet på samme sted, eller de kan lage ”sticky-ends”. Med sticky-ends menes det at de er kuttet ved forskjellige posisjoner på de to trådene. Restriksjonsfragmenter med sticky-ends vil fortrinnsvis interagere spesifikt til fragmenter kuttet med samme restriksjonsenzym.

Restriksjonsenzymene er avhengige av riktig buffer og bufferkonsentrasjon for å kutte spesifikt. Riktig buffer følger oftest med enzymet fra produsenten. Hvis man ønsker å kutte med flere restriksjonsenzymmer samtidig må man finne en buffer som begge enzymene fungerer i. Optimaliserte forhold for enzymene finnes i leverandørkatalogene. Enzymmengden i kuttemiksen bør ikke overstige 10 % (vol/vol), da glycerol kan hemme enzymaktivitet.

Oppskrift til kutting

40 µl plasmid eller PCR-produkt (ca 0,5 µg/µl)
8 µl Buffer (spesifisert i leverandørkatalogen)
3,5 µl Restriksjonsenzym av hver type (10 U/µl)
dH₂O til sluttvolumen på 80 µl

Blandingens inkuberes ved 37 °C i ca 90 minutter på vannbad

Hvis det ønskes å undersøke om et plasmid inneholder innskudd kan samme oppskrift brukes med bare ¼ av volumene.

3.1.5 Defosforlyring av vektor

For å unngå religering av vektoren etter kutting kan denne behandles med alkalisk fosfatase, som katalyserer hydrolyse av 5'-fosfatresiduer på ”sticky-ends”. Uten fosfatgruppene vil ikke vektoren religeres, men den kan limeres med DNA-fragmenter som har intakte

fosfatresiduer. Til forsøkene er det brukt Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) (Fermentas). 1 μl CIAP (1U/ μl) tilsettes kuttemiksen direkte og inkuberes på vannbad ved 37 °C i maksimum 30 minutter. Så inaktiveres enzymet ved 85 °C i 15 minutter.

3.1.6 Ligering

Dannelse av fosfodiesterbinding mellom 3'-hydroksyl og 5'-fosfat katalyseres av Bakteriofag T4 DNA-ligase (Fermentas). Egnert buffer følger med fra produsenten. 10x konsentrert T4 DNA-ligase-buffer inneholder 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7.8 ved 25 °C).

Ligeringsblandingen inneholder kuttet og rensert vektor, innskudd i varierende støkiometrisk forhold, ligasebuffer, ATP og T4 DNA-ligase. Reaksjonen kan enten skje ved romtemperatur i 1 time eller over natt ved ca 16 °C.

Oppskrift til ligering

2-4 μl Plasmid (100-200 ng avhengig av konsentrasjon)

5-8 μl Innskudd (30-60 ng avhengig av konsentrasjon)

2 μl T4 DNA ligasebuffer (Fermentas)

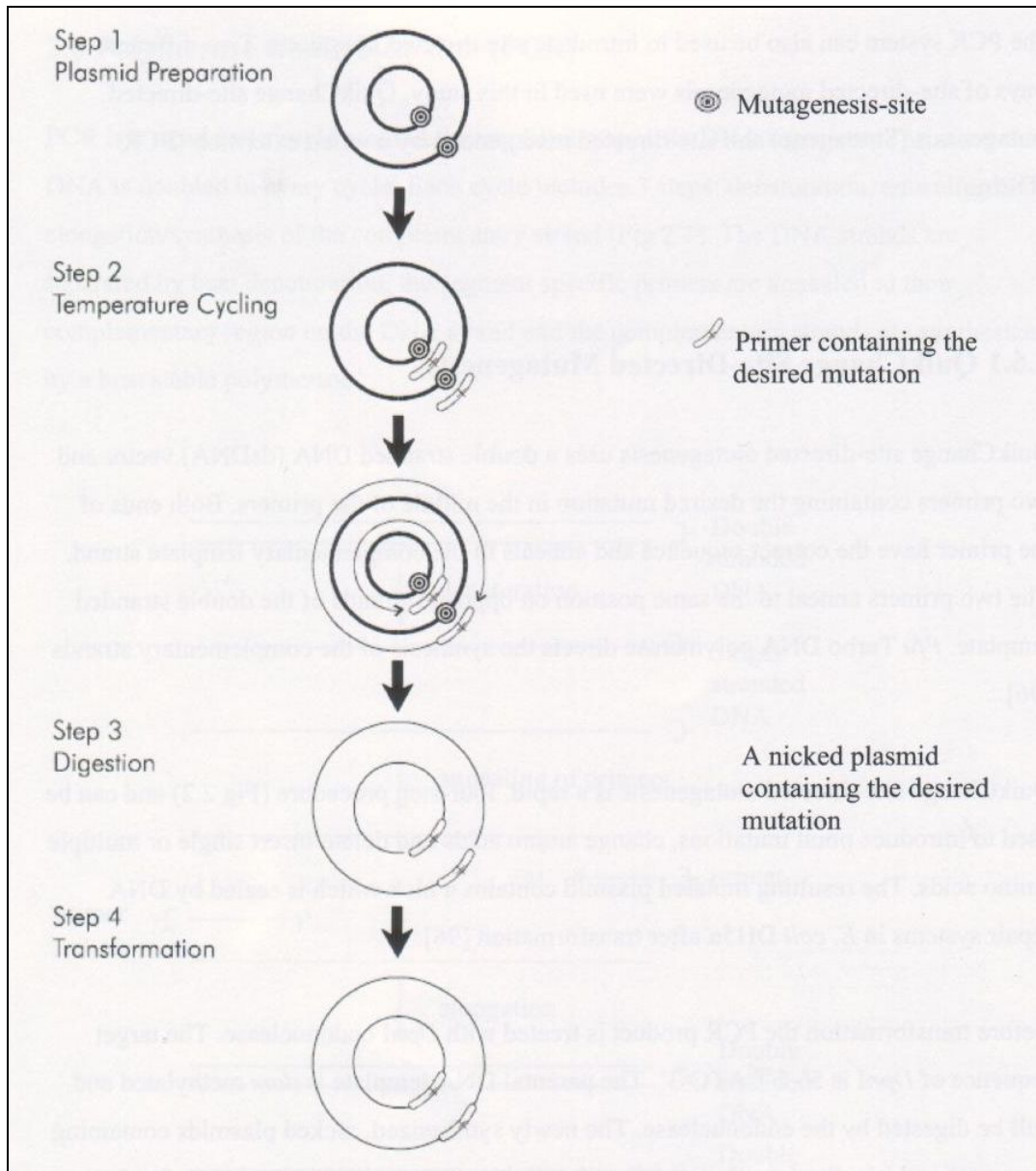
1 μl 5 mM ATP (GE Healthcare)

1 μl T4 DNA-ligase (Fermentas) (1 U/ μl)

dH₂O til sluttvolumen på 20 μl

3.1.7 Sete-dirigert mutagenese

En enkel måte å introdusere punktmutasjoner i dobbeltrådede plasmider er ved å bruke QuickChange kittet fra Stratagene. Metoden benytter seg av en modifisert form for PCR. To primere inneholder den ønskede mutasjonen og er komplementær med hver sin DNA-tråd i plasmidet. I PCR-maskinen vil det syntetiseres lineære kopier av plasmidet med den ønskede mutasjonen (se Figur 3.1).



Figur 3.1: De fire steg i QuickChange-mutageneseprosedyren. 1: Plasmidet klargjøres for mutagenese. 2: Denaturering, annealing av primere med ønsket mutasjon og elongering av plasmidet danner sirkulære tråder med "nick". 3: Restriksjonsendonukleasen *DpnI* fordøyer det originale plasmidet. 4: Transformering og reparasjon av "nick". Figuren er fra Instruction manual, QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene).

Etter PCR-reaksjonen blir PCR-produktet spaltet med restriksjonsenzymet *Dpn I* (Stratagene) som kutter metylert og hemimetylert DNA. Dermed kuttes templatet mens PCR-produktet er urørt. PCR-produktet som inneholder mutasjonen transformeres inn i *Escherichia coli* (se 3.1.12.1) hvor det sirkulæriseres og klones.

Reaksjonsblanding

1-2 μl templat (5-50 ng avhengig av konsentrasjonen)

1,5 μl forward primer (20 pmol/ μl)

1,5 μl reverse primer (20 pmol/ μl)

5 μl 10x *Pfu Turbo* DNA-polymerasebuffer

8 μl av 5 mM dNTP-miks (1,25 mM av hver dNTP)

1 μl *Pfu Turbo* DNA-polymerase (10 U/ μl)

dH₂O til sluttvolumen på 50 μl

Pfu Turbo DNA-polymerasen tilsettes først reaksjonsblandingen etter 2 minutters ”hotstart” ved 95 °C. ”Hotstart” brukes for å inhibere eventuelle proteaser i reaksjonsblandingen.

Reaksjonsblandingen ble kjørt på en PCR cyclus (MJ Research) etter følgende program (Tabell 3.2):

| Segment | Syklus antall | Temperatur | Tid |
|---------|---------------|------------|-----------------------|
| 1 | 1 | 95 °C | 2 min (hotstart) |
| 2 | 16 | 95 °C | 30 sek (denaturering) |
| | | 55 °C | 1 min (annealing) |
| | | 68 °C | 8 min (elongering) |

Tabell 3.2: Parametere for PCR-program for QuickChange sete-dirigert mutagenese.

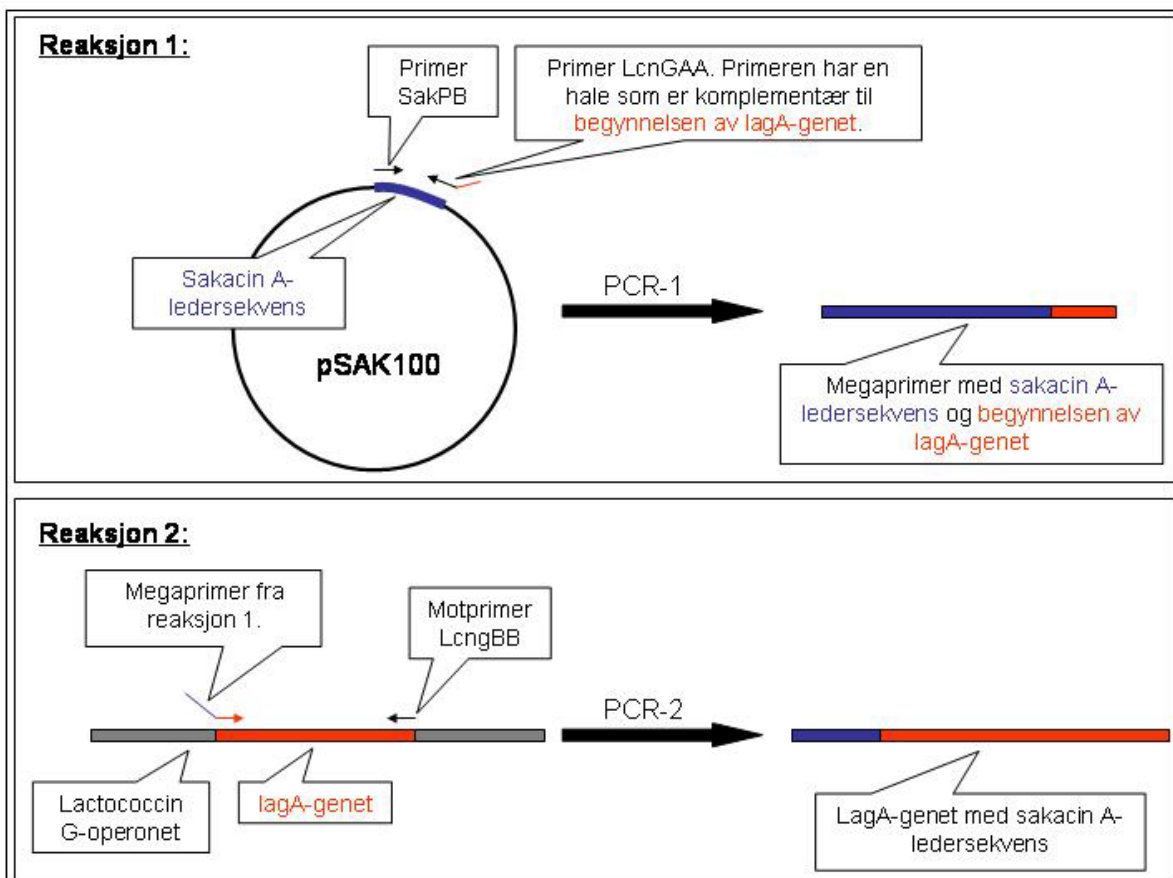
1 μl Dpn I (Stratagene) tilsettes til 50 μl PCR-produkt og inkuberes ved 37 °C i 1 time.

3.1.8 Megaprimermetoden

I megaprimermetoden lages det først et PCR-produkt som etterfølgende brukes som primer i en ny PCR-reaksjon. Metoden er velegnet til å koble et mindre DNA-fragment til et større. I oppgaven brukes den blant annet til å koble sakacin A-ledersekvensen til genet som koder for det modne lactococcin G α - eller β -peptid. I metoden brukes det to PCR-reaksjoner: i den første reaksjonen lages megaprimeren mens i den andre brukes den som primer.

Reaksjon 1: Den ene av primerene i den første reaksjonen er konstruert med en "hale". Denne "halen" har en viktig rolle i reaksjon 2 da den er komplementær til begynnelsen av templatet i reaksjon 2. Under den første PCR-reaksjon amplifiseres det ene av de to DNA-fragmentene man ønsker koblet sammen (se Figur 3.2). Fragmentet som dannes ved den første PCR-reaksjonen er det som kalles en megaprimer.

Reaksjon 2: Megaprimeren laget i reaksjon 1 brukes som den ene av primerene i reaksjon 2. Dette er mulig da megaprimeren har en del av sekvensen til templatet i reaksjon 2 inkorporert ved hjelp av "halen". Resultatet av reaksjon 2 er en sammenkobling av to DNA-fragmenter (se Figur 3.2).



Figur 3.2: Illustrasjon av megaprimermetoden med eksempel fra fusjonen av lactococcin G α -peptidet med sakacin P-ledersekvensen. I første reaksjon amplifiseres sakacin A-ledersekvensen. Primeren LcnGAA har en "hale" som er komplementær til begynnelsen av lactococcin G α -peptidets sekvens. I den andre reaksjonen brukes PCR-fragmentet fra den første reaksjonen som en av primerene (dette fragment kalles en megaprimer). Resultatet av reaksjon 2 er en sammenkopling av sakacin A-ledersekvensen og det strukturelle genet til lactococcin G α -peptidet.

3.1.9 DNA sekvensering

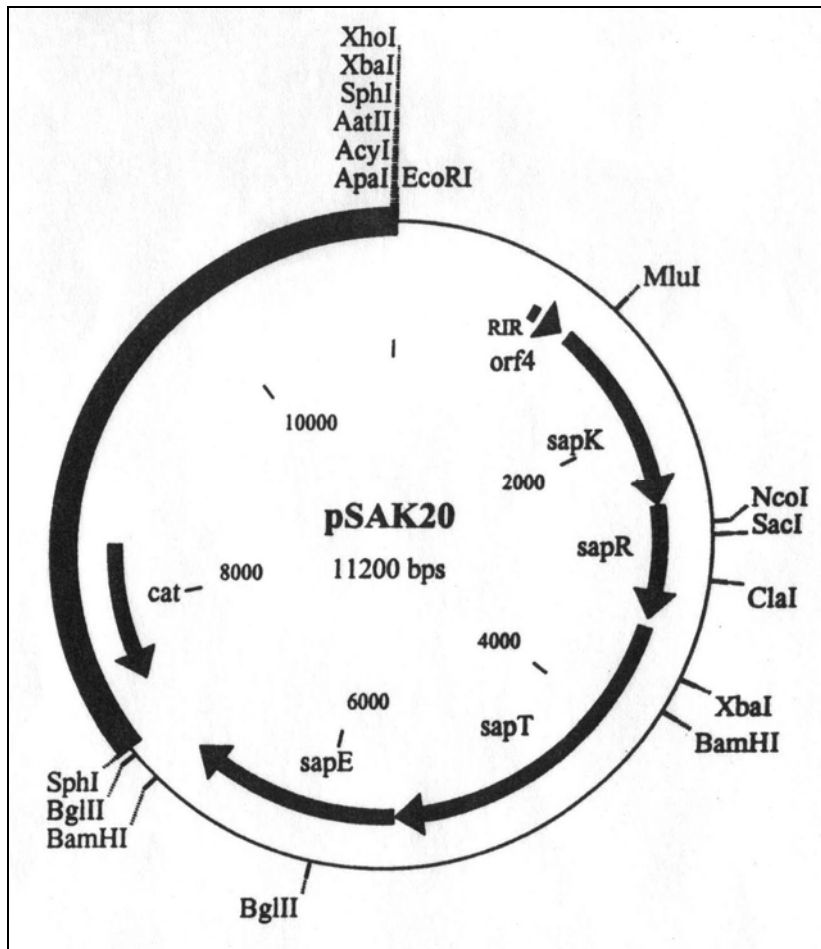
Hver gang et nytt plasmid er konstruert må innsatt innskudd sekvenseres for å være sikker på at sekvensen er riktig. Sekvenseringen i denne oppgaven er utført av Kenneth Weierud på MegaBase Laben ved Institutt for molekylær biovitenskap, Universitetet i Oslo. Reaksjonen som brukes er kjedetermineringsmetoden. Reaksjonsblandingen består av templat (det som skal sekvenseres), oligonukleotider som primere til reaksjonen, dNTP, Klenow DNA-polymerase (en versjon av *E.coli* DNA-polymerase I som mangler 5'-3'-eksonukleaseaktivitet) og en liten mengde dideoksynukleotider (ddNTP). DNA-polymerasen vil inkorporere både dNTP og ddNTP under reaksjonen da den ikke ser forskjell på disse. Kjedeforlengelsen avsluttes når ddNTP inkorporeres da denne ikke har en 3'-hydroksylgruppe å binde neste nukleotid til. Det vil dannes mange DNA-fragmenter med forskjellig lengde som kan separeres ved kapilærelektroforese. Hver ddNTP er merket med ulik fluorofor som kan detekteres av en detektor under elektroforesen.

3.1.10 Protein ekspressjon

3.1.10.1 Plasmidene brukt i oppgaven

pSAK20

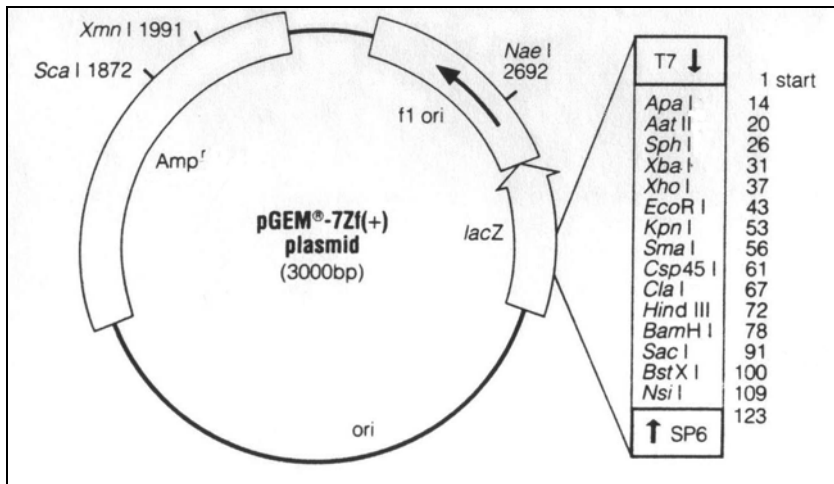
pSAK20 (Se Figur 3.3) er et derivat av pVS2 på 11,2 kb (Axelsson et al., 1998). Der er det strukturelle genet for sakacin A og immunitetsgenet fjernet. Genene som er igjen koder for en histidinkinase, en responsregulator, en ABC-transporter og et accessory-protein. I tillegg inneholder plasmidet et gen for kloramfenicolresistens (Axelsson og Holck, 1995).



Figur 3.3: Plasmidkart av pSAK20 (Skeie, 1997).

pGEM-7Zf(+)

pGEM-7Zf(+) (Promega) (se Figur 3.4) har et lacZ-gen med en polylinker region for blå/hvit-seleksjon på plater tilsatt X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolyl- β -D-galgaktosid) og IPTG (isopropyl- β -D-tiogalactopyranosid). Transformanter med innskudd i pGEM-7Zf(+) vil være hvite på en agarplate tilsatt X-gal og IPTG, mens transformanter uten innskudd er blå. Hvis det ikke er innskudd i plasmidet vil genet lacZ som koder for β -galaktosidase være intakt og det produseres β -galaktosidase. Enzymet vil kutte X-gal og danne produktene β -D-galaktose og 5-bromo-4-kloro-3-hydroksyindol. 5-Bromo-4-kloro-3-hydroksyindol er blått. Plasmidet har et gen for ampisilinresistens og er på 3000 bp.



Figur 3.4: Plasmidkart av pGEM-7Zf(+) (Promega).

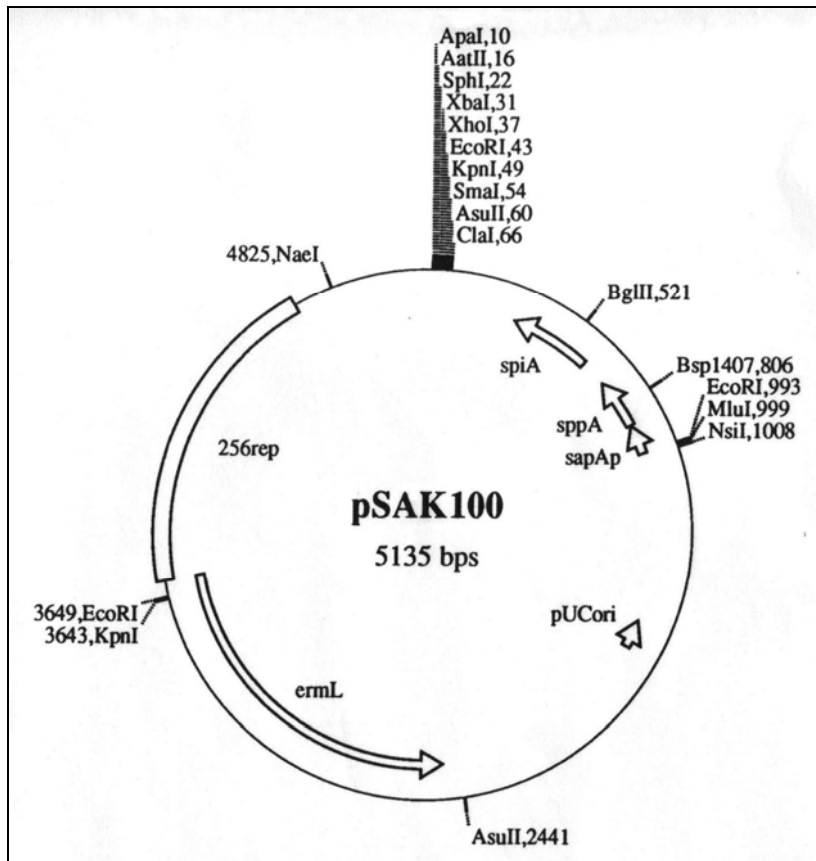
pLPV111

pLPV111 er på 4,2 kb og er et derivat av vektoren pGEM-7Zf(+) (Promega).

Ampicillinresistensgenet er erstattet med erythromycinresistensgenet til *Lactobacillus reuteri*-plasmidet pLUL631 og det er satt inn en replikasjonsenhet fra *Lactobacillus plantarum*-plasmidet p256. pLPV111 har lacZ-polylinkerregionen fra pGEM-7Zf(+) og replikeres både i *Escherichia coli* og i *Lactobacillus* (Axelsson og Holck, 1995).

pSAK100

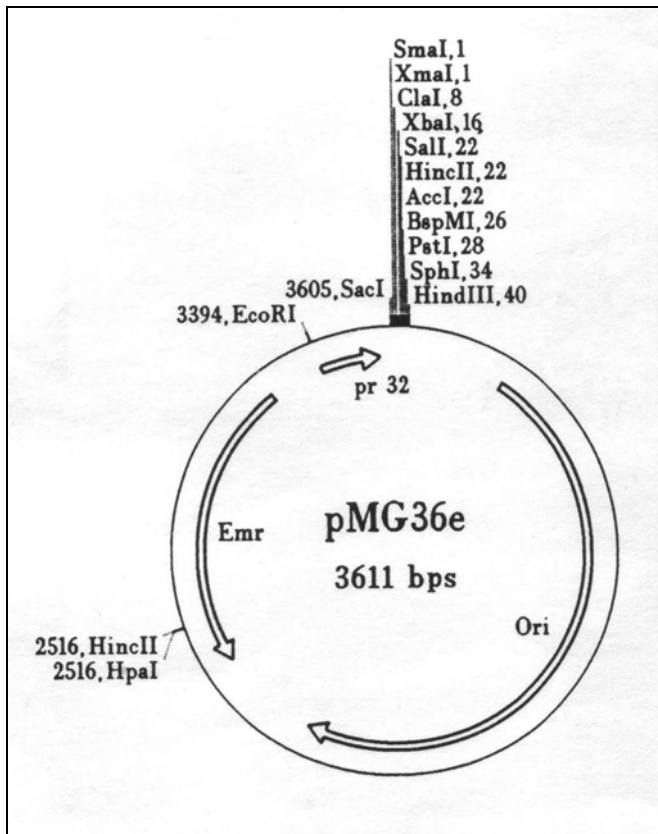
pSAK100 også kallet pSPP2 (se Figur 3.5) er et derivat av pLPV111 (Axelsson og Holck, 1995; Axelsson et al., 1998). Plasmidet er på 5135 bp og inneholder det strukturelle genet for sakacin P (sppA) og sakacin P-immunitetsgenet (spiA) i et operon som kontrolleres av en sakacin A-promoter (sapAp) (Axelsson og Holck, 1995; Axelsson et al., 1998). Promoteren reguleres av de regulatoriske proteinene på pSAK20 (se Figur 3.3). I tillegg inneholder plasmidet et gen som koder for erythromycinresistens (ermL).



Figur 3.5: Plasmidkart av pSAK100 (Skeie, 1997).

pMG36e

pMG36e (se Figur 3.6) er en melkesyrebakterie-*Escherichia coli*-shuttle vektor på 3611 bp (van de Guchte et al., 1989). Den har en sterk, konstitutiv P32-promotor og brukes i oppgaven til å uttrykke immunitetsgenet (lagC) til lactococcin G.



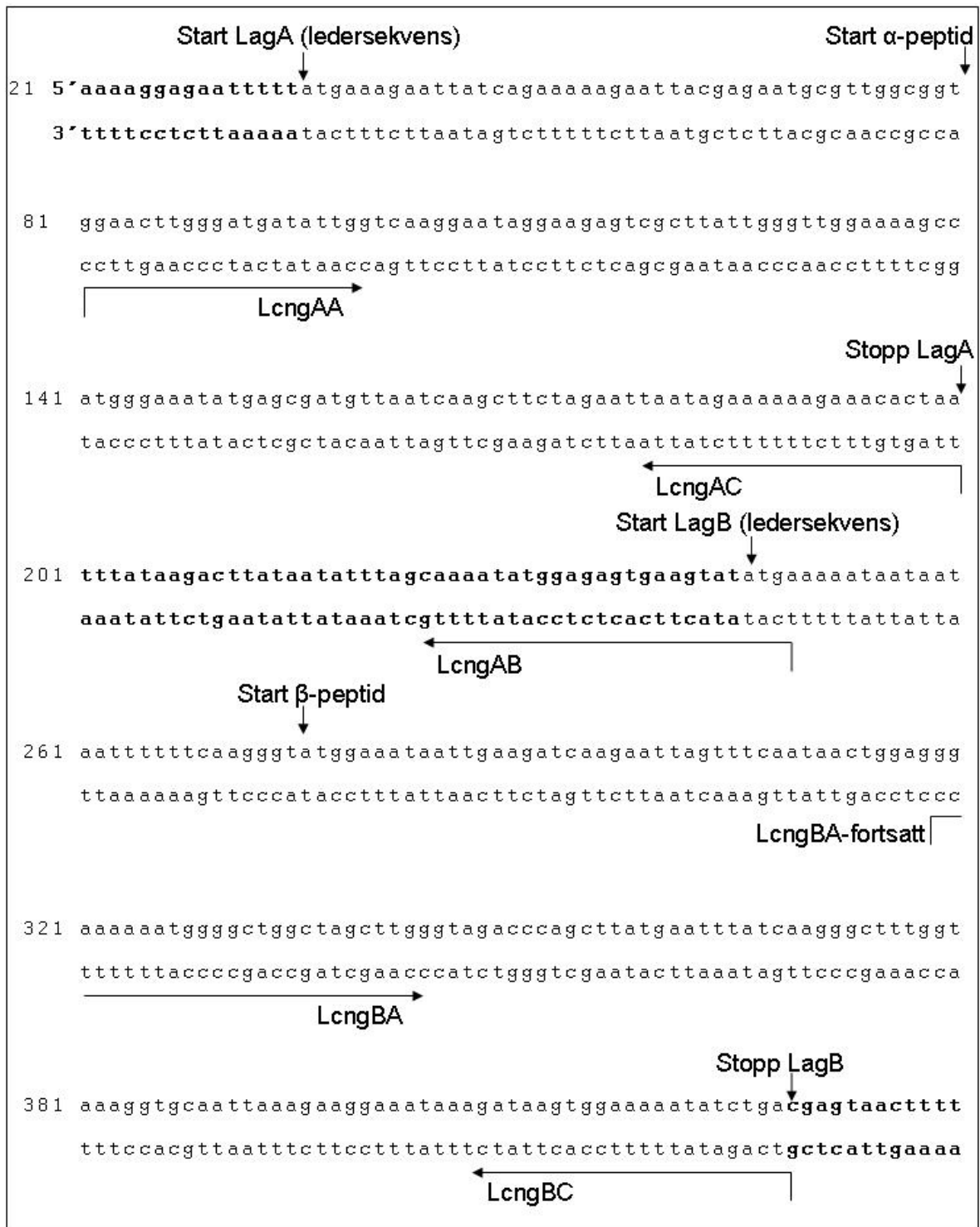
Figur 3.6: Plasmidkart over pMG36e (Skeie, 1997).

3.1.10.2 Primere brukt i oppgaven

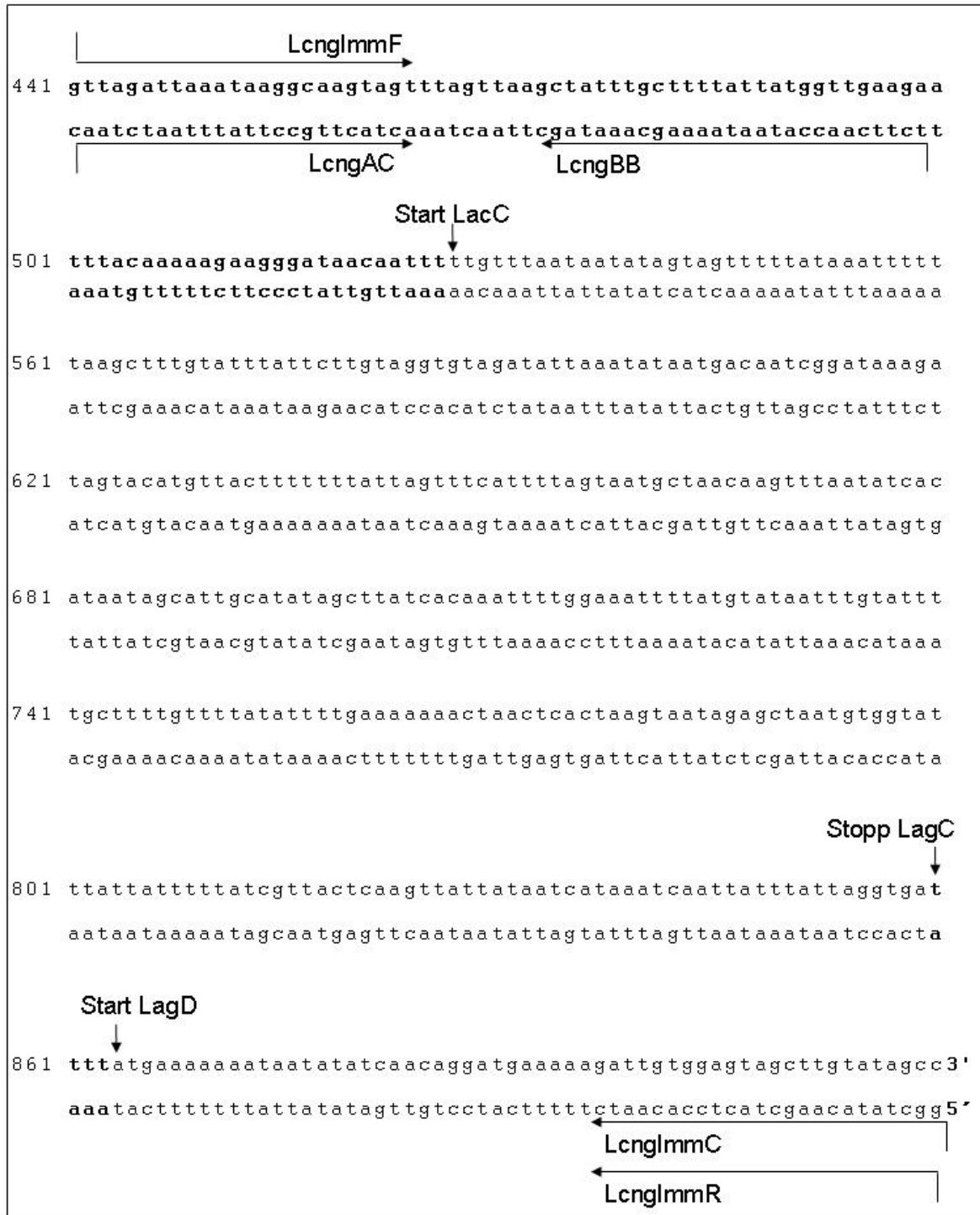
Primerene som ble brukt i oppgaven er syntetisert av Eurogentec, Belgia og vist i Tabell 3.3. Stedene primerene binder seg i lactococcin G-operonet er vist i Figur 3.7.

| | |
|-------------|---|
| SakPB | : 5' -ACA-CTT-TAT-GCT-TCC-GGC-TCG-TAT-GTT-GTG-T-3' |
| LcngAA | : 5' -CAA-TAT-CAT-CCC-AAG-TTC-CTC-CAC-CTG-TAA-TTG-CTG-TTA-CTT-C-3' |
| LcngAB | : 5' -CCA-TCG-ATG-GCA-TAT-ACT-TCA-CTC-TCC-ATA-TTT-TG-3' |
| LcngBA | : 5' -CAA-GCT-AGC-CAG-CCC-CAT-TTT-TTT-CCA-CCT-GTA-ATT-GCT-GTT-ACT-TC-3' |
| LcngBB | : 5' -CCA-TCG-ATG-GCT-TCA-ACC-ATA-ATA-AAA-GCA-AAT-AGC-3' |
| LcngImmF | : 5' -CGG-GAT-CCC-GGT-TAG-ATT-AAA-TAA-GGC-AAG-TAG-3' |
| LcngImmR | : 5' -AAG-AAT-TCC-GCT-ATA-CAA-GCT-ACT-CCA-CAA-TC-3' |
| LcngAC | : 5' -CTA-CTT-GCC-TTA-TTT-AAT-CTA-ACT-TAG-TGT-TTC-TTT-TTT-CTA-TTA-3' |
| LcngBC | : 5' -CTA-CTT-GCC-TTA-TTT-AAT-CTA-ACT-CAG-ATA-TTT-TTC-CAC-TTA-TC-3' |
| LcngImmC | : 5' -CCA-TCG-ATG-GCT-ATA-CAA-GCT-ACT-CCA-CAA-TC-3' |
| LcngαD7GF | : 5' -GGA-ACT-TGG-GAT-GAT-ATT-GGT-CAA-GGA-ATA-GGA-AG-3' |
| LcngαD7GR | : 5' -CTT-CCT-ATT-CCT-TGA-CCA-ATA-TCA-TCC-CAA-GTT-CC-3' |
| LcngβstoppF | : 5' -GCT-GGC-TAG-CTT-GGG-TAG-ACC-CAG-CTT-ATG-3' |
| LcngβstoppR | : 5' -CAT-AAG-CTG-GGT-CTA-CCC-AAG-CTA-GCC-AGC-3' |

Tabell 3.3: Oversikt over primere brukt i oppgaven.



Figur 3.7: Utdrag av *lactococcal* G-operonet. Genene *LagA*, *LagB*, *LagC* og begynnelsen på *LagD* er uthøvet og start og slutt på disse genene er indikert med små piler. Plassering av en del av primerene brukt i plasmidkonstruksjonen er vist med horisontale piler. Se Tabell 3.3 for sekvensene til primerene. Figuren forsettes på neste side.



Fortsettelse av Figur 3.7.

3.1.10.3 Bakteriosinekspressjon

Ekspressjonssystemet som brukes til heterolog ekspressjon av lactococcin G-peptidene er laget av Lars Axelsson med flere ved Matforsk på Ås (Axelsson *et al.*, 1998). Det baserer

seg på to plasmider som introduseres i en *Lactobacillus sake* Lb790 som ikke selv produserer bakteriosiner. Det ene plasmidet pSAK20 (se Figur 3.3) inneholder genene som er nødvendige for transkripsjonell aktivering av en sakacin A-promotor og sekresjon og prosessering av det umodne bakteriosin (en histidinkinase, en responsregulator, en ABC-transporter og et accessory-protein). Det andre plasmidet (et pLPV111-derivat som for eksempel pSAK100 (se Figur 3.5)) inneholder genene som koder for bakteriosinet man ønsker å uttrykke. Både bakteriosingenet og immunitetsgenet utgjør et operon og er da under kontroll av sakacin A-promotoren.

Til ekspressjon av lactococcin G-immunitetsproteinet brukes vektoren pMG36e. Plasmidet med immunitetsgenet som innskudd transformeres inn i en lactococcin G-følsom bakterie hvor genet blir uttrykt konstitutivt.

3.1.11 Bakteriekultivering

De forskjellige bakterietypene krever forskjellige vekstbetingelser. Til *Escherichia coli* brukes Luria-Bertani medie (LB) og bakteriene vokser opp til stasjonær fase i løpet av ca 12 timer etter inokulasjon ved 37 °C i en risteinkubator. *Lactobacillus* vokser i de man, Rogosa, Sharpe medie (MRS) ved 30 °C uten risting. Etter ca 16 timer har de nådd stasjonær fase. *Lactococcus* bruker samme tid og temperatur som *Lactobacillus* men bruker GM17-medie i stedet.

3.1.11.1 Vekstmedier

Luria-Bertani-medium (LB) til *Escherichia coli*

10 g NaCl (Sigma)

10 g Peptone (Mikrobiologie)

5 g Gjærekstrakt (Mikrobiologie)

dH₂O til 1 l

Autoklaveres ved 121 °C i 20 minutter.

LA-skåler til *Escherichia coli*

15 g Agar (Mikrobiologie) til 1 l LB-medium

Autoklaveres ved 121 °C i 20 minutter.

De man, Rogosa, Sharpe-medie (MRS) til *Lactobacillus*

52 g MRS (Oxoid) tilsettes dH₂O til 1 L

Autoklaveres ved 110 °C i 12 minutter.

Økes tiden eller temperaturen over dette blir mediet mørkere og bakteriene vokser dårligere.

Det samme gjelder GM17-medie.

GM17-medium til *Lactococcus*

37,25 g M17 (Oxoid) tilsettes 0,1 % (vol/vol) tween (Sigma) og dH₂O til 1 L

Autoklaveres ved 110 °C i 12 minutter.

Steril glukose (BDH) tilsettes slik at sluttkonsentrasjonen blir 0,4 % (vol/vol).

3.1.12 Tillaging av kompetente celler og transformering

Med transformering menes introduksjon av fremmed DNA i en bakeriecelle. Bakteriene må gjennomgå en behandling for å øke mulighetene for opptak av plasmid. *Escherichia coli* behandles først med kald CaCl₂ og under selve transformeringen med forskjellige temperaturer. Til melkesyrebakteriene brukes det elektroporering. En kraftig strømpuls sendes gjennom en kuvette med cellene og plasmidet. Strømmen vil lage huller i cellemembranen slik at plasmidene kan trenge inn i cellene.

I oppgaven brukes *Escherichia coli* til kloningsforsøkene for å konstruere de ønskede plasmidene fordi disse bakteriene er enkle å transformere og arbeide med. Til ekspressjon av bakteriosiner brukes melkesyrebakterien, *Lactobacillus sake* Lb790. Til ekspressjon av immunitetsproteinet brukes *Lactococcus lactis* IL1403.

3.1.12.1 *Escherichia coli*

Stammene DH5α og TB1 ble brukt til transformeringene.

Kjemokompetente *Escherichia coli*

LB-medie inokuleres med celler og står på risteinkubator ved 37 °C over natten. 0,5 ml av kulturen overføres til 25 ml frisk LB-medie og står i risteinkubatoren til OD₆₁₀ er ca 0,3.

Kulturen kjøles på is og sentrifugeres i en Beckman Avanti J-25 sentrifuge med JA-25,50

rotor ved 5000 rpm ved 4 °C i 10 minutter. Cellepelleten resuspenderes i 5 ml kald 0,1 M CaCl₂ (Merck) og står ytterligere 5 minutter på is. Kulturen sentrifugeres på nytt ved 5000 rpm ved 4 °C i 10 minutter og cellepelleten resuspenderes i 1 ml kald 0,1 M CaCl₂ tilsatt 15 % glycerol (Norsk Medisinaldepot). Cellene står minimum 30 minutter på is før de fordeles på eppendorfrør. Cellene kan da brukes til transformering med en gang eller oppbevares ved -80 °C til senere bruk.

Transformering av *Escherichia coli*

Cellene tines på is hvis de har vært frosset. 1-5 µl plasmid-DNA fra miniprep tilsettes 50 µl kjemokompetente celler og de står på is i 30 minutter. Derneft overføres eppendorfrøret til et vannbad på 42 °C i nøyaktig 90 sekunder. Røres kjøles straks ned på is hvor noen av bakteriene tar opp et plasmid. Når cellene er avkjølt tilsettes de LB-medie til 1 ml og de inkuberes ved 37 °C i 45-60 minutter. De fordeles på LA-plater tilsatt antibiotika og inkuberes ved 37 °C over natten. Neste dag er det grodd opp kolonier som kan plukkes og overføres til LB-medie tilsatt antibiotika.

3.1.12.2 Melkesyrebakterier

Lactococcus og *Lactobacillus* har hver sin prosedyre for å bli kompetente for elektroporering (Holo et al., 1995; Aukrust et al., 1995). Oppskriftene er optimalisert med hensyn til hvilke stammer som brukes. Høy glycin-konsentrasjon i mediet hemmer dannelse av cellevegg. Ved elektroporering er det ønskelig med en tynn cellevegg da DNA da lettere vil kunne trenge inn i cellen. For å få mest mulig kompetente celler, bruker man derfor så høy glycin-konsentrasjon som mulig uten at cellene dør av det. Ved å starte med 2-3 kulturer samtidig med ulik glycin-konsentrasjon er man sikker på at hvis det ikke er vekst i kulturen med høyst glycin-konsentrasjon, kan man fortsette med den andre kulturen uten å måtte utsette forsøket til neste dag.

Medier brukt ved elektroporering av melkesyrebakterier

Ved elektroporering av *Lactobacillus* og *Lactococcus* brukes det medier tilsatt osmotiske stabilisatorer (Sukrose, Mg²⁺ og Ca²⁺).

MRSSM til Lactobacillus

MRS tilsatt 952 mM sukrose (BDH) og 3,5 mM MgCl₂.

SGM17 til Lactococcus

GM17 tilsatt 0,5 M sukrose (BDH).

SGM17MC til Lactococcus

SGM17 tilsatt 20 mM MgCl₂ (AppliChem) og 2 mM CaCl₂ (Merck).

Agarskåler som brukes ved elektroporering av melkesyrebakterier*MRS-agarskåler til Lactobacillus*

MRS tilsatt 15 g/l agar (Mikrobiologie).

Autoklaveres ved 110 °C i 12 minutter.

BSR-skåler til Lactococcus

10 g Trypton (Mikrobiologie)

5 g Gjærekstrakt (Mikrobiologie)

200 g Sukrose (BDH)

10 g Glukose (BDH)

25 g Gelatin (KEBO Lab)

0,51 g MgCl₂ (AppliChem)

0,37 g CaCl₂ (Merck)

19 g Dinatrium β-glycerofosfat (Merck)

dH₂O til 1 liter.

Når pulveret er løst tilsettes det 15 g Agar (Microbiologie)

Autoklaveres ved 121 °C i 15 minutter

Avkjøles og tilsettes 2 µg/ml erythromycin (Sigma) før løsningen helles i skåler.

Tillaging av elektrokompetente *Lactobacillus*

Prosedyren er en modifisert utgave av prosedyren beskrevet i Electroporation Protocols for Microorganisms (Aukrust et al., 1995). Den ble brukt på *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20.

Lactobacillus sake Lb790/pSAK20 inneholder plasmidet pSAK20 og for at de skal beholde det må de vokse med kloramphenicol (CAM) (Sigma) i mediet. Det lages en forkultur i MRS (CAM 10 µg/ml). Denne brukes da til å pøde en ny kultur som skal vokse i MRS tilsatt glycin (Merck).

MRS med 2,0 % eller 2,5 % glycin og 10 µg/ml CAM tilsettes celler fra forkulturen slik at OD₆₁₀ blir 0,10. Kulturen inkuberes ved 30 °C til OD₆₁₀ er 0,6. Det tar 4-6 timer.

Cellene høstes i Beckman Avanti J-25 sentrifuge med JA-25,50 rotor ved 5000 rpm i 7 minutter ved 4 °C. Supernatanten dekanteres fra og cellepellet resuspenderes og vaskes med 100 ml 1 mM kald MgCl₂ (Merck).

Løsningen sentrifugeres ved 6500 rpm i 10 minutter ved 4 °C og cellepelleten resuspenderes og vaskes med 100 ml kald 30 % polyetylen glykol (PEG) 1500 (Merck) (Molekylmasse 1400-1600 g/mol).

Løsningen sentrifugeres ved 6500 rpm i 10 minutter ved 4 °C og pelleten løses i 1 ml kald 30 % PEG. Løsningen fordeles i sterile eppendorfrør. Bakteriene er nå klare til elektroporering med en gang eller de kan lagres ved -80 °C til senere bruk.

Elektroporering av *Lactobacillus*

Det brukes *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20.

Cellene tines på is hvis de har vært frosset. 50 µl celler tilsettes 1-2 µl plasmid fra miniprep og de står i ett minutt på is. Løsningen overføres til en steril 2 mm elektroporeringskuvette og elektroporeres ved 1,5 kV, 25 µF og 400 Ω på en Bio-Rad Genepulser. Dette gir en tidskonstant på 9,0 – 9,5 ms.

Det tilsettes 950 µl MRSSM og inkuberes ved 30 °C i 2 timer. Derneft ble cellene platet ut på MRS agarplater med erythromycin (Erm) 2 µg/ml (Sigma) og CAM 5 µg/ml (Sigma). De inkuberes ved 30 °C i 2 døgn og transformanter plukkes og overføres til MRS medie med Erm 10 µg/ml og CAM 10 µg/ml eller Erm 10 µg/ml. Kulturrørene inkuberes ved 30 °C over natten.

Tillaging av elektrokompetente *Lactococcus*

Prosedyren er fra Electroporation Protocols for Microorganisms (Holo et al., 1995) og ble brukt på *Lactococcus lactis* IL1403.

Forkultur lages ved å dyrke *Lactococcus lactis* IL1403 i GM17 over natten ved 30 °C.

Cellene fortynnes i ny GM17 og dyrkes ved 30 °C til OD₆₁₀ er mellom 0,5 og 0,8. Derneft fortynnes de 100 ganger i SGM17 med 1 % glycin. Denne kulturen dyrkes i 12–16 timer til

OD₆₁₀ er 0,2 -0,7 og cellene høstes i en Beckman Avanti J-25 sentrifuge med JA-25,50 rotor ved 6000 rpm ved 4 °C i 10 minutter.

Cellene resuspenderes og vaskes med 100 ml kald 0,5 M sukrose (BDH) tilsatt 10 % glyserol (Norsk Medisinaldepot). De sentrifugeres deretter ved 7000 rpm ved 4 °C i 10 minutter. Så gjentas vaskingen.

Cellepelleten løses i 0,5 M sukrose tilsatt 10 % glyserol (Norsk Medisinaldepot). Mengden det løses i tilsvarer 1/100 av startkulturen. Cellene fordeles i eppendorfrør. De er nå klar til elektroporering eller de kan oppbevares ved – 80 °C til senere bruk.

Elektroporering av *Lactococcus*

Det brukes elektrokompetente *Lactococcus lactis* IL1403

Cellene tines på is hvis de har vært frosset og 40 µl celleløsning blandes med 1-2 µl DNA fra miniprep. Løsningen overføres til en 2 mm elektroporeringskuvette og de elektroporeres ved 2,0 kV, 25 µF og 200 Ω med Bio-Rad Genepulser. Tidskonstanten bør da bli 4-5 ms. Cellene tilsettes 960 µl kald SGM17MC og inkuberes ved 30 °C i 2 timer. Dernest utplates cellene på BSR-plater med Erm 2 µg/ml (Sigma) og inkuberes ved 30 °C i opp til 3 døgn. Kolonier plukkes og overføres til GM17 med Erm 5 µg/ml.

3.2 Proteinrensing

To rensemetoder (Nieto Lozano et al., 1992; Uteng et al., 2002) er testet i oppgaven for å sammenligne dem med hensyn til rensing av lactococcin G. Rensemetsodene benevnes i denne oppgaven gammel rensesprosedyre (Nieto Lozano et al., 1992) og ny rensesprosedyre (Uteng et al., 2002). Den nye rensesprosedyren bygger på den gamle rensesprosedyre, men felling med ammoniumsulfat og hydrofob interaksjonskromatografi er utelukket. Dermed spares mye tid.

3.2.1 Kromatografi

Forskjellige proteiner forventes å være forskjellige med hensyn på ladning, hydrofobisitet, ligandbindingsegenskaper, isoelektrisk punkt og størrelse. Disse egenskapene kan utnyttes til

å separere de forskjellige proteinene fra hverandre og andre stoffer i løsningen. En kromatografikolonne inneholder et porøst materiale som kalles en matriks. Til kolonnen tilsettes en løsning av stoffene som ønskes separert. Løsningen kalles den mobile fasen. Når den mobile fasen beveger seg gjennom kolonnen interagerer enkeltkomponentene i den mobile fasen med matiksen på en måte som varierer med egenskapene til stoffene. Matriksen har den egenskap at den forsinker vandringshastigheten til stoffene i den mobile fasen i varierende grad, inntil blandingen til slutt er delt i bånd med rene stoffer. I oppgaven brukes tre forskjellige kolonnekromatografimetoder. Ionebytter kromatografi som bruker ladning til å separere peptider, hydrofobinteraksjonskromatografi som bruker hydrofobe sidekjeder og reversfasekromatografi som benytter seg av peptidenes hydrofobe egenskaper.

3.2.1.1 Ionebytterkromatografi

En ionebytterkolonne kan separere proteiner basert på deres ladning. Den stasjonære fasen består av et bæremateriale med positivt eller negativt ladde sidekjeder. Et protein med motsatt nettoladning i forhold til den stasjonære fasen vil bindes til kolonnen mens proteiner med samme ladning vil renne gjennom kolonnen. Ved hjelp av pH kan man variere proteinenes ladning slik at de binder seg til kolonnen. De bundne proteiner kan elueres ved å øke saltkonsentrasjonen.

I oppgaven er det brukt kationbyttieren SP-Sepharose FastFlow (GE Healthcare) som binder de positivt ladede bakteriosinene. SP-Sepharose FastFlow har sulfopropylgrupper som sidekjeder.

3.2.1.2 Hydrofobinteraksjonskromatografi

Den stasjonære fasen i kolonnen har bundet hydrofobe sidekjeder som oktyl- eller fenylgrupper. Proteiner med mange hydrofobe sidekjeder på overflaten vil bindes sterkest til kolonnen. De elueres ved å redusere polariteten ved foreksempelvis å bruke en buffer med redusert saltkonsentrasjon og ofte ved ikke-denaturerende betingelser.

I oppgaven er det brukt Octyl Sepharose CL-4B (GE Healthcare) som kolonnemateriale.

3.2.1.3 Reversfasekromatografi

Metoden skiller proteiner med ulik hydrofob karakter under denaturerende betingelser.

Metoden kalles reversfasekromatografi da fasene er byttet om i forhold til andre kromatografimetoder, slik at den stasjonære fasen er upolar mens den mobile fasen er polar. Den stasjonære væskefasens polaritet kan varieres med karbonkjedelengde og type og antall substituenten bundet til bærematerialet. Peptidet tilsettes i et polart løsningsmiddel og elueres igjen ved å senke den mobile fasens polaritet. Polare peptider elueres før upolare peptider.

Reversfasekolonnen som benyttes i oppgaven er en Resource RPC kolonne (GE Healthcare) som består av polyeterketoner og er tilknyttet FPLC systemet. Først er kolonnen ekvilibert med 5 % 2-propanol og 0,1 % TFA i destillert vann. Bakteriosinene elueres med en økende 2-propanolgradient. I tillegg er bakteriosinene tilsatt 0,1 % TFA for å gjøre de mer hydrofobe og dermed øke bindingen til kolonnen.

3.2.2 SMART- OG FPLC-systemene

FPLC-systemet (GE Healthcare) er velegnet til preparative formål og er i oppgaven brukt som en del av bakteriosinrensingen. SMART-systemet er velegnet til mikropreparative og analytiske formål da det kan separere og rense fraksjoner på ned til 5 µl med proteinmengder i nanogram. I oppgaven ble SMART-systemet brukt til å teste renheten av en rensset prøve.

Til FPLC- og SMART-systemet brukes samme parametre. Kolonnen ekvilibres med 0,1 % TFA før applisering og peptidene elueres med en kontinuerlig økende 2-propanolgradient. Kolonnen som brukes til FPLC-systemet er en Resource reversfasekolonne (GE Healthcare) mens det til SMART-systemet brukes en µRCP C2/C18 SC2, 1/10-kolonne (GE Healthcare).

3.2.3 Renseprosedyrer

3.2.3.1 Gammel renseprosedyre

Renseprosedyren er hentet fra (Nieto Lozano et al., 1992)

Buffere:

Buffer A: 20 mM natriumfosfat med pH 6 (2,49 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck) og 0,27 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck)).

Buffer B: Buffer A + 1 M NaCl (Sigma).

Buffer C: Buffer A + 10 % (vekt/vol) ammoniumsulfat (Sigma).

Buffer D: 30 % (vol/vol) buffer A og 70 % (vol/vol) etanol (Arkus Produkter AS).

Del 1:

1 liter kultur dyrkes til stasjonær fase og cellene pelletteres ved 6000 rpm (JA-14 rotor (Beckman)) i 15 minutter ved 4 °C. Supernatanten tilsettes ammoniumsulfat til 40 % (vekt/vol) som løses. Blandingen står ved 4 °C i 15 minutter for utfelling. Løsningen sentrifugeres ved 8000 rpm (JA-14 rotor (Beckman)) ved 4 °C i 20 minutter. Bunnfallet med bakteriosinet løses i buffer A (75 ml buffer per 400 ml kultur) og helles på en kationbytterkolonne. Kolonnen består av 6 ml SP-Sepharose FastFlow (GE Healthcare) ekvilibrert med buffer A. Kolonnen vaskes med 100 ml buffer A for å fjerne uspesifikt bundet materiale. For andre bakteriosiner kan det lønne seg å vaske med buffer A tilsatt 0,1-0,2 M NaCl, men noe lactococcin G vil da elueres (se 4.1.3.2). Bakteriosinet elueres med 40 ml buffer B. Eluatet tilsettes ammoniumsulfat til 10 % (vekt/vol) og appliseres på 2 ml Octyl Sepharose CL-4B (GE Healthcare) hydrofob interaksjonskolonne. Kolonnen er på forhånd vasket med rektifisert sprit for å fjerne partikulert materiale og deretter ekvilibrert med buffer C. Etter applisering av eluatet fra kationbytteren vaskes kolonnen med 10 ml buffer A og bakteriosinet elueres med 10 ml buffer D.

Del 2:

Eluatet fortynnes i vann med 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) til 50 ml og appliseres på Resource reversfasekolonnen på FPLC-systemet (GE Healthcare). Bakteriosinet elueres med en linjær gradient fra 12-50 % 2-propanol med 0,1 % TFA. Flow-hastighet ved eluering settes til 0,5 ml pr. minutt.

3.2.3.2 Ny renseprosedyre

Renseprosedyren er publisert i (Uteng et al., 2002).

Del 1:

1 liter kultur i stasjonær fase helles direkte på en 6 ml SP-Sepharose FastFlow (GE Healthcare) kationbytterkolonne. Dermed utgår to sentrifugeringer (cellepelletering og

ammoniumsulfatfelling) i fra gammel renseprosedyre. Kolonnen vaskes med 100 ml buffer A før bakteriosinet elueres med 40 ml buffer B. Eluatet sentrifugeres ved 6000 rpm i 10 minutter ved 4 °C for å fjerne bakterierester slik at ikke reversfasekolonnen ødelegges under applisering.

Del 2:

Som ved gammel renseprosedyre.

3.3 Kvantifiseringsmetoder

3.3.1 Bestemmelse av bakteriosinkonsentrasjon

For å bestemme bakteriosinkonsentrasjonen måles absorbansen ved 280 nm. Ved hjelp av en beregnet ekstinksjonskoeffisient (ϵ) kan konsentrasjonen finnes. Dette krever at prøven er ren.

$c = A_{280}/(\epsilon_{280} \times l)$ hvor c er peptidkonsentrasjonen i M, ϵ er ekstinksjonskoeffisienten for det aktuelle bakteriosin i $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ og l er lysveien (1 cm).

Ekstinksjonskoeffisientene for lactococcin G er $1,3 \times 10^4 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for α -peptidet og $2,4 \times 10^4 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for β -peptidet (Nissen-Meyer et al., 1992). Molekylmasse for α -peptidet er 4346 Dalton og for β -peptidet 4110 Dalton (Nissen-Meyer et al., 1992).

3.3.2 Aktivitetsmålinger

Bakteriosinaktivitet i en løsning bestemmes ved hjelp av et mikrotiterplatebasert assay. Det brukes ELISA-plater med 8 x 12 brønner. Først tilsettes alle brønnene på platen 50 μl bakteriemedie. I brønnene i brønnrad 1 tilsettes maks 50 μl av bakteriosinet, man vil måle aktiviteten til, og brønnene tilsettes om nødvendig mer medie slik at alle brønnene i brønnrad 1 inneholder 100 μl . Innholdet i brønnene i brønnrad 1 blandes og 50 μl overføres til brønnrad 2. Innholdet i brønnene i brønnrad 2 blandes og 50 μl overføres til brønnrad 3. Slik forsettes det til brettet er ferdig. Da vil man sitte igjen med en fortynningsgradient, hvor hver brønnrad inneholder halvparten så mye bakteriosin som den forrige brønnrad. Alle brønnene tilsettes så 150 μl indikatorkultur slik at sluttvolumet blir 200 μl . Indikatoren skal være en bakterie som er følsom mot bakteriosinet. Denne fortynnes fra en kultur til OD_{610} er

på ca 0,01-0,1. ELISA-platene plasseres i varmeskap til indikatorkulturen har vokst til absorbans ca 0,3-0,4. Dette tar 4-14 timer avhengig av indikatoren og fortynningsgraden. Absorbansen avleses på en mikrotiterplateleser (MR700 Microplate Reader, Dynatech). Der hvor bakteriosinkonsentrasjonen er lav vil indikatoren gro opp og der hvor den er høy vil det ikke være cellevekst. Målet er å bestemme den mengden bakteriosinløsning, som skal til for å hemme veksten 50 %. Ut fra denne verdien kan bakteriosinaktiviteten beregnes.

Måling av bakteriosinimmunitet

Til måling av bakteriosinimmunitet brukes samme type aktivitetsmåling, men indikatororganismen har fått innsatt et plasmid som koder for et bakteriosinimmunitetsgen.

Bestemmelse av bakteriosinmengde i kultur

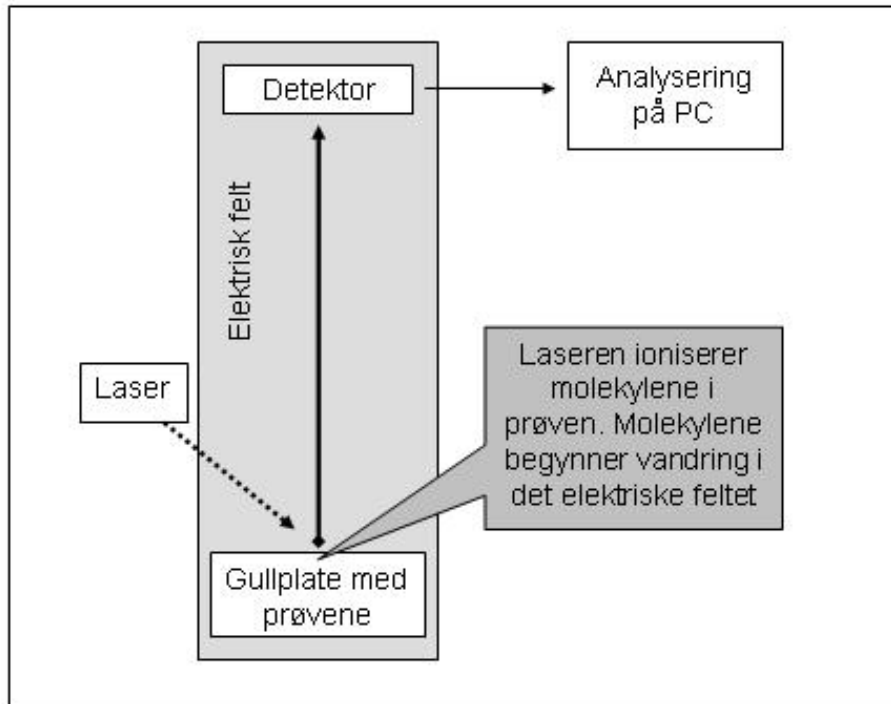
Ved mengdebestemmelse av bakteriosinproduksjon brukes 2 ELISA-plater. Den ene platen tilsettes rensed bakteriosin med kjent konsentrasjonen. Den andre tilsettes cellefri supernatant fra kulturen man ønsker å kjenne bakteriosinkonsentrasjonen til. Ved å sammenlikne utslagene på de 2 ELISA-platene kan konsentrasjonen i den ukjente løsningen beregnes. Ved 2-peptid bakteriosiner tilsettes det komplementere peptidet sammen med indikatoren. Det komplementere peptidet tilsettes i stort overskudd, slik det ikke er en begrensende faktor.

3.3.3 MALDI-TOF Massespektrometri

I oppgaven brukes det et MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight) massespektrometer av typen Voyager-DE RP. Massespektrometri (MS) brukes til å verifisere molekylvekten til det rensede peptidet.

Massespektrometret består av 3 deler. En ioniseringskilde, en masseanalysator og en detektor. Prøven blandes med en lavmolekylær, UV-absorberende matriks, som består av 10 mg/ml av α -cyano-hydroxy-cinnamic acid i 50 % (vol/vol) acetonitril i vann tilsatt 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA). 1 μ l prøve blandes med 1 μ l matriks når den appliseres på prøveplaten. Prøvene tørkes og platen settes inn i massespektrometret. Prøven bestråles med en laser og matriksen absorberer UV-stråling fra laseren. Matriksen overfører den absorberte energi til peptidene, hvilket fører til en ionisering av peptidene og de slynges ut fra matriksen. Etter en gitt tid, for eksempel 100 nanosekunder, utsettes peptidene for et elektrisk felt. Peptidene akselereres gjennom et rør med vakuum med en detektor i den andre

enden (se Figur 3.8). Tiden fra det elektriske feltet slås på til molekylene treffer detektoren i den andre enden av røret måles ("time of flight" – TOF) og brukes da til å beregne molekylvekten ved hjelp av relasjonen mellom energi, masse og hastighet. De fleste av molekylene vil få en ladning tilført av ioniseringskilden, men de kan også få flere ladninger. Søstertoppen med halv molekylvekt stammer fra peptider som har fått to ladninger tilført i stedet for en.



Figur 3.8: Skjematisk skisse av massespektrometer. Figuren er lånt av Maia Kazazic.

4. Resultater og diskusjon

4.1 Produksjon av lactococcin G-peptidene

Det ble konstruert fem nye ekspressjonsplasmider. Fire av disse ble konstruert til heterolog ekspressjon av α - og β -lactococcin G-peptidene, og er navngitt pLT100, pLT101, pLT200 og pLT201. Det femte plasmidet, pLT300, er omtalt senere (se 4.2). pLT100 og pLT101 inneholder lagA-genet (som koder for α -peptidet) mens pLT200 og pLT201 inneholder lagB-genet (som koder for β -peptidet) (se Tabell 4.1). pLT100 og pLT200 er i tillegg til bakteriosingenet også tilført lagC-genet (som koder for det formodede immunitetsprotein) for å undersøke nødvendigheten av å ha dette tilstede for ekspressjon av lactococcin G-peptidene. Grunnlaget for de fire plasmidene nevnt over er plasmidet pLPV111 (se 3.1.10.1). pLPV111 er en del av bakteriosinekspressjonssystemet laget av Axelsson med flere (se 3.1.10.3).

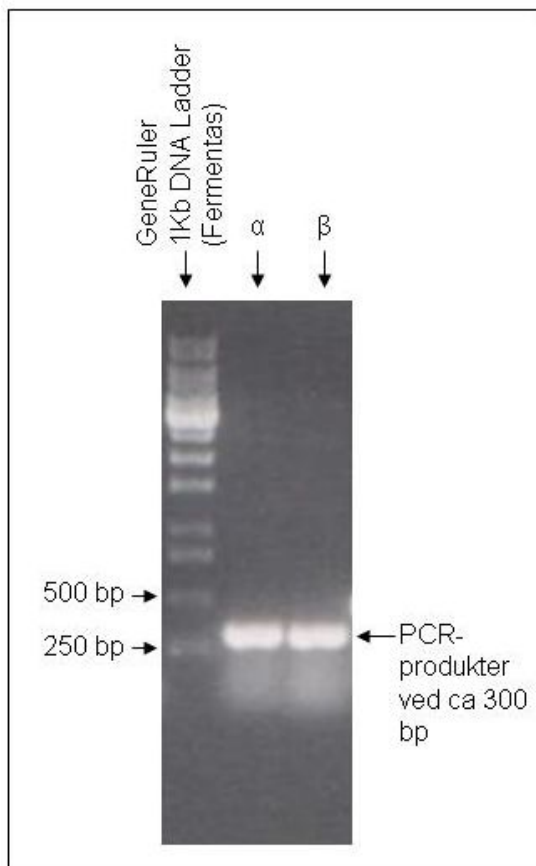
| Plasmid | Inneholder lagA-genet | Inneholder lagB-genet | Inneholder lagC-genet |
|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| pLT100 | Ja | Nei | Ja |
| pLT101 | Ja | Nei | Nei |
| pLT200 | Nei | Ja | Ja |
| pLT201 | Nei | Ja | Nei |

Tabell 4.1: Oversikt over innsatte lactococcin G-gener i plasmidene pLT100, pLT101, pLT200 og pLT201.

4.1.1 Konstruksjon av pLT101 og pLT201

Ved hjelp av genspleising ble sekvensen som koder for sakacin A-ledersekvensen fusjonert med den del av bakteriosingenet som koder for det ferdige lactococcin G α -peptidet eller β -peptidet.

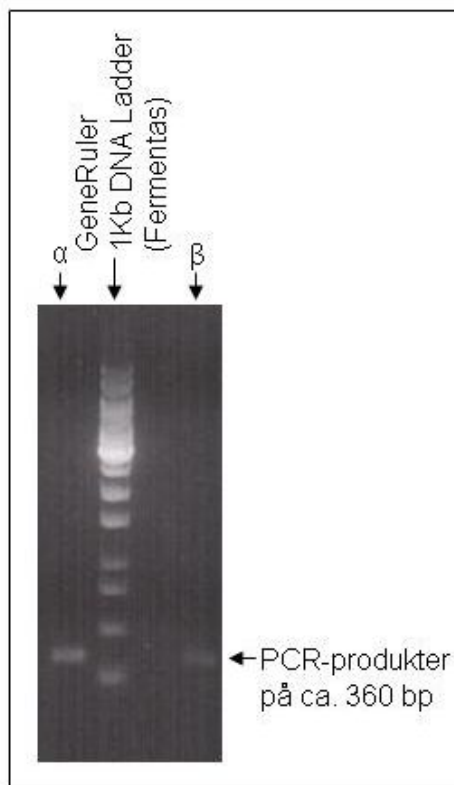
Sekvensen som koder for ledersekvensen til sakacin A ble først amplifisert ved hjelp av PCR (se 3.1.1) med primerne SakPB og LcngAA (til α -peptidet) og Sak PB og LcngBA (til β -peptidet) og plasmidet pSAK100 som templat. pSAK100 har et kuttesete for restriksjonsenzymet *Mlu*I før det strukturelle genet som koder for sakacin A. Primeren SakPB binder seg til pSAK100 før dette kuttesetet slik at *Mlu*I-kuttesetet blir med i PCR-produktet og dermed kan brukes senere. Størrelsen på PCR-produktet ble verifisert ved å kjøre det på gel (se Figur 4.1).



Figur 4.1: PCR-produkt ved PCR med pSAK100 som templat og med primerene SakPB og LcngAA (Oligold fra Eurogenetic) (megaprimer til amplifisering av *lagA*-genet) og primerene SakPB og LcngBA (Oligold fra Eurogenetic) (megaprimer til amplifisering av *lagB*-genet). PCR-produkt ved ca 300 bp funnet i begge tilfeller.

PCR-produktet ble dernest brukt som en megaprimer (reaksjon 2 - se 3.1.8) i en ny PCR-reaksjon. Motprimer til reaksjonen var for α -reaksjonen LcngAB og for β -reaksjonen LcngBB og templatet var et miniprep (Quiagen) av lactococcin G-produzenten *Lactococcus lactis* LMG 2081. Lactococcin G-operonet er kromosomt bundet (Nes et al., 1995), men det viste seg likevel å være mulig å bruke miniprep som templat. I første omgang var mengden PCR-produkt lav da det bare ble et svakt bånd ved agarosegelelektroforese. Det ble

laget mer ved å kjøre enda en PCR-reaksjon med produktet fra den forrige PCR-reaksjonen med lavt utbytte som templat og sakPB og LcngBB som primere. Fra denne reaksjon ble det renset et PCR-produkt på 500 bp, hvilket kan stemme med forventet størrelse på 493 bp for α -peptidet. Etterpå ble PCR-produktet kuttet med restriksjonsenzymene *ClaI* og *MluI* (Promega) (se 3.1.4) og DNA-fragmentet ble renset ved agarosegelelektroforese. Etter rensing ble det undersøkt om det framdeles var DNA-fragment tilstede og om størrelsen stemte (se Figur 4.2).



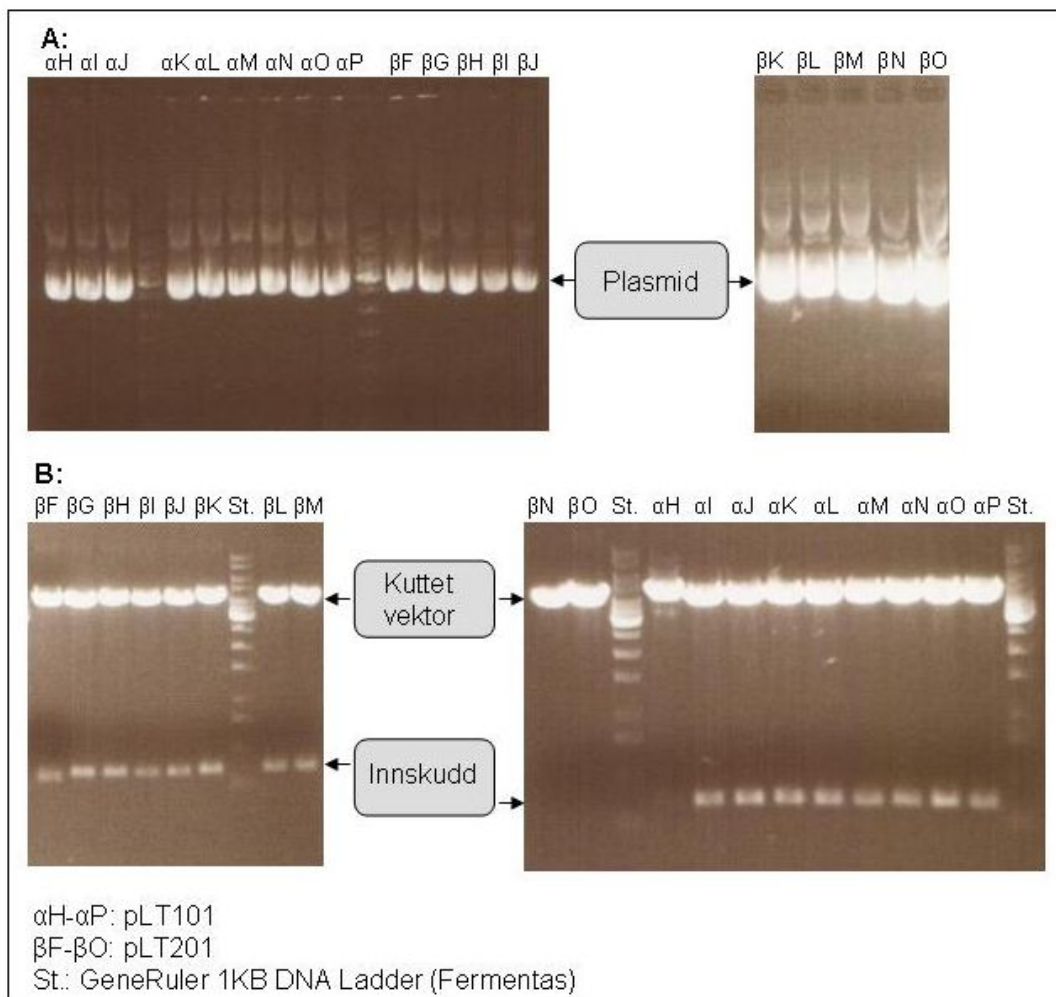
Figur 4.2: Undersøkelse av størrelse på DNA-fragment kuttet med *ClaI* og *MluI*. Forventet størrelse er ca 360 bp.

Plasmidet pLPV111 ble på samme måte kuttet med *ClaI* og *MluI* (Promega), renset og behandlet med CIAP (se 3.1.5), før det ble ligert med DNA-fragmentet (se 3.1.6). Flere innskudd:vektor-forhold ble forsøkt og et 1:3 forhold mellom innskudd og vektor viste seg å være vellykket. Plasmidet med lagA-genet kalles pLT101 og plasmidet med lagB-genet kalles pLT201 (se Tabell 4.1).

Ved sekvensering (se 3.1.9) av plasmidene ble det oppdaget en mutasjon i begge sekvensene som koder for peptidene. Dette skyldes trolig at det under den aller første PCR-reaksjon ble

brukt *Taq*-DNA-polymerase (Fermentas) som setter inn et adeninnukleotid i enden av det amplifiserte fragmentet. Feilen ble rettet opp med sete-dirigert mutagenese (se 4.1.2.1).

pLT101 og pLT201 ble transformert inn i både *Escherichia coli* DH5 α og *Escherichia coli* TB1 (se 3.1.12.1). Ca 90 kolonier grodde opp etter transformasjonen og av disse ble 20 kolonier (10 med pLT101 og 10 med pLT201) plukket. 19 av disse grodde igjen opp etter de var overført til LB-medie tilsatt antibiotika. Alle kulturene ble testet for plasmidinnhold ved miniprep (Quiagen) (se 3.1.2) og plasmidene ble deretter undersøkt om de inneholdt innskudd med riktig størrelse ved å kutte plasmidene med *Cla*I og *Mlu*I (Promega) (se 3.1.4). Tre av kulturene viste seg å ikke ha innskudd (β N, β O og α H), men bare religert vektor (se 4.3). De med religert vektor (α H, β N og β O) ble kastet.



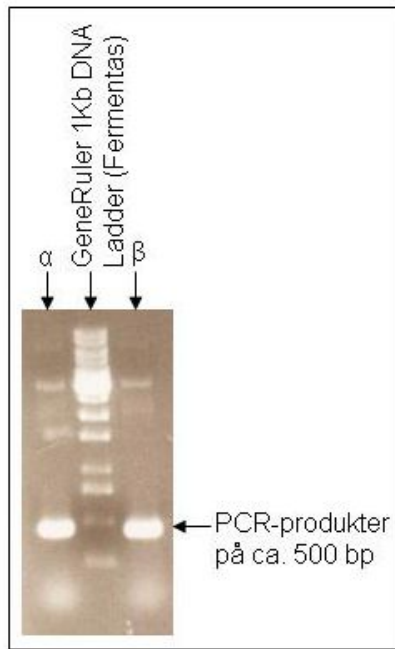
Figur 4.3: A: Undersøker om transformanter (betegnet α H- α P og β F- β O) inneholder plasmid. **B:** Undersøker om de samme inneholder innskudd. Plasmidene α H, β N og β O inneholdt ikke innskudd og kulturene ble kastet.

Renset plasmid med innskudd ble transformert inn i *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20 (se 3.1.12.2). I snitt vokste det opp ca 30 kolonier på hver agarplate etter elektroporeringen. 5 kolonier med pLT101 og 5 kolonier med pLT201 ble plukket. 9 av disse vokste etterpå opp i MRS E₁₀C₁₀.

4.1.2 Konstruksjon av pLT100 og pLT200: Test om immunitetsgen er nødvendig for god produksjon av lactococcin G-peptidene.

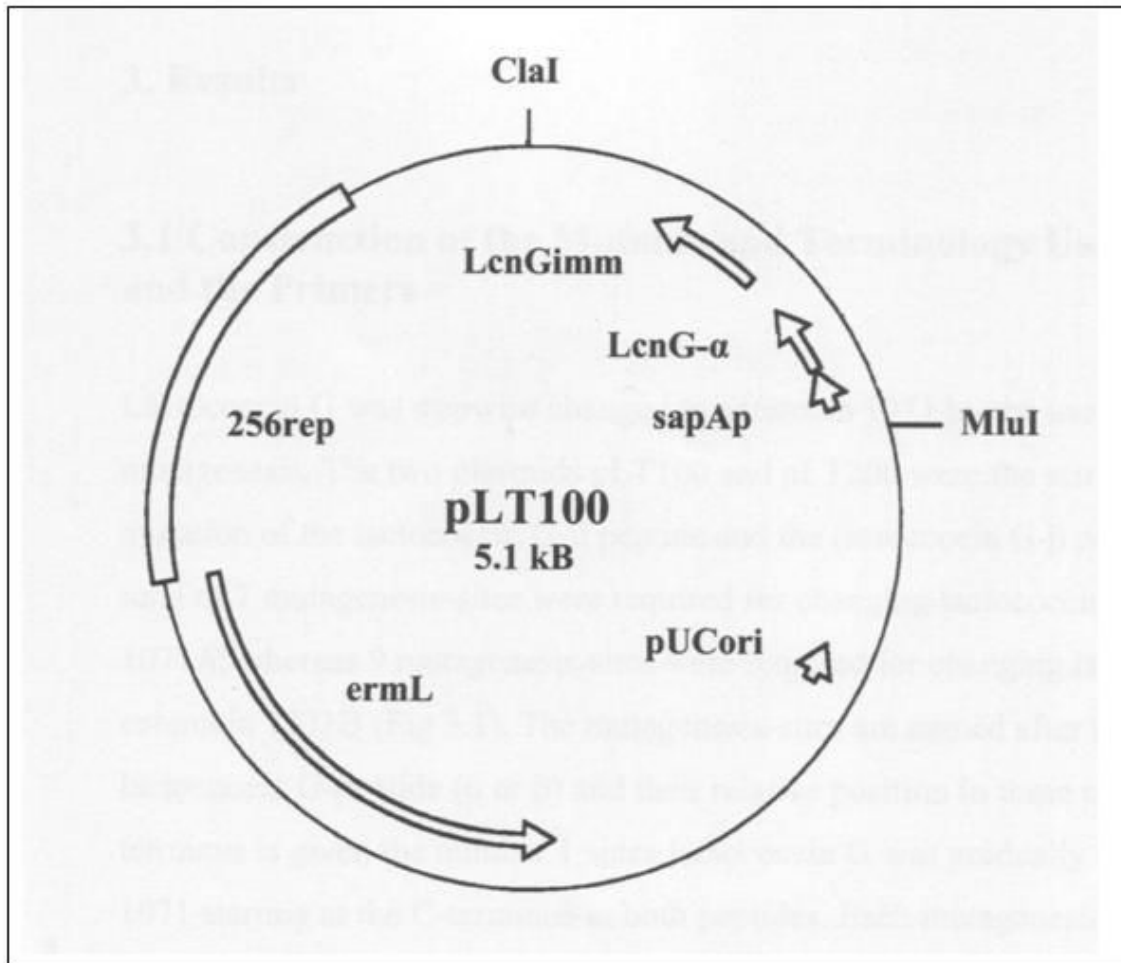
Ved å sette det formodede immunitetsgenet (lagC) inn etter α -peptidgenet (lagA) eller β -peptidgenet (lagB) i henholdsvis plasmidene pLT101 og pLT201 ble det testet om lagC-genet hadde en effekt på produksjonen av bakteriosinet. Det ble laget to plasmider, pLT100 og pLT200, med utgangspunkt i pLT101, pLT201 og pLT300 (pLT300 inneholder blant annet lagC-genet og er omtalt senere i kapittelet (se 4.2).

LagC-genet ble koblet sammen med lagA-genet ved megaprimermethoden. I den første PCR-reaksjon ble pLT101 (eller pLT201 i den tilsvarende reaksjon for lagB-genet) brukt som templat med primerne SakPB og LcngAC (SakPB og LcngBC for β -peptidet). Primeren LcngAC er konstruert med en liten "hale" med en sekvens som er komplementær til begynnelsen av lagC-genet, slik at det under PCR-reaksjonen ble amplifisert et DNA-fragment som inneholdt (i) sakacinA-ledersekvensen, (ii) lagA-genet (eller lagB-genet for β -peptidet) og (iii) begynnelsen på lagC-genet. Dette PCR-produktet kunne da brukes som en megaprimer i den neste PCR-reaksjonen. Størrelsen på det dannede DNA-fragmentet ble verifisert ved agarosegelelektroforese (se Figur 4.4). Størrelsen var som forventet ca 500 bp (467 bp for α -reaksjonen og tilsvarende størrelse for β -sekvensen).



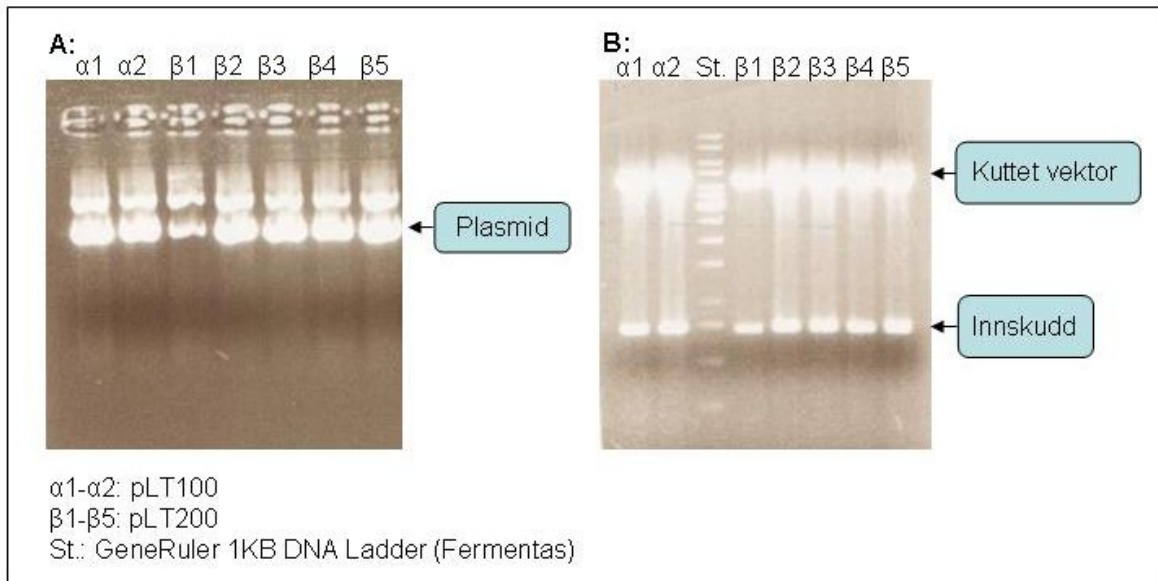
Figur 4.4: PCR-produkter ved PCR på pLT101 og pLT201 med primerene SakPB og henholdsvis LcngAC og LcngBC.

DNA-fragmentet ble så renset med agarosegelelektroforese og brukt som megaprimer i en ny PCR-reaksjon (reaksjon 2). Motprimeren i den andre PCR-reaksjon var LcngImmC (samme for både α - og β -plasmidene) og pLT300 (se 4.2) ble brukt som templat da det blant annet inneholder lagC-genet. Det dannede PCR-produktet inneholdt da i tillegg til genet som kodet for lactococcin G- α med lederpeptidet til sakacin A også genet som kodet for det formodede lactococcin G-immunitetsproteinet. Størrelsen på fragmentet ble verifisert ved agarosegelelektroforese og fragmentet ble kuttet med restriksjonsendonukleasene *MluI* og *ClaI* (Promega). Plasmidet pLPV111 ble også kuttet med *MluI* og *ClaI*, behandlet med CIAP og både fragment og kuttet vektor ble renset ved agarosegelelektroforese. Fragment og plasmid ble ligert og plasmidet med lagA-genet ble kalt pLT100 (se Figur 4.5) og plasmidet med lagB-genet ble kalt pLT200.



Figur 4.5: Plasmidkart over pLT100. Plasmidet inneholder sakacin A-promoteren (sapAp), det strukturelle genet for lactococcin G α -peptidet (LcnG- α – kallet lagA-genet i resten av oppgaven) fusjonert med sakacin A-ledersekvensen, lagC-genet (LcnGimm), markør for erythromycinresistens (ermL) og kutteseter for blant annet ClaI og MluI. 256rep-delen og pUCori gjør replikasjon av plasmidet mulig i henholdsvis melkesyrebakterier og *Escherichia coli*. Plasmidkartet for pLT200 er likt det for pLT100, men det strukturelle genet for lactococcin G α -peptidet (lagA) er byttet ut med det tilsvarende for lactococcin G β -peptidet (lagB) (Oppegård, 2005).

pLT100 og pLT200 ble transformert inn i *Escherichia coli* TB1. Av de som ble transformert med pLT100 grodde det opp 2 kolonier og av de som ble tranformert med pLT200 grodde det opp 5 kolonier. Alle ble plukket, overført til LB-medie tilsatt antibiotika og etter oppvekst sjekket for plasmidinnhold med miniprep (se Figur 4.6). Plasmidene ble dernest kuttet med ClaI og MluI (Promega) for å undersøke om ligeringen var vellykket og om de inneholdt innskudd (se Figur 4.6).



Figur 4.6: A: Undersøker om transformanter (kallet $\alpha 1$ - $\alpha 2$ og $\beta 1$ - $\beta 5$) inneholder plasmid. **B:** Undersøker om de samme transformanter inneholder innskudd.

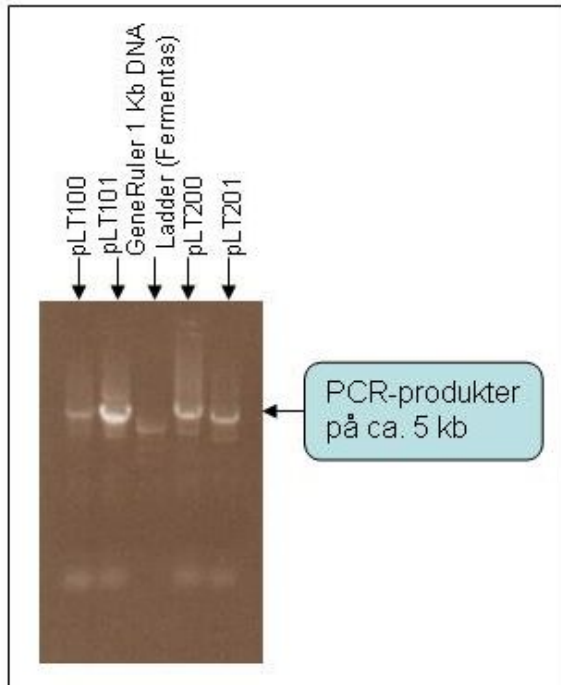
En kultur med pLT100 og en med pLT200 ble sendt til sekvensering. De hadde samme feil i sekvensen som nevnt over (se 4.1.1), og når den var rettet (se 4.1.2.1) ble pLT100 og pLT200 transformert i *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20. 2 kolonier med pLT100 og 2 med pLT200 ble plukket. De vokste opp og ble undersøkt for plasmidinnhold ved miniprep og agarosegelelektroforese. *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20 inneholder allerede et plasmid, men ved å sammenligne med det plasmidet som ble transformert inn i bakterien ble det anskueliggjort at de hadde tatt opp det nye plasmidet.

4.1.2.1 Rekonstruksjon av genene som koder for α - og β -genene ved hjelp av sete-dirigert mutagenese

På grunn av at det ble brukt *Taq*-DNA-polymerase (Fermentas) i den første PCR-reaksjonen (se 4.1.1) som setter inn et adeninnukleotid i slutten av det elongerte DNA-fragmentet ble det en feil i sekvensen til de strukturelle genene for α - og β -peptidene: α -peptidet ble det dermed en G7D-mutant mens β -peptidet fikk innført et stop-kodon etter 7 aminosyreresiduer. Dette var uønsket da målet var å lage samme peptider som det er i lactococcin G-villtypen.

Et QuickChange kit (Stratagene) ble brukt for å introdusere punktmutasjoner i plasmidene pLT100, pLT101, pLT200 og pLT201 slik at sekvensen for lactococcin G-peptidene ble lik villtypesekvensene (se 3.1.7). Primerne som ble brukt var for plasmidene med lagA-genet

Lcng α D7GF og Lcng α D7GR og for plasmidene med lagB-genet Lcng β stoppF og Lcng β stoppR (se Tabell 3.3). Ved hjelp av miniprep og agarosegelelektroforese ble det verifisert at det ble dannet PCR-produkt med forventet størrelse (se Figur 4.7).



Figur 4.7: PCR-produkter etter sete-dirigert mutagenese på plasmidene pLT100, pLT101, pLT200 og pLT201.

I neste fase ble PCR-produktene behandlet med restriksjonsendonukleasen *DpnI* (Stratagene) som ødelegger metylert og hemimetylert DNA. Alle prøvene ble transformert inn i *Escherichia coli* TB1. Av hver transformering grodde det opp ca 30 kolonier. 3 av hver av disse ble plukket og undersøkt for plasmidinnhold ved miniprep og agarosegelelektroforese. Alle innholdt plasmid. Plasmidene ble sendt til sekvensering for å undersøke om mutasjonen var vellykket. 2 av de 3 plukkede koloniene med pLT100-plasmidet hadde forventet mutasjon, alle 3 av koloniene med pLT101-plasmidet som ble plukket hadde mutasjon, alle 3 av koloniene med pLT200-plasmidet hadde mutasjon og 2 av 3 plukkede koloniene med pLT201-plasmidet hadde forventet mutasjon.

De plasmidene som fikk bekreftet riktig sekvens ble transformert inn i *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20. Det vokste i snitt opp ca 40 kolonier på platene og av disse ble det plukket 3 av hver som ble undersøkt for plasmidinnhold med miniprep og agarosegelelektroforese. De hadde alle de forventede plasmidene i seg.

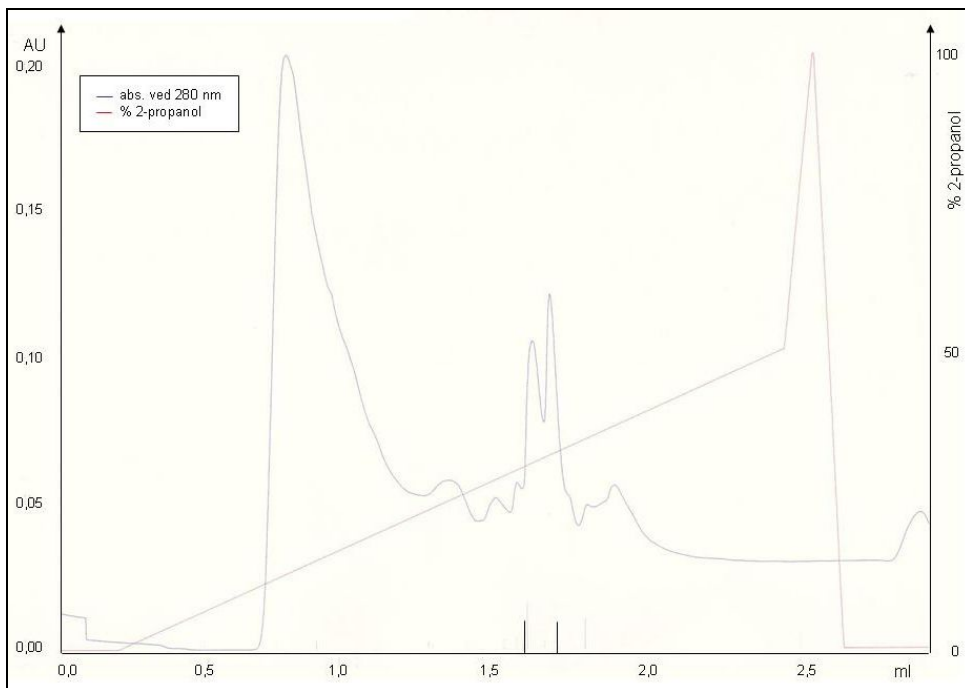
4.1.3 Produksjon og rensing av lactococcin G

4.1.3.1 Sammenlikning av gammel og ny renseprosedyre

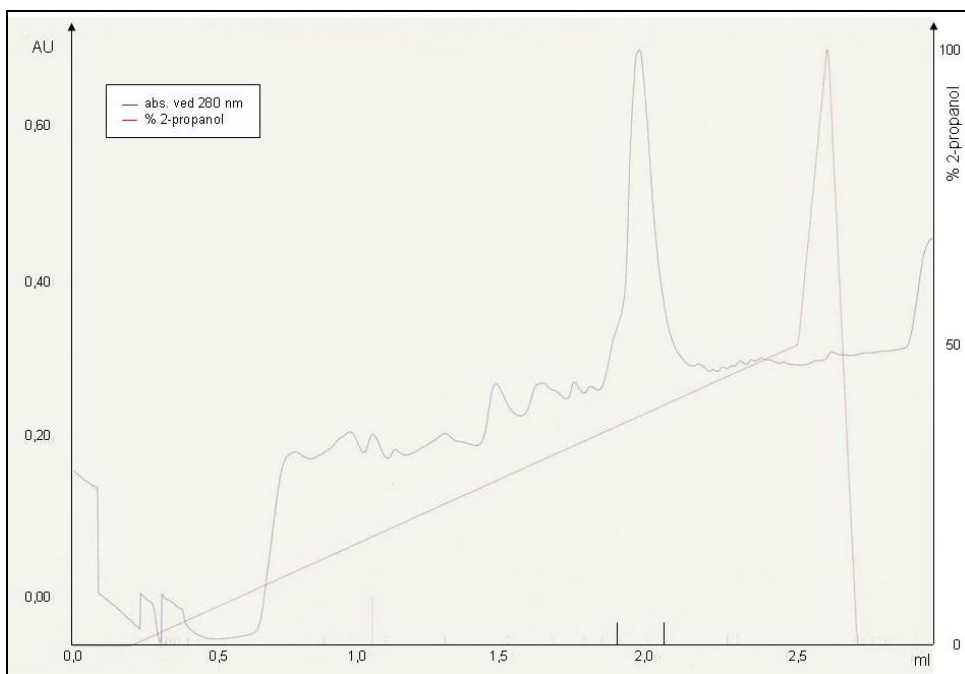
Før plasmidene til heterolog ekspressjon av lactococcin G var ferdige ble rensing av lactococcin G undersøkt for å teste om lactococcin G kunne renses på en mer effektiv måte. Tidligere ble lactococcin G renses ved å bruke en metode beskrevet i Nieto Lozano et al., 1992 (i oppgaven benevnt gammel renseprosedyre – se 3.2.3.1). Denne metoden hadde ulemper: den var tidskrevende, vanskelig å oppskalere og til tider ga den dårlig utbytte (Uteng et al., 2002). Den nye rensemetoden (benevnt ny renseprosedyre – se 3.2.3.2) var raskere, lettere å oppskalere og gir større utbytte ved rensing av andre bakteriosiner som for eksempel pediocin PA-1 (Uteng et al., 2002).

500 ml kultur av lactococcin G-produzenten *Lactococcus lactis* LMG2081 ble delt og renses med hver sin renseprosedyre. Begge metodene ga lavere utbytte med lactococcin G enn for de pediocinlignende bakteriosinene (resultater ikke vist), men utbyttet fra ny renseprosedyre var 3 ganger høyere enn for gammel renseprosedyre. Senere forsøk med rensing av lactococcin G viste samme tendenser (Uteng et al., 2002).

Ved å unnlate ammoniumsulfatfelling og kromatografi på en Octyl Sepharosekolonne i den nye renseprosedyre blir det flere forurensinger i prøven før det siste steget, reversfasekromatografi. På reversfasekolonnen blir en stor del av forurensingene eluert før bakteriosinet og kan dermed lett skilles fra bakteriosinet (se Figur 4.8). Ved reversfasekromatografi etter gammel renseprosedyre er forurensingene allerede borte (se Figur 4.9), men det er som tidligere nevnt også en del av bakteriosinet.



Figur 4.8: Kromatograferingsprofil fra reversfasekromatograferingstrinnet ved rensing av lactococcin G når man benytter ny renseprosedyre (Uteng et al., 2002). Det ble benyttet en μ RCP C2/C18 SC2, 1/10-kolonne (GE Healthcare) på SMART-systemet. Peptidene elueres ved 1,6-1,7 2 ml som vist ved svarte vertikale linjer på x-aksen. En del forurensinger elueres mellom 0,7 og 1,25 ml. Peptidene ble identifisert ved MS og aktivitetmåling.



Figur 4.9: Kromatograferingsprofil ved reversfasekromatograferingstrinnet ved rensing av lactococcin G når man benytter gammel renseprosedyre (Nieto Lozano et al., 1992). Det ble benyttet en μ RCP C2/C18 SC2, 1/10-kolonne (GE Healthcare) på SMART-systemet. Peptidene elueres ved ca 2 ml som vist ved svarte vertikale linjer på x-aksen. Peptidene ble identifisert ved MS og aktivitetmåling.

Molekylmassen til peptidene i relevante fraksjoner (eluert ved 1,6-1,7 ml i ny renseprosedyre og ved ca 2 ml i gammel renseprosedyre) ble bestemt ved MALDI TOF massespektrometri og bakteriosinaktiviteten ble målt. I fraksjonen som inneholdt "OD-toppen" (ved ca 2 ml – se Figur 4.9) en fikk i det siste rensetrinnet (reversfasekromatografi) ved bruk av gammel renseprosedyre, ble det funnet ett peptid med molekylmasse 4345 Da. Det er trolig lactococcin G α -peptidet som har teoretisk molekylmasse 4346 Da. Lactococcin G β -peptidet ble ikke påvist ved MS, men påvist ved at fraksjonen hadde bakteriosinaktivitet. I det tilsvarende rensetrinnet ved bruk av ny renseprosedyre ble "OD-toppen" (ved 1,6-1,7 ml – se Figur 4.8) delt i to. I fraksjonen som inneholdt den første "OD-toppen" ble det funnet et peptid med molekylmasse på 4347 Da (hvilket stemmer bra overens med lactococcin G α -peptidet på 4346 Da) og et peptid med molekylmasse 4364 Da. Peptidet med molekylmasse på 4364 Da er sansynligvis oksidert α -peptid. α -peptidet har to metioninresiduer som kan oksideres. Oksidering medfører en molekylmasse på 4362 Da hvis det ene metioninresidue oksideres, og 4378 hvis begge metioninresiduenes oksideres. Metioninresiduenes kan oksideres med to oksygenatomer i stedet for bare ett, men det er ikke observert ved oksidering av lactococcin G- α -peptidet. Ved oksidering er peptidet fortsatt aktivt, men har lavere aktivitet enn ett ikke-oksidert peptid (Nissen-Meyer – upubliserte resultater). I den andre toppen ble det funnet et peptid med molekylmasse 4112 Da (som kan være lactococcin G β -peptidet på 4110 Da) og et peptid med molekylmasse på 4364 Da, som trolig er oksidert α -peptid. Bakteriosinaktiviteten var høyest mellom de to toppene, som skyldes at det er en optimal blanding av α - og β -peptid mellom toppene.

4.1.3.2 Optimalisering av rensing med ny renseprosedyre

Et sted hvor ny renseprosedyre kan optimaliseres er ved vask av SP-Sepharosekolonnen (se 3.2.3). Ved å tilsette NaCl i vaskebufferen kan man eluere noen forurensinger uten at bakteriosinet følger med. Dette er testet ut for noen andre bakteriosiner som eksempelvis curvacin A, leucocin A, sakacin P og en sakacin P-mutant (Uteng et al., 2002). Den optimale NaCl konsentrasjonen i fosfatbufferen varierte etter bakteriosinets nettoladning slik at optimal NaCl-konsentrasjon for pediocin PA-1 (positiv nettoladning på 5-6) var 0,2 M mens det optimale for sakacin P (positiv nettoladning på 3-4) var 0,15 M (Uteng *et al.*, 2002). Positiv nettoladning både for lactococcin G α -peptidet og lactococcin G β -peptidet er 8.

Den optimale NaCl-konsentrasjon under rensing ble testet ved å sette opp 5 identiske SP-Sepharose FastFlow kationbytterkolonner (GE Healthcare). Det ble applisert like mengder kultur av lactococcin G-produzenten *Lactococcus lactis* LMG2081 på alle kolonnene som beskrevet i renseprosedyren (se 3.2.3). Kolonnene ble så vasket med fosfatbuffer med hver sin NaCl-konsentrasjon og peptidene ble der etter eluert med 1 M NaCl. Det ble valgt å vaske med fosfatbuffer tilsatt henholdsvis 0 M, 0,1 M, 0,2 M og 0,3 M NaCl.

Mellom 10 % og 14 % av den totale bakteriosinaktiviteten ble eluert allerede ved vask med fosfatbuffer tilsatt 0,1 M NaCl. Vask med 0,1 M NaCl gir dermed et betydelig tap av lactococcin G og er dermed ikke hensiktsmessig å bruke ved rensing av lactococcin G.

4.1.3.3 Eluering med GuHCl og urea

For å få fullstendig frigjøring av peptidene til to andre to-peptidbakteriosiner, plantaricin EF og plantaricin JK, fra SP-Sepharosekolonnen må man tilsette 6 M urea eller 3 M GuHCl (Andersen et al., 1998). Det ble derfor undersøkt om det fortsatt satt noe lactococcin G igjen på SP-Sepharosekolonnen etter eluering med 1 M NaCl. Ved en etterfølgende eluering med 6 M urea tilsatt 1 M NaCl ble det eluert bare ca 1 % ekstra bakteriosinaktivitet. Tilsvarende mengder lactococcin G ble frigjort med 6 M GuHCl. Lactococcon G-peptidene sitter dermed ikke igjen på SP-Sepharosekolonnen slik som plantaricin EF og plantaricin JK gjør.

4.1.3.4 Produksjon av lactococcin G-peptidene i det heterologe system

Resultatet fra kapittel 4.1.3.1 viste at den nye renseprosedyren ga minst like godt utbytte og renhet av lactococcin G α - og β -peptidene som den gamle renseprosedyre, men var betydelig raskere og enklere å benytte. Ved videre rensing av lactococcin G ble den nye renseprosedyre benyttet.

Rensing av rekombinant α - og β -peptid

Lactococcin G-peptidene ble produsert som beskrevet i 3.1.11. Resultatet av rensingen er oppsummert i Tabell 4.2. Det ble gjort 3 forsøk for hvert peptid med tilsvarende resultat.

A:

| Fraksjon | Volum /ml | Totalabsorbans ved 280 nm ^a | Totalaktivitet / 10 ⁶ BE ^b | Spesifikk-aktivitet ^c | Rensegrad ^d | Utbytte / % |
|------------------------------|-----------|--|--|----------------------------------|------------------------|-------------|
| Supernatant fra kultur | 1.000 | 15.000 | 55 | 3.700 | 1 | 100 |
| Eluat fra kationbytter | 40 | 33 | 1,7 | 52.000 | 14 | 3 |
| Eluat fra reversfase-kolonne | 2 | 0,4 | 8,5 | 21.000.000 | 5.700 | 15 |

B:

| Fraksjon | Volum /ml | Totalabsorbans ved 280 nm ^a | Totalaktivitet / 10 ⁶ BE ^b | Spesifikk-aktivitet ^c | Rensegrad ^d | Utbytte / % |
|------------------------------|-----------|--|--|----------------------------------|------------------------|-------------|
| Supernatant fra kultur | 1.000 | 14.000 | 41 | 2.900 | 1 | 100 |
| Eluat fra kationbytter | 40 | 38 | 1 | 26.000 | 9 | 2,5 |
| Eluat fra reversfase-kolonne | 2 | 2,5 | 45 | 18.000.000 | 6.200 | 111 |

Tabell 4.2: Rensetabeller for rensing av lactococcin G α - og β -peptid fra henholdsvis **A:** *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20/pLT101 og **B:** *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20/pLT201.

^a Total absorbans er absorbans ved 280 nm multiplisert med totalvolumet i ml.

^b Spesifikk aktivitet er antall bakteriosinenheter (BE) pr fraksjon hvor en BE er definert som mengden av bakteriosin som hemmer bakterieveksten med 50 %.

^c Spesifikkaktivitet er totalaktivitet i BE dividert med totalabsorbans.

^d Rensegrad er økning i spesifikkaktivitet.

Noe bakteriosinaktivitet mistes i flow-through på kationbytteren ($20 \cdot 10^6$ BE for både α - og β -peptidet). Sammenlignes utbyttet med det tilsvarende for pediocin PA-1 er utbyttet av lactococcin G α - og β -peptid lavere (Uteng et al., 2002). Det lavere utbytte kan skyldes overbelastning av kationbytter SP-Sepharose Fast Flow kolonnen (GE Healthcare). Ved rensing av pediocin PA-1 brukes det 6 ml kolonnemateriale (SP-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)) til 400 ml kultur. I disse forsøkene er det brukt 1000 ml kultur til samme mengde kolonnemateriale.

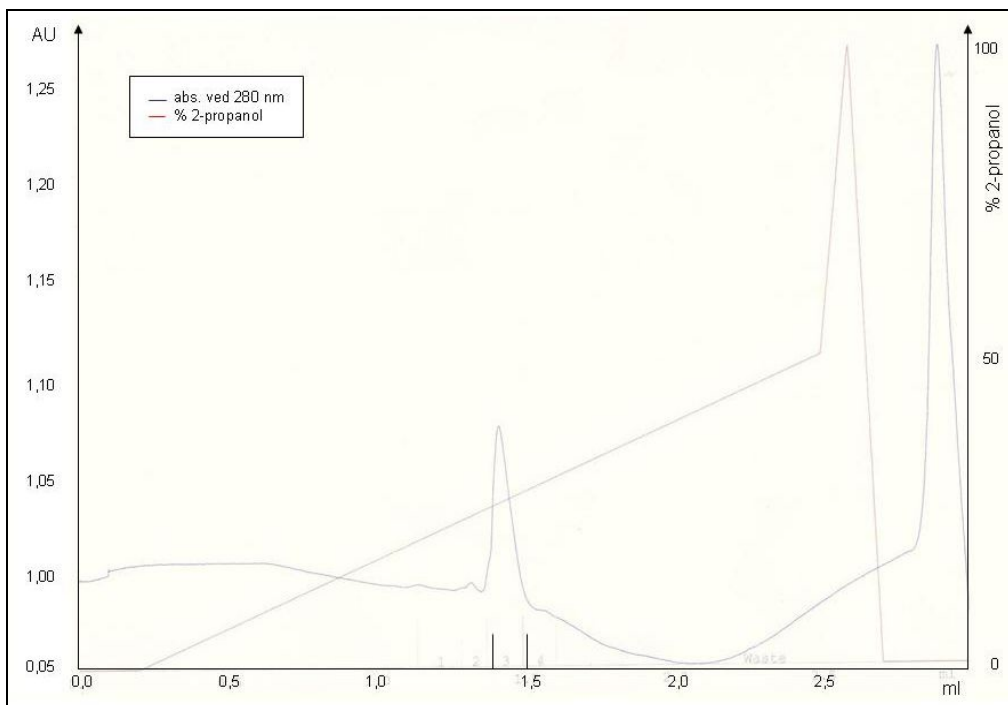
Mengden av peptid fundet i reversfaseeluatet er vesentlig større enn det som ble funnet i kationbyttereluatet og utbyttet stiger til over 100 % for β -peptidet i reversfaseeluatet (se Tabell 4.2). Dette kan skyldes at peptidene i supernatant og i kationbyttereluatet er mindre aktive enn de er i reversfaseeluatet. Peptidene i supernatant og i kationbyttereluat kan være aggregert eller hemmet på annen vis, slik alle peptidene ikke er fullstendig aktive. Når

peptidene så elueres fra reversfasekolonnen er de i et mer hydrofobt miljø som kanskje løser slike peptidaggregater og i tillegg er eventuelle hemmere renset bort.

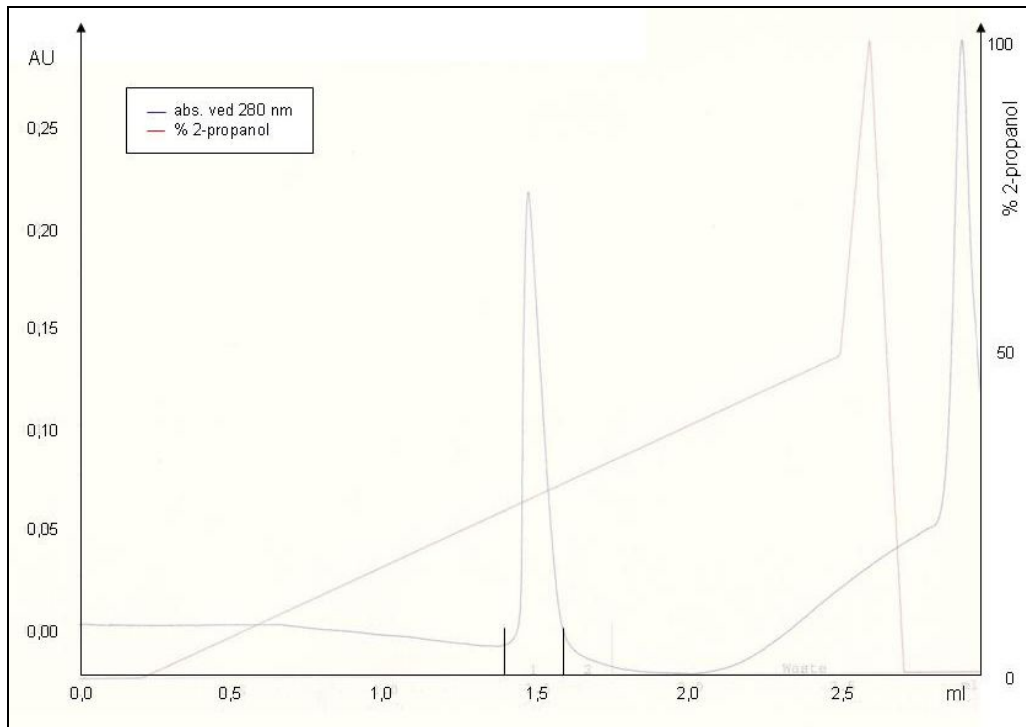
Utbyttet ved rensing av lactococcin G α -peptidet er lavere enn utbyttet ved rensingen av lactococcin G β -peptidet. Dette kan skyldes oksidering av α -peptidet hvis det går noe tid fra rensingen er utført til aktivitetsundersøkelsene utføres. Oksidert α -peptid har lavere aktivitet enn ikke-oksidert peptid.

Som indikator ble det brukt *Lactococcus lactis* IL 1403. Denne er ikke resistent mot erythromycin eller kloramphenicol som det kan være rester av i mediet. Hvor stor effekt eventuelle antibiotikarester hadde på veksten til indikatorstammen vites ikke. Senere forsøk med resistent indikatorstamme viste samme tendenser som de med ikke-resistent indikatorstamme (Camilla Opegård – upubliserte resultater).

Kromatogrammet fra reversfasekolonnen viste tydelige topper (resultater ikke vist). Eluatet ved disse toppene ble samlet og ved å kjøre det på en μ RCP C2/C18 SC2, 1/10-kolonne på SMART-systemet (se 3.2.2) ble renheten undersøkt (se Figur 4.10 og Figur 4.11).

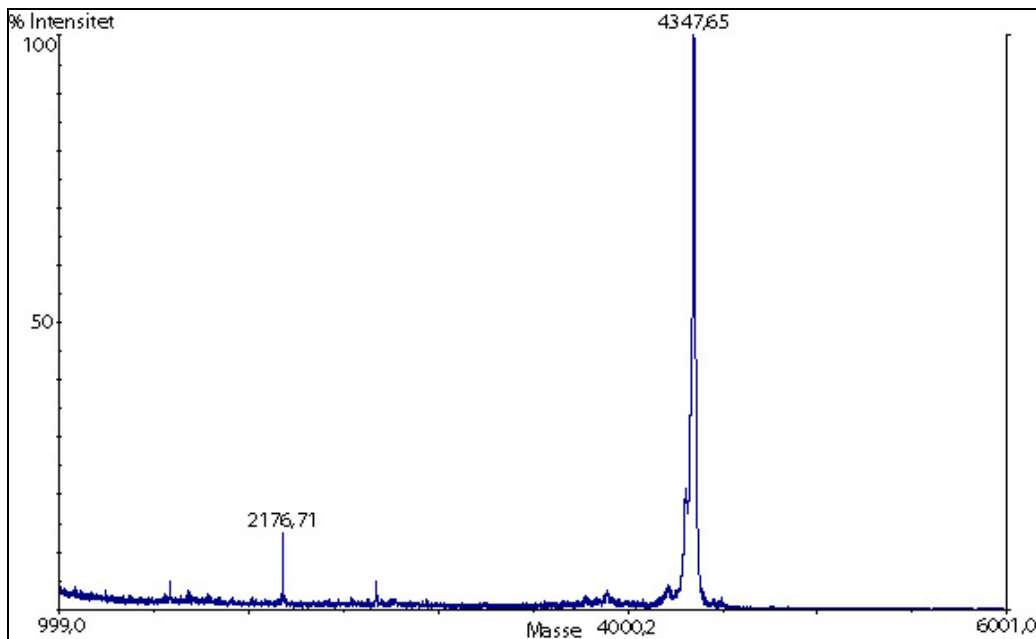


Figur 4.10: Kromatograferingsprofil av lactococcin G α -peptid fra *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20/pLT101 etter kromatografi på en μ RCP C2/C18 SC2, 1/10-kolonne på SMART-systemet (GE Healthcare). Peptidene elueres ved ca 1,5 ml som vist ved svarte vertikale linjer på x-aksen.

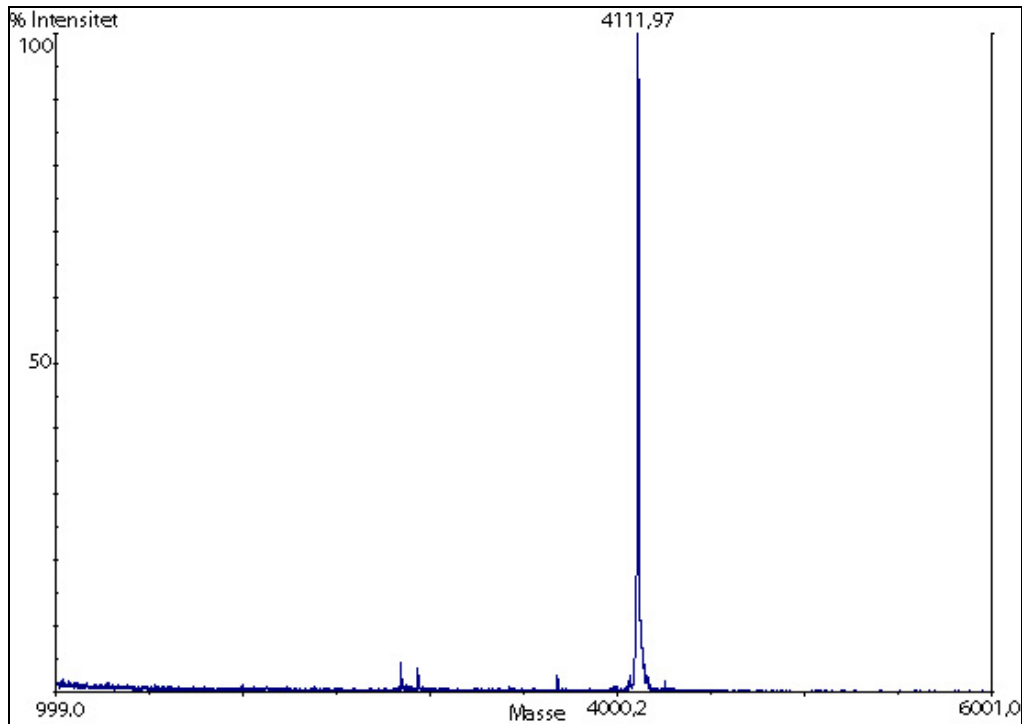


Figur 4.11: Kromatograferingsprofil av lactococcin G β -peptid fra *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20/pLT201 etter kromatografi på en μ RCP C2/C18 SC2, 1/10-kolonne på SMART-systemet (GE Healthcare). Peptidene elueres ved ca 1.5 ml som vist ved svarte vertikale linjer på x-aksen.

Størrelsen på peptidene ble verifisert med massespektrometri (se 3.3.3) for å se om størrelsen stemmer overens med de teoretiske verdiene (se Figur 4.12 og Figur 4.13).



Figur 4.12: MALDI-TOF massespektrum av lactococcin G α -peptid produsert av *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20/pLT101.



Figur 4.13: MALDI-TOF massespektrum av lactococcin G β -peptid produsert av *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20/pLT201.

Molekylmassene bestemt ved MALDI-TOF massespektrometri stemte bra overens med de forventede teoretiske molekylmassene. Funnet molekylmasse for lactococcin G α -peptidet var 4347 Da mens teoretisk verdi er 4346 Da, og tilsvarende for lactococcin G β -peptidet var massen bestemt i forsøket 4111 Da mens teoretisk verdi er 4110 Da (Nissen-Meyer et al., 1992).

Det heterologe ekspressjonssystem er dermed laget og det fungerer. Alternativt til heterolog ekspressjon kan man lage peptidene syntetisk, men de syntetiske peptidene har ulemper ved å være kostbare og tidskrevende å få helt rene. Ved å flytte genene som koder for lactococcin G-peptidene til plasmider, blir det enklere å fortsette med undersøkelser av lactococcin Gs virkningsmekanisme og spesifisitet ved for eksempel mutasjoner. Den enklere måten å framstille lactococcin G-peptidene på i større mengder uten forurensing av det komplementære peptidet kan være utgangspunkt for strukturbestemmelser av lactococcin G.

Valg av ledersekvens

Ledersekvensen til lactococcin G ble byttet ut med ledersekvensen til sakacin A. Dette fordi ekspressjonssystemet er tilpasset sakacin A-ledersekvensen da ekspressjonssystemet har ABC-transporteren og accessory-proteinet til sakacin A (se 3.1.10.3). Men det er godt mulig

det ikke var nødvendig å bytte ledersekvens og at man i stedet kunne ha fått bra resultat med lactococcin G-ledersekvensene. Spesielt lactococcin G α -ledersekvensen har store likheter med sakacin A-ledersekvensen (se Tabell 1.2).

4.1.3.5 Kvantitering av mengde peptid produsert med pLT100, pLT101, pLT200 og pLT201

Mengden av peptid som ble produsert av stammene *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20 med plasmidene pLT100, pLT101, pLT200 og pLT201 ble bestemt ved hjelp av metoden beskrevet i 3.3.2. Resultatet vises i Tabell 4.3.

| Plasmid i kulturen | Peptidmengde i 1 liter kultur (μg) | Standardavvik |
|--------------------|---|---------------|
| pLT100 | 300 | ± 100 |
| pLT101 | 200 | ± 70 |
| pLT200 | 800 | ± 500 |
| pLT201 | 400 | ± 200 |

Tabell 4.3: Tabell over produksjon av henholdsvis lactococcin G α - og β -peptid i kulturer med *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20 og plasmidene pLT100, pLT101, pLT200 eller pLT201. Tallet er snittverdien av minimum 3 forsøk.

Det var uproblematisk at produsere lactococcin G-peptidene uten at immunitetsproteinet var til stede. Immunitetsproteinet er trolig ikke nødvendig så lenge cellen bare produserer det ene av lactococcin G-peptidene da tilstedeværelse av begge er nødvendig for å drepe en bakteriecelle. En annen mulighet kan være at *Lactobacillus sake* Lb790/pSAK20 ikke er følsom mot lactococcin G og derfor ikke dør selv om det er lactococcin G i mediet. Det siste er ikke undersøkt.

Det kan virke som om det ble produsert mer lactococcin G-peptid når immunitetsgenet var tilstede (pLT100 og pLT200) enn når det ikke var det (pLT101 og pLT201), men det er noe usikkert tatt i betraktning de store standartavvikene. β -produsentene (pLT200 og pLT201) virket som om de produserte mer enn α -produsentene (pLT100 og pLT101). Grunnen til dette er ukjent, men det kan være problemer med oksidering av α -peptidet. Ved oksidering blir peptidet mindre aktivt og det vil dermed få mindre utslag i en aktivitetsmåling.

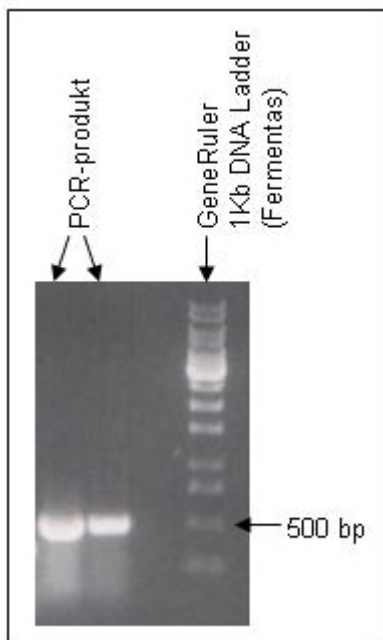
4.2 Lactococcin G-immunitetsproteinet

4.2.1 Konstruksjon av pLT300

Det har ikke tidligere vært undersøkt om lagC-genet faktisk koder for lactococcin G-immunitetsproteinet (se 1.3.2). Dette gjør det interessant å sette inn lagC-genet i en lactococcin G-følsom stamme og se om det fører til resistens.

Først ble DNA-sekvensen man tror koder for lactococcin G-immunitetsproteinet amplifisert ved hjelp av PCR. Primerne var LcngImmF og LcngImmR (Oligold fra Eurogenetic) (se Tabell 3.3 for sekvens og Figur 3.7 for plassering i lactococcin G-operonet). Templat var et miniprep (Quiagen) av lactococcin G-produsenten *Lactococcus lactis* LMG2081.

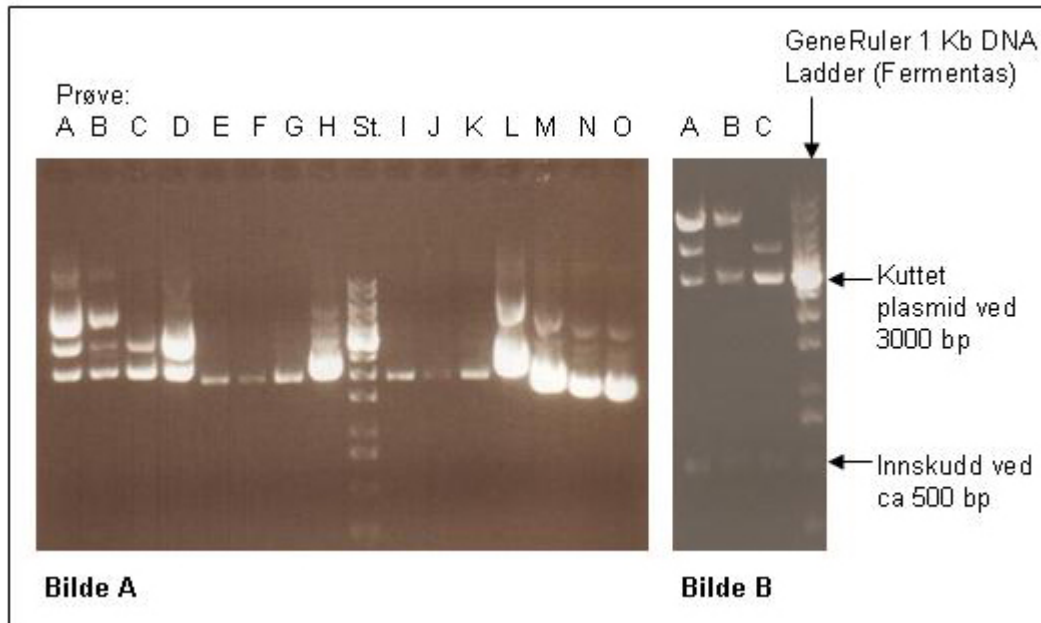
Lactococcin G-operonet er kromosomalt bundet (Nes et al., 1995), men da det var uproblematisk å bruke miniprep til nesten samme forsøk med lactococcin G-peptidene, ble miniprep valgt også her. Ved PCR-reaksjonen ble det amplifisert et DNA-fragment som i størrelse var som forventet (ca 500 bp) (se Figur 4.14).



Figur 4.14: PCR-produkt ved PCR på *Lactococcus lactis* LMG2081 miniprep (Quiagen) med LcngImmF og LcngImmR (Oligold fra Eurogenetic) som primere.

PCR-produktet ble rensert ved agarosegelelektroforese, kuttet med *Bam*HI og *Eco*RI (Fermentas), ligert i pGEM-7Zf(+) (Promega) og transformert i *Escherichia coli* DH5 α .

Grunnen til at det først ble benyttet plasmidet pGEM-7Zf(+) (Promega) er at den er enklere å arbeide med i *Escherichia coli* i forhold til pMG36e. Etter oppvekst ble det plukket 15 kolonier og de ble undersøkt for plasmider ved miniprep (Quiagen) og agarosegelelektroforese og for innskudd ved kutting av plasmider med *Bam*HI og *Eco*RI (Fermentas). Alle 15 kolonier inneholdt plasmid og innskudd (se Figur 4.15).



Figur 4.15: **Bilde A:** Plasmid innhold i 15 kolonier som ble plukket etter transformering av *Escherichia coli* DH5 α . **Bilde B:** Alle prøvene ble kuttet med *Bam*HI og *Eco*RI for å undersøke om det var innskudd (her vist et utvalg av prøvene).

Immunitesgenet (*lagC*) var dermed klart til å settes inn i pMG36e. pMG36e er velegnet til ekspressjon i melkesyrebakterier (se 3.1.10.1).

Plasmid med innskudd ble kuttet med *Sac*I og *Xba*I (Fermentas) og renset ved agarosegelelektroforese. pMG36e ble renset fra en *Escherichia coli*-stamme og ble på samme måte kuttet med *Sac*I og *Xba*I (Fermentas) og renset ved agarosegelelektroforese.

Det rensede innskuddet og pMG36e ble ligert og transformert inn i *Escherichia coli* DH5 α . 6 kolonier grodde opp. Alle ble plukket, undersøkt om de inneholdt plasmid ved hjelp av miniprep (Quiagen) og kontroll-kuttet med *Sac*I og *Xba*I (Fermentas). De prøvene som testet positivt med hensyn til plasmid og innskudd ble valgt til videre undersøkelser.

En av disse ble sekvensert av Kenneth Weierud ved MegaBase Laben ved Institutt for molekylær biovitenskap, Universitetet i Oslo. Primerne brukt til sekvenseringen var de

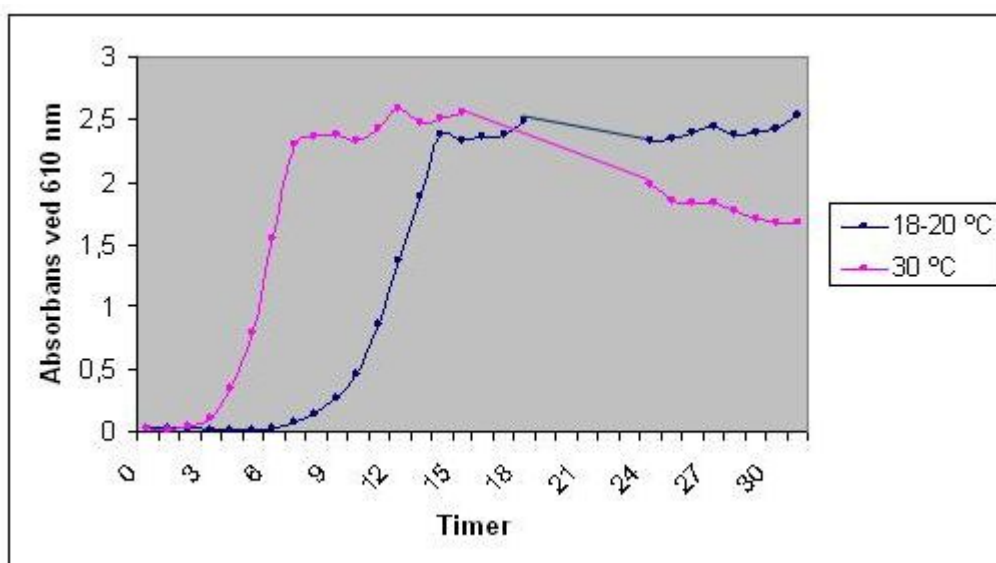
samme som tidligere ble brukt til å lage PCR-produktet: LcngImmF og LcngImmR (Oligold fra Eurogenetic) (se Tabell 3.3 for primersekvens). Sekvensen var korrekt og plasmidet ble navngitt pLT300.

4.2.2 Påvisning av immunitetsgenets effekt

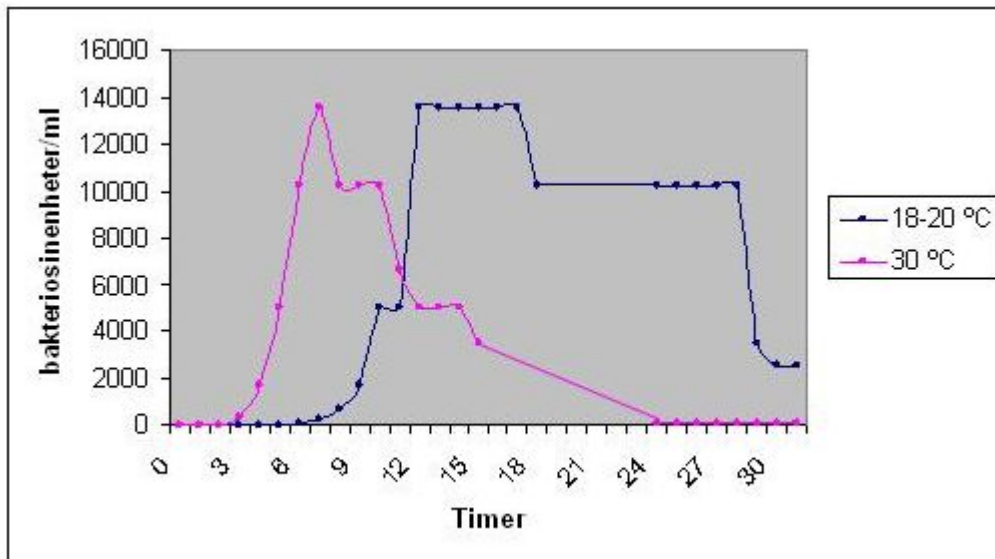
4.2.2.1 *Lactococcin G* produksjon i villtype ved forskjellige temperaturer

Når effekten av immunitetsproteinet skulle testes var det bruk for lactococcin G. Til dette ble det brukt cellefri supernatant av *Lactococcus lactis* LMG2081 fra en over-natt-kultur. En ulempe med den cellefrie supernatanten var at den hadde variabel bakteriosinaktivitet fra dag til dag. Den ene dagen kunne kulturen inneholde store mengder lactococcin G mens en tilsvarende kultur dagen etter ikke hadde så mye. Det var derfor av interesse å undersøke hvorledes temperatur og tid påvirket bakteriosin-produksjon i *Lactococcus lactis* LMG2081.

Produksjonen av lactococcin G-produzenten *Lactococcus lactis* LMG2081 er målt ved forskjellige temperaturer over tid. En overnattkultur av *Lactococcus lactis* LMG2081 ble fortynnet 100 ganger, fordelt på 5 rør og plassert ved hver sin temperatur i opp til 6 døgn. Melkesyrebakterier gror optimalt ved 30 °C og temperaturene som ble testet var 9 °C, 18-20 °C, 30 °C, 37 °C og 42 °C. Det ble tatt prøver med ca en times mellomrom og lysspredningen ved 610 nm (se Figur 4.16) og bakteriosinaktiviteten (se Figur 4.17) ble målt.



Figur 4.16: Vekst til *Lactococcus lactis* LMG2081 ved 18-20 °C og 30 °C.



Figur 4.17: Bakteriosinaktivitet i *Lactococcus lactis* LMG2081 18-20 °C og 30 °C.

Det ble ikke registrert noen vekst eller produksjon av aktivt lactococcin G ved 9 °C eller ved 42 °C. Disse prøvene stod i 6 døgn uten vekst eller lactococcin G-produksjon (resultat ikke vist). Veksten ved 37 °C begynte ikke før etter 30 timer og *Lactococcus lactis* LMG2081 produserte aldri nok lactococcin G ved 37 °C til at det kunne måles selv etter 6 døgn (resultat ikke vist).

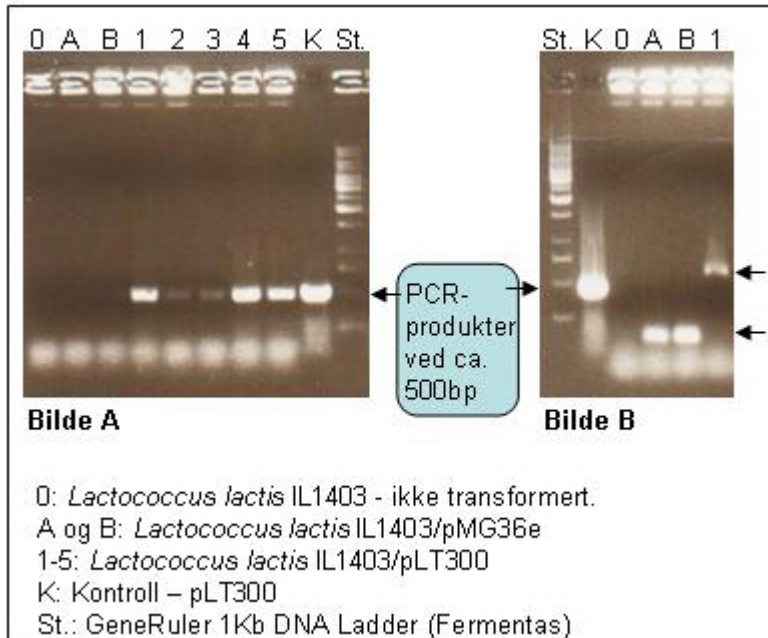
Ved 18-20 °C og 30 °C var det både vekst og produksjon av lactococcin G. Den målte aktiviteten til lactococcin G fulgte vekstkurven ved både 30 °C og 18-20 °C. *Lactococcus lactis* LMG2081 gror raskere opp til full celletetthet ved 30 °C enn ved 18-20 °C. At aktiviteten faller etter en stund kan skyldes proteaser som dannes. Aktiviteten faller raskere ved 30 °C enn ved 18-20 °C. Dette kan ha en betydning når man ønsker å benytte lactococcin G. Siden aktivitetstoppen ved 30 °C bare er på ca 1 time kan det være vanskelig å ta kulturen akkurat når aktiviteten er størst. Det kan være mer praktisk å la kulturen gro ved 18-20 °C i stedet. Da har man et vindu på ca 6 timer hvor aktiviteten er maksimal.

4.2.2.2 *Lactococcin G-resistens hos Lactococcus lactis* IL1403/pLT300

pLT300 ble rensset ved miniprep (Quiagen) og transformert inn i den lactococcin G-følsomme stammen *Lactococcus lactis* IL1403 ved elektroporering (se 3.1.12.2).

Lactococcus lactis IL1403 viste seg å ha problemer med å holde på plasmidet. Flere ganger ble det påvist plasmid i transformantene ved PCR med LcngIMMF og LcngIMMR (Oligold

fra Eurogenetic) som primere eller ved miniprep, mens samme tester senere viste mangel på plasmid. Figur 4.18 viser en test av om transformantene inneholder pLT300 med lagC-genet (prøve 1-5) eller pMG36e (prøve A og B).



Figur 4.18: PCR på kulturer med henholdsvis pMG36e og pLT300 innsatt. PCR-reaksjonen ble kjørt direkte på kulturene som var testet i immunitetsassayet. **Bilde A:** Det er brukt lagC-genspesifikke primere LcnglmmF og LcnglmmR (Oligold fra Eurogenetic) Alle prøver som formodes å inneholde lagC-genet får det forventede bånd ved ca 500 bp. **Bilde B:** Det er brukt primere spesifikke for pMG36e (primerene er ikke nevnt i metod delen). Prøver som formodes å inneholde pMG36e får det forventede bånd på under 250 bp, og prøven med pLT300 får det forventede bånd på over 500 bp.

Det var en tendens til at *Lactococcus lactis* IL1403/pMG36e holdt bedre på plasmidet enn *Lactococcus lactis* IL1403/pLT300 (resultater ikke vist).

I de tilfeller hvor plasmidene var intakte viste *Lactococcus lactis* IL1403/pMG36e seg å være like mottakelig for lactococcin G som ikke-transformert *Lactococcus lactis* IL 1403. *Lactococcus lactis* IL 1403/pLT300 var derimot gjennomsnittlig 80 ganger mer motstandsdyktig mot lactococcin G og i enkelte tilfeller opp til 250 ganger mer motstandsdyktig. Resultatet var vanskelig å reproducere på grunn av ustabiliteten til *Lactococcus lactis* IL1403. Det er senere vist at andre lactococcin G-følsomme stammer som i motsetning til *Lactococcus lactis* IL1403 beholdt plasmidet pLT300 bedre også ble immune ved å få innført pLT300 (Linda Emanuelsen og Camilla Oppegård – upubliserte resultater).

Før konstruksjonen av pLT300 var det bare lagC-genets størrelse, plassering i operonet og likhet med kjente immunitetsproteiner (se 1.3.2) som gjorde man trodde lagC-genet faktisk kodet for lactococcin G-immunitetsproteinet. Ved hjelp av pLT300 er det vist at lagC-genet gir økt resistens mot lactococcin G. pLT300 kan være utgangspunkt for senere strukturbestemmelser av immunitetsproteinet ved for eksempel røntgenkrystallografi.

Forkortelser

| | |
|------------------|--|
| ABC-transporter: | ATP binding cassette (ABC) transporterprotein |
| Bp: | Basepar |
| CAM: | kloramphenicol |
| CIAP: | Calf Intestine Alkaline Phosphatase |
| DNA: | Deoksyribonukleinsyre |
| ddNTP: | Dideoksyribonukleotidtrifosfat |
| dNTP: | Deoksyribonukleotidtrifosfat |
| Erm: | Erythromycin |
| EtBr: | Etidiumbromid |
| FPLC: | Fast Protein Liquid Chromatography |
| GM17: | M17-medie tilsatt glukose |
| Kb: | Kilobaser |
| LA-skåler: | LB-medie tilsatt agar og helt ut i petriskåler |
| LB: | Luria-Bertani-medie |
| MALDI-TOF-MS: | Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry |
| MRS: | De man, Rogosa, Sharpe medie |
| MRSSM: | MRS-medie tilsatt sukrose og magnesiumklorid |
| MS: | Massespektrometri |
| OD: | Optical density |
| PCR: | Polymerase chain reaction |
| PEG: | Polyetylenglykol |
| Rpm: | Rounds per minutt |
| SGM17: | M17-medie tilsatt sukrose og glukose |
| SGM17MC: | M17-medie tilsatt sukrose, glukose og magnesiumklorid |

Kildeliste

- Abee T, Klaenhammer TR, Letellier NL. (1994) Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl Environ Microbiol.* 60:1006-1013.
- Andersen EL, Diep DB, Nes IF, Eijsink VGH, Nissen-Meyer J. (1998) Antagonistic activity of *Lactobacillus Plantarum* C11: Two new peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl Environ Microbiol.* 64:2269-2272.
- Aukrust TW, Brurberg MB, Nes IF. (1995) Electroporation protocols for microorganisms, *Lactobacillus*. I: Nikcoloff JA, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 47. Humana Press Inc., Totowa, NJ. Side 201-208.
- Axelsson L, Holck A. (1995) The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J Bacteriol.* 177:2125-2137.
- Axelsson L, Katla T, Bjørnslett M, Eijsink VGH, Holck A. (1998) A system of heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiol Lett.* 168:137-143.
- Balla E, Dicks LMT, Toit MD, van der Merwe, Holzapfel WH. (2000) Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl Environ Microbiol.* 66:1298-1304.
- Balla E, Dicks LMT. (2005) Molecular analysis of the gene cluster involved in the production and secretion of enterocins 1071A og 1071B and of the genes responsible for the replication and transfer of plasmid pEF1071. *International journal of food Microbiology* 99:33-45.
- Chen Y, Ludescher RD, Montville TJ. (1997) Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl Environ Microbiol.* 63:4770-4777.
- Cintas LM, Casaus P, Holo H, Hernández PE, Nes IF, Håvarstein LS. (1998) Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolycins. *J Bacteriol.* 180:1988-1994.
- Diep DB, Håvarstein LS, Nes IF. (1996) Characterisation of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus Plantarum* C11. *J Bacteriol* vol 178:4472-4483.
- Fimland G, Blingsmo RO, Sletten K, Jung G, Nes IS, Nissen-Meyer J. (1996) New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl Environ Microbiol.* 62:3313-3318.

- Fimland G. (2002) Structure-function analysis of the pediocinlike bacteriocins and immunity proteins conferring resistance to these bacteriocins. Thesis for the degree of doctor scientiarum. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo.
- Flynn S, van Sinderen D, Thornton GM, Holo H, Nes IF, Collins JK. (2001) Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiol.* 148:973-984.
- Franke CM, Leenhouts KJ, Haandrikman AJ, Kok J, Venema G, Venema K. (1996) Topology of LcnD, a protein implicated in the transport of bacteriocins from *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* 178:1766-1769.
- Franz CMAP, Grube A, Hermann A, Abriouel H, Stärke J, Lombardi A, Tauscher B, Holzapfel WH. (2002) Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Appl Environ Microbiol.* 68:2550-2554.
- Fregeau Gallagher NL, Sailer M, Niemczura WP, Nakashima TT, Stiles ME, Vederas JC. (1997) Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: special location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry.* 36:15062-15072.
- Guder A, Wiedemann I, Sahl HG. (2000) Posttranslationally modified bacteriocins – The lantibiotics. *Biopolymers.* 55:62-73.
- Hancock REW, Chapple DS. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents & chemotherapy.* 43:1317-1323.
- Hancock REW, Diamond G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *TIMS.* 8:402-410.
- Hancock REW, Scott MG. (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 97:8856-8861.
- Hauge HH, Nissen-Meyer J, Nes IF, Eijsink VGH. (1998a) Amphiphilic α -helices are important structural motifs in the α and β peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G: enhancement of helix formation upon α - β interaction. *Eur J Biochem.* 251:565-572.
- Hauge HH. (1998b) Amphiphilic α -helices in the membrane-permeabilizing bacteriocins of lactic acid bacteria. Thesis for the degree of doctor scientiarum. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo.
- Hauge HH, Mantzilas D, Eijsink VGM, Nissen-Meyer J. (1999) Membranemimicking entities induce structuring of the two-peptide bacteriocins plantaricin E/F and J/K. *J Bacteriol.* 181:740-747.

- Holo H, Jeknic Z, Daeschel M, Stevanivic S, Nes IF. (2001) Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiol.* 147:643-651.
- Holo H, Nes IF. (1995) Electroporation protocols for microorganisms, *Lactococcus*. I: Nikoloff JA, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 47. Humana Press Inc., Totowa, NJ. Side 195-199.
- Hong Y, Hancock REW. (2001) Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defence peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45:1558-1560.
- Johnsen L, Dalhus B, Leiros I, Nissen-Meyer J. (2005a) 1.6-Å crystal structure of EntA-im. *J Biol Chem.* 280:19045-19050.
- Johnsen L, Fimland G, Nissen-Meyer J. (2005b) The C-terminal domain of the pediocin-like antimicrobial peptides (Class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J Biol Chem.* 280:9243-9250.
- Kazazic M, Nissen-Meyer J, Fimland G. (2002) Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiol* 148:2019-27.
- Kristiansen PE, Fimland G, Mantzilas D, Nissen-Meyer J. (2005) Structure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaricin A. *J Biol Chem.* 280:22945-22950.
- Klaenhammer TR. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12:39-86.
- Leer RL, van der Vossen JMBM, van Giezen M, van Noort JM, Pouwels PH. (1995) Genetic analysis of acidiocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol.* 141:1629-1635.
- Maldonado A, Ruiz-Barba JL, Jiménez-Díaz R. (2002) Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl Environ Microbiol.* 69:383-389.
- Marciset O, Jewronimus-Stratingh MC, Mollet B, Poolman B. (1997) Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J Biol Chem.* 272:14277-14284.
- Marcos A, Wärnberg J, Nova E, Gómez S, Alvarez A, Alvarez R, Mateos JA, Cobo JM. (2004) The effect of milk fermented by yogurt cultures plus *Lactobacillus casei* DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress. *Eur J Nutr.* 43:381-389.
- McAuliffe O, Hill C, Ross RP. (2000) Each peptide of the two-component lactibiotic lactacin 3147 requires a separate modification enzyme for activity. *Microbiol.* 146:2147-2154.

- Miller KW, Schamber R, Osmanagaoglu O, Ray B. (1998) Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl Environ Microbiol.* 64:1997-2005.
- Moll G, Ubbink-Kok T, Hauge H, Nissen-Meyer J, Nes IF, Konings WN, Driessen AJM. (1996) Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two component bacteriocin. *J Bacteriol.* 178:600-605.
- Moll G, Hauge HH, Nissen-Meyer J, Nes IF, Konings WN, Driessen AJM. (1998) Mechanistic properties of the two-component bacteriocin lactococcin G. *J Bacteriol.* 180:96-99.
- Moll G, van der Akker HE, Hauge HH, Nissen-Meyer J, Nes IF, Konings WN, Driessen AJM. (1999a) Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins EF and JK. *J Bacteriol.* 181:4848-4852.
- Moll G, Konings W, Driessen A. (1999b) Bacteriocins: Mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76:185-198.
- Navaratna MADB, Sahl HG, Tagg JR. (1998) Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. *Appl Environ Microbiol.* 64:4803-4808.
- Nes IF, Håvarstein LS, Holo H. (1995) Genetics of non-lantibiotics bacteriocins. In: Ferretti, Gillmore, Klaenhammer, Brown ed. *Genetics of Streptococci, Enterococci, and Lactococci. Developments in Biological standards, Vol 85.* Basel, Krager. 1995:645-651.
- Nes IF, Diep DB, Håvarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H. (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70:128-133.
- Nes IF, Holo H, Fimland G, Hauge HH, Nissen-Meyer J. (2002) Peptide antibiotics: Discovery, Modes of Action, and Applications. Dutton, CJ, Haxell MA, McArthur HAI, Wax RG. Side 81-115. Marcel Dekker, New York, 2001.
- Nieto Lozano JC, Nissen-Meyer J, Sletten K, Pelaz C, Nes IF. (1992) Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J Gen Microbiol.* 138:1985-90.
- Nissen-Meyer J, Holo H, Håvarstein S, Sletten K, Nes I.F.A. (1992) A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J Bacteriol.* 174:5686-5692.
- Nissen-Meyer J, Håvarstein LS, Holo H, Sletten K, Nes IF. (1993) Association of the lactococcin A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J Gen Microbiol.* 139:1503-1509.
- Nissen-Meyer J, Nes IF. (1997) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Arch microbial.* 167:67-77.

- Nissen-Meyer J, Hauge HH, Fimland G, Eijsink VGH, Nes IF. (1997) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria: Their function, structure, biogenesis, and their mechanism of action. *Recent Res Devel in Microbiology*. 1:141-154.
- Oppegård C. (2005) Analysis af the two-peptide bacteriocins lactococcin G and enterocin 1071 by the use of *in vitro* site-directed mutagenesis. Thesis for the degree of master of molecular biosciences. Department of Molecular Biosciences, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo, Pb 1041 Blinden, 0316 Oslo, Norway
- Oppegård C, Rogne P, Emanuelsen L, Kristiansen PE, Fimland G, Nissen-Meyer J. (2006) The two-peptide Class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. Department of Molecular Biosciences, University of Oslo, Pb 1041 Blinden, 0316 Oslo, Norway
- Papagianni M. (2003) Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*. 21:465-499.
- Quadri LEN, Sailer M, Terebiznik MR, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME. (1995) Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J Bacteriol*. 177:1144-1151.
- Riley MA, Wertz JE. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Ann Rev Microbiol*. 56:117-137.
- Skeie M. (1997) Studier av struktur-funksjonsforhold hos fire pediocinlignende bakteriosiner. Hovedfagsoppgave i biokjemi. Institutt for molekylær biovitenskap, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo.
- Sprules T, Kawulka KE, Vederas JC. (2004) NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. *Biochemistry* 43:11740-11749.
- Stoddard GW, Petzel JP, van der Belkum MJ, Kok J, McKay LL. (1992) Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. *Appl Environ Microbiol*. 58:1952-1961.
- Uteng M, Hauge HH, Brondz I, Nissen-Meyer J, Fimland G. (2002) Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Appl Environ Microbiol*. 68:952-956.
- Uteng M, Hauge HH, Markwick PR, Fimland G, Mantzilas D, Nissen-Meyer J, Muhle-Goll C. (2003) Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry*. 42:11417-11426.

- van de Guchte M, van der Vossen JMBM, Kok J, Venema G. (1989) Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 55:224-228.
- Venema K, Haverkort RE, Abee T, Haandrikman AJ, Leenhouts KJ, de Leij L, Venema J, Kok J. (1994) Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol Microbiol.* 14:521-532.
- Wang Y, Henz ME, Fregeau Gallagher NL, Chai S, Gibbs AC, Yan LZ, Stiles ME, Wishart DS, Vederas JC. (1999) Solution structure of carnobacteriocin B2 and implication for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry.* 38:15438-15447.
- Worobo RW, van Belkum MJ, Sailer M, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME. (1995) A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium devergens*. *J Bacteriol.* 177:3143-3149.
- Zaslhoff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415:389-395.
- Zendo T, Koga S, Shigeri Y, Nakayama J, Sonomoto K. Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. *Appl Environ Microbiol.* 72:3383-3389.

Vedlegg

Vedlagt følger en del av sekvensen til lactococcin G-operonet. Genene LagA (koder for lactococcin G α -peptidet og dets ledersekvens), LagB (koder for lactococcin G β -peptidet og dets ledersekvens), LagC (koder for immunitetsproteinet) og begynnelsen av LagD (koder for ABC-transporteren) er vist med fet skrift og piler.

```

                                ↓start LagA(ledersekvens)
21 5'-aaaaggagaatTTTTatgaagaattatcagaaaaagaattacgagaatgCGTtggCGgt      80
   3'-TTTTcctcttaaaaatactttcttaatagTctTTTTcttaatgctcttacgcaaccgcca

1      K R R I F M K E L S E K E L R E C V G G
2      K G E F L * K N Y Q K K N Y E N A L A V
3      K E N F Y E R I I R K R I T R M R W R W

4      F P S N K H F F * * F F F * S F A N A T
5      L L L I K I F S N D S F S N R S H T P P
6      Y F S F K * S L I I L F L I V L I R Q R

81 ggaacttgggatgatattgggtcaaggaataggaagagtcgcttattgggttggaaaagcc      140
   ccttgaaccctactataaccagttccttatccttctcagcgaataaccecaaccttttcgg

1      G T W D D I G Q G I G R V A Y W V G K A
2      E L G M I L V K E * E E S L I G L E K P
3      N L G * Y W S R N R K S R L L G W K S H

4      S S P I I N T L S Y S S D S I P N S F G
5      P V Q S S I P * P I P L T A * Q T P F A
6      H F K P H Y Q D L F L F L R K N P Q F L

                                stopp LagA↓
141 atgggaaatagagcgatgTTaatcaagcttctagaattaatagaaaaaagaacactaa      200
   tacctttatactcgtacaattagttcgaagatcttaattatctTTTTctttgtgatt

1      M G N M S D V N Q A S R I N R K K K H *
2      W E I * A M L I K L L E L I E K R N T N
3      G K Y E R C * S S F * N * * K K E T L I

4      H S I H A I N I L S R S N I S F L F V L
5      M P F I L S T L * A E L I L L F F F C *
6      W P F Y S R H * D L K * F * Y F F S V S

                                start LagB(ledersekvens)↓
201 tttataagacttataatatttagcaaaatattggagagtgaagtatatatgaaaaataataat      260
   aaatattctgaatattataaatcgTTTTatacctctcacttcatatactTTTTattatta

1      F I R L I I F S K I W R V K Y M K N N N
2      L * D L * Y L A K Y G E * S I * K I I I
3      Y K T Y N I * Q N M E S E V Y E K * * *

4      K Y S K Y Y K A F Y P S H L I H F I I I
5      N I L S I I N L L I H L T F Y I F F L L
6      I * L V * L I * C F I S L S T Y S F Y Y

```

261 **aatTTTTcaagggtatggaaataattgaagatcaagaattagtttcaataactggaggg** 320
ttaaaaaagttcccatacctttattaacttctagttcttaatacaagttattgacctccc

1 **N F F K G M E I I E D Q E L V S I T G G**
2 I F S R V W K * L K I K N * F Q * L E G
3 F F Q G Y G N N * R S R I S F N N W R E

4 I K E L T H F Y N F I L F * N * Y S S P
5 L K K L P I S I I S S * S N T E I V P P
6 Y N K * P Y P F L Q L D L I L K L L Q L

321 **aaaaaatggggctggctagcttgggtagaccagcttatgaatttatcaagggtttgggt** 380
ttttttaccccgaccgatcgaacctatctgggtcgaataacttaaatagttcccgaacca

1 **K K W G W L A W V D P A Y E F I K G F G**
2 K N G A G * L G * T Q L M N L S R A L V
3 K M G L A S L G R P S L * I Y Q G L W *

4 F F P A P * S P Y V W S I F K D L A K T
5 F F H P Q S A Q T S G A * S N I L P K P
6 S F I P S A L K P L G L K H I * * P S Q

381 **aaagggtcaattaagaaggaaataaagataagtggaataatctgacgagtaactttt** 440
ttccacggttaatttcttctttatttctattcacctttttatagactgctcattgaaaa
↓stopp LagB

1 **K G A I K E G N K D K W K N I * R V T F**
2 K V Q L K K E I K I S G K I S D E * L L
3 R C N * R R K * R * V E K Y L T S N F C

4 F T C N F F S I F I L P F I D S S Y S K
5 L P A I L S P F L S L H F F I Q R T V K
6 Y L H L * L L F Y L Y T S F Y R V L L K

441 **gtagattaaataaggcaagtagtttagttaagctatttgctttttattatggttgaagaa** 500
caatctaattttatccgttcatcaaatcaattcgataaacgaaaataataccaacttctt

1 V R L N K A S S L V K L F A F I M V E E
2 L D * I R Q V V * L S Y L L L L W L K N
3 * I K * G K * F S * A I C F Y Y G * R I

4 N S * I L C T T * N L * K S K N H N F F
5 T L N F L A L L K T L S N A K I I T S S
6 Q * I L Y P L Y N L * A I Q K * * P Q L

501 **tttacaaaaagaagggataacaatttttggttaataatagtagttttataaattttt** 560
aatgtttttcttccctattgttaaaaacaaattattatcatcaaaaatatttaaaaa
↓start LagC

1 F T K R R D N N F C L I I * * F L * I F
2 L Q K E G I T I F V * * Y S S F Y K F F
3 Y K K K G * Q F L F N N I V V F I N F L

4 K C F S P I V I K T * Y Y L L K * L N K
5 N V F L L S L L K Q K I I Y Y N K Y I K
6 I * L F F P Y C N K N L L I T T K I F K

| | | |
|-----|---|-----|
| 561 | taagctttgtattttattctttagtgtagatattaataataatgacaatcggataaaga attcgaacataaataagaacatccacatctataatttatattactgttagcctatttct | 620 |
| 1 | * A L Y L F L * V * I L N I M T I G * R | |
| 2 | K L C I Y S C R C R Y * I * * Q S D K D | |
| 3 | S F V F I L V G V D I K Y N D N R I K I | |
| 4 | L S Q I * E Q L H L Y * I Y H C D S L S | |
| 5 | * A K Y K N K Y T Y I N F I I V I P Y L | |
| 6 | K L K T N I R T P T S I L Y L S L R I F | |
| 621 | tagtacatggttactttttttatttagtttcatttttagtaatgctaacaagtttaatatcac atcatgtacaatgaaaaaaaaataatcaaagtaaaatcattacgattgttcaaattatagtg | 680 |
| 1 | * Y M L L F L L V S F * * C * Q V * Y H | |
| 2 | S T C Y F F Y * F H F S N A N K F N I T | |
| 3 | V H V T F F I S F I L V M L T S L I S H | |
| 4 | L V H * K K * * N * K L L A L L N L I V | |
| 5 | Y Y M N S K K N T E N * Y H * C T * Y * | |
| 6 | I T C T V K K I L K M K T I S V L K I D | |
| 681 | ataatagcattgcatatagcttatcacaattttggaaattttatgtataatttgattt tattatcgtaacgtatatcgaatagtgtttaaacctttaaaatacatattaacataaa | 740 |
| 1 | I I A L H I A Y H K F W K F Y V * F V F | |
| 2 | * * H C I * L I T N F G N F M Y N L Y F | |
| 3 | N S I A Y S L S Q I L E I L C I I C I L | |
| 4 | Y Y C Q M Y S I V F K P F K I Y L K Y K | |
| 5 | M I A N C I A * * L N Q F N * T Y N T N | |
| 6 | C L L M A Y L K D C I K S I K H I I Q I | |
| 741 | tgcttttgttttatattttgaaaaaactaactcactaagtaatagagctaattggtgat acgaaaaacaaaataaaaacttttttttgattgagtgattcattatctcgattacaccata | 800 |
| 1 | C F C F I F * K K L T H * V I E L M W Y | |
| 2 | A F V L Y F E K N * L T K * * S * C G I | |
| 3 | L L F Y I L K K T N S L S N R A N V V F | |
| 4 | A K T K Y K S F F * S V L Y Y L * H P I | |
| 5 | Q K Q K I N Q F F S V * * T I S S I H Y | |
| 6 | K S K N * I K F F V L E S L L L A L T T | |
| 801 | ttattatttttatcgttactcaagttattataatcataaatcaattatttattagtgat aataataaaaatagcaatgagttcaataatattagttatttagttaataaataatccacta | 860 |
| 1 | L L F L S L L K L L * S * I N Y L L G D | |
| 2 | Y Y F Y R Y S S Y Y N H K S I I Y * V I | |
| 3 | I I F I V T Q V I I I I N Q L F I R * F | |
| 4 | * * K * R * E L * * L * L D I I * * T I | |
| 5 | K N N K D N S L N N Y D Y I L * K N P S | |
| 6 | N I I K I T V * T I I I M F * N N I L H | |

stopp LagC1

↓start LagD
 861 tttatgaaaaaataatatatcaacaggatgaaaagattgtggagtagcttgtatagcc 920
 aaataactttttttattatatagttgtcctacttttttctaacacctcatcgaacatatcgg

1 F M K K I I Y Q Q D E K D C G V A C I A
 2 L * K K * Y I N R M K K I V E * L V * P
 3 Y E K N N I S T G * K R L W S S L Y S H

4 K H F F Y Y I L L I F F I T S Y S T Y G
 5 K I F F I I Y * C S S F S Q P T A Q I A
 6 N * S F F L I D V P H F L N H L L K Y L

921 atgattttaaacattatgggtaccgaaattactattcaaaggttgcgtagaactttctggg-3' 980
 tactaaaattttgtaataaccatggctttaatgataagttccaacgcacttgaaagacc-5'

1 M I L K H Y G T E I T I Q R L R E L S G
 2 * F * N I M V P K L L F K G C V N F L G
 3 D F K T L W Y R N Y Y S K V A * T F W D

4 H N * F M I T G F N S N L P Q T F K R P
 5 M I K F C * P V S I V I * L N R S S E P
 6 W S K L V N H Y R F * * E F T A H V K Q