

Afslutningsrapport

Varmechok i *Lactococcus* - Reguleringsmekanismer
og mutanter i stressrespons

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2002-43

Marts 2002



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport

for FØTEK samarbejdsprojektet

Varmechoke i *Lactococcus*: Reguleringsmekanismer og mutanter i stressrespons

Personale:

Ansæt på projektet:

DTU: Forskningsadjunkt Allan Nielsen: 1.1.1998-30.04.00
Forskningsadjunkt Heidi Winterberg Andersen: 1.6.00- 31.7.01
Laborant Ahmad Abdul-Al: (½ tids) 1.10.98-31.12.00
KVL: Forskningsadjunkt Pekka Varmanen: 1.5.1998-31.7.2001
Laborant Charlotte Rasmussen: 15.4.1999-15.10.2000

Tilknyttet projektet:

DTU: Lektor Mogens Kilstrup, Mol.Mikrobiologi, BioCentrum-DTU (hele perioden)
Professor Karin Hammer, Mol.Mikrobiologi, BioCentrum-DTU (hele perioden)
Laborant Marzanne D. Pulka-Amin

KVL: Lektor Finn K. Vogensen, Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet (hele perioden)
Lektor Hanne Ingmer, Veterinær Mikrobiologi (hele perioden)
Studerende Gitte Gadegaard Larsen. Efterår 1999 og efterår 2000.
Gæsteforsker Kirsi Savijoki 01.01.2000- 31.12.2000. Finansieret af finske forskningsmidler.

Projektet afsluttet 30.09.01

Resumé (Dansk)

I projektet er der identificeret to forskellige varmechok regulatorer i *Lactococcus lactis*, som har vist sig at regulere hver sin gruppe af chaperone gener. HrcA repressoren kontrollerer expressionen af *hrcA-grpE-dnaK* og *groESL* operonerne samt *dnaJ* genet medens CtsR repressoren regulerer *ctsR-clpC-orf555*, *orf1-clpE* og *groESL* operonerne, derudover reguleres *clpB* og *clpP* generne. Udtrykket af GroELS chaperonen er således underlagt begge varme chok systemer. For at opklare funktionen af de varme chok regulerede chaperoner og repressorer, blev der konstrueret deletions mutanter i *ctsR*, *clpB*, *clpC* og *clpE* generne. *ClpC* og *clpE* mutanterne opførte sig som vildtypen, medens *clpB* mutanten voksede langsomt ved 30°C sammenlignet med vildtypestammen, men ikke ved højere temperatur. *clpB* mutanterne er derfor tilsyneladende kuldesensitive. Det var muligt at konstruere både *clpB clpC* og *clpB clpE* dobbeltmutanter men vi isolerede ikke en *clpC clpE* dobbeltmutant. CtsR mutanten indeholdt som forventet forhøjet udtryk af *clp* gener. Analyse af ClpE mutanten tyder på, at ClpE chaperonen in vivo hjælper med at folde eller stabilisere CtsR repressoren. For de HrcA regulerede gener var det kun muligt at opnå inaktivering af *hrcA* genet ved plasmid insertion. Denne mutant havde forhøjede niveauer af GroELS chaperonen og DnaJ, men var temperatur sensitiv formentlig på grund af lav expression fra de nedstrøms *grpE* og *dnaK* gener. I et tidligere MFF støttet projekt havde vi konstrueret insertion mutanter med inaktiverede *dnaK* og *dnaJ* gener, som begge var temperatur sensitive, men deletions mutationer i de HrcA regulerede gener har vist sig umulige at opnå. Disse forsøg understreger den forskellige betydning af chaperoneproteinerne for laktokokkens overlevelse. De HrcA regulerede chaperoner ser ud til at være vitale for cellens overlevelse, mens Clp proteinerne lettere kan undværes, muligvis fordi de har delvist overlappende funktioner. Efter oprensning af HrcA og CtsR repressorerne i denatureret form kunne de renatureres, så de kunne binde til DNA som indeholdt bindings områder for de respektive regulatorer. Det blev vist for HrcA repressoren at GroELS chaperonen kunne forøge renatureringen betydeligt, specielt ved lave koncentrationer. Vore forsøg tyder derfor på at den chaperone der hjælper med at folde HrcA er GroELS, mens vi endnu ikke har afklaret om ClpE hjælper med at folde CtsR eller stabiliserer CtsR ved at hindre dets nedbrydning. Der er desuden fremstillet en række forskellige fusioner af chaperone-gener til rapportergener. Disse stammer kan anvendes til monitorering af påvirkninger af mælkesyrebakterierne, som inducerer det pågældende gen, enten på agarplader eller ved måling af enzymaktivitet. En vektor indeholdende et nyt og mere sensitivt rapportergen (*pepI* fra *Lactobacillus helveticus*) er også blevet konstrueret.

Resumé (Engelsk)

Two different heat shock regulators have been identified in *Lactococcus lactis*. The HrcA repressor has been shown to control expression of the *hrcA-grpE-dnaK* and *groESL* operons as well as the *dnaJ* gene, while the CtsR repressor controls the expression of the *ctsR-clpC-orf555*, *orf1-clpE* and *groESL* operons as well as the *clpB* and *clpP* genes. The expression of the GroELS chaperone is thus controlled by both repressors. In order to reveal the function of the heat shock regulated chaperones and repressors, deletion mutants were constructed in the *ctsR*, *clpB*, *clpC* and *clpE* genes. The *ClpC* and *clpE* mutants behaved as the wild type strain while the *clpB* mutant was growing slowly at 30°C compared to the wildtype strain, but not at higher temperature. The *clpB* mutation therefore apparently leads to cold sensitivity. It was possible to construct both *clpB clpC* and *clpB clpE* double mutants, but we did not obtain the *clpC clpE* double mutant. The CtsR mutant contained as expected high levels of the

clp genes. Analysis of the *clpE* mutant indicated that the ClpE chaperone in vivo helps to fold or stabilise the CtsR repressor. With respect to the HrcA regulated genes it was only possible to obtain *hrcA* mutants by plasmid insertion in the *hrcA* gene. This mutant contained increased levels of the GroELS chaperone and the DnaJ protein, but showed temperature sensitive growth, presumably due to the low expression of the *grpE* and *dnaK* genes, located downstream of the inserted plasmid. In a previously supported MFF project we had constructed insertion mutants with inactivated *dnaK* and *dnaJ* genes, and they were both shown to be temperature sensitive mutants. In the present project it turned out to be impossible for us to obtain deletion mutants in these genes. These experiments emphasize the different importance of the individual chaperone proteins for the survival of the lactococci. The HrcA regulated chaperones seem to be vital for the survival of the cells, while individual Clp chaperones are more easily dispensable, possibly due to partial overlapping functions. After purification of the HrcA and CtsR repressors in denatured forms, they were renatured and they were shown to be able to bind to DNA containing the respective binding sites (operators). It was shown for the HrcA repressor that the GroELS chaperone could increase the renaturing process considerable, particularly at low concentrations. Our experiments therefore strongly indicate that the chaperone GroELS helps to fold the repressor HrcA and ClpE either helps folding or protects CtsR from degradation. Also a number of different fusions of chaperone genes to reporter genes were constructed in the project. These strains could be used for monitoring conditions which are inducing the corresponding gene, either on agar plates or by measuring enzyme activity. A vector containing a new and more sensitive reporter gene (*pepI* from *Lactobacillus helveticus*) has also been constructed.

Formål:

Under varmekok sker der i *Lactococcus lactis*, som i alle andre organismer, en forøget syntese af en vigtig gruppe af proteiner, de såkaldte varmekok proteiner. Gruppen af varmekok proteiner omfatter en stor del af de såkaldte chaperone proteiner som er nødvendige for at genfolde varmedenaturerede proteiner der ophobes under varmekok. Foruden chaperonerne overudtrykkes en række proteaser som fjerner de denaturerede proteiner der ikke kan reddes af chaperonerne. Varmekok responset er dirigeret af to negativt virkende regulator proteiner, HrcA og CtsR, hvor kun HrcA var kendt ved projektets start, men dets funktion i laktokokker var ikke analyseret.

Hovedformålene i projektet har været

- at konstruere chaperone mutanter til analyse af hver enkelt chaperones funktion i cellen.
- En analyse af de regulatoriske mekanismer bag varme chok responset. Dette indebar konstruktion og analyse af
 - mutanter der mangler regulator proteinerne, samt af
 - fusions stammer hvor udtrykket af de individuelle chaperonegener let kan måles ved hjælp af fusioner til rapportergener.
 - Et sidste formål var en biokemisk analyse af HrcA repressorens foldning og binding til DNA.

The to hovedpunkter er imidlertid ikke helt adskildte idet det har vist sig at begge regulatorproteiner responderer på ændringer i tilgængeligheden af chaperoner for foldning.

Baggrund:

Under varmechok sker der i *Lactococcus lactis*, som i alle andre organismer, en kraftig opregulering af omkring 20 til 30 proteiner. I et tidligere samarbejdsprojekt med MFF, blev en del af disse proteiner identificeret. Blandt de varmechok regulerede proteiner blev de kendte chaperone komplekser: DnaK-DnaJ-GrpE og GroEL-GroES, samt chaperonerne ClpB, ClpC og ClpE fundet.

Chaperonerne er underlagt to forskellige varmechok regulations systemer. Begge systemer opererer på det genetiske niveau ved hjælp af transkriptions repressorer. DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL og GroES transkriberes i tre enheder: *hrcA-grpE-dnaK* og *groES-groEL* operonerne og det enlige *dnaJ* gen. I promoterområderne for disse tre enheder findes en bestemt DNA sekvens (kaldet CIRCE element), som genkendes af varmechok repressoren HrcA (Fig 2). Denne repressor kodes af det første gen (*hrcA*) i *dnaK* operonen (Hansen et al (2001) J.Bacteriol. 183:4747-4751) Clp proteinerne transkriberes i fire enheder: *ctsR-clpC-orf555* operonen, *clpB*, *clpP* og *clpE* generne (Fig.YY). I løbet af projektperioden er varmechok regulationen af *clp* generne i gram-positive bakterier blevet delvist opklaret. CtsR repressoren, som er kodet af det første gen i *ctsR-clpC-orf555* operonen er vist at være ansvarlig for denne regulation (Varmanen et al. 2000).

Chaperonernes funktion i cellen er at detektere og reparere proteiner som ikke er foldet korrekt. Detektion er imidlertid ikke så enkel da der findes uendelig mange måder proteiner kan foldes på. Der findes imidlertid en enkelt regel som alle korrekt foldede proteiner ser ud til at følge, nemlig at der ikke må findes mange hydrofobe aminosyrer på overfladen. Hvis proteiner havde store hydrofobe områder på overfladen ville disse have høj affinitet til hydrofobe områder på andre proteiner og det ville medføre klumpning. Chaperoner genkender hydrofobe områder på proteiner, og proteinerne vil være substrat for chaperonerne indtil disse områder forsvinder ved chaperonernes mellemkomst. De fleste chaperoner hydrolyserer ATP under induktion af lokale konformationsændringer, hvilket forøger chancerne for at proteinerne foldes korrekt. Da chaperone komplekserne har delvist overlappende funktion var det et vigtigt punkt at opklare hver chaperones specifikke funktion i cellen. Det var derfor planen at alle de vigtigste chaperoner skulle ændres ved mutagenese, både i form af total fjernelse af gener og i form af små ændringer.

Ved projektets start havde vi udarbejdet en model for HrcA repressorens mekanisme for varmechok regulation, som viste sig at i det store og hele at holde stik. Som en parallel til den velundersøgte varmechok regulation i gram-negative bakterier, forventede vi, at HrcA repressoren krævede chaperone assistance for at kunne binde til DNA. Under varmechok vil mange af cellens proteiner blive misfoldede, hvilket vil beslaglægge chaperone kapaciteten. Effekten af den følgende mangel på "ledige" chaperoner vil blive at HrcA repressoren ikke foldes korrekt, hvorfor de HrcA regulerede gener ikke mere represseres.

RESULTATER:

Karakterisering af varmekhok gener:

Nukleotid sekvens og transkriptions analyse af *ctsR-clpC-orf555* operonen.

Sekvens data fra *L. lactis* IL1403 viste at der i denne stamme fandtes der en læseramme der var homolog med *ctsR* genet fra *Bacillus subtilis*. CtsR var i starten af vores projekt blevet fundet at kode for en repressor der kontrollerede varmekhok responset for de såkaldte klasse III gener i *Bacillus subtilis* (Derre et al (1999) Mol. Microbiol. 31, 117-131). Vi identificerede og sekventerede det tilsvarende gen fra MG1363. Det lå umiddelbart opstrøms for *clpC*. Der blev fundet en promoter med et næsten konserveret CtsR bindingssted foran *ctsR* genet (Fig 1). Analyse af *ctsR* genet viste, at den N-terminale del af laktokok CtsR ligner CtsR fra *B. subtilis*. De har begge et konserveret DNA bindende domæne i dette område. Derimod er den C-terminale del af laktokok CtsR meget mere hydrofob end den tilsvarende fra *B. subtilis*.

Nedenfor *clpC* starter en læseramme på 555 bp (*orf555*). ORF555 har homologi til et *B. subtilis* protein YvyD, som indgår i visse stress-regulons i *B. subtilis*, bl.a. aminosyre sult. Nedenstrøms for *orf555* findes en terminatorstruktur der antyder at *orf555* er sidste gen i en tricistronisk operon. Dette blev bekræftet ved Northern Blot analyse, der desuden viste, at udover fra promoteren foran *ctsR* blev *orf555* også udtrykt fra en promoter der lå i de 139 bp mellem *clpC* og *orf555*. Analysen viste at denne sidste promoter blev aktiveret af varmekhok, men ikke af andre anvendte chok betingelser (pH, salt, kulde, aminosyre sult).

CtsR (class three stress gene regulator) controls *clp* gene expression under heat shock

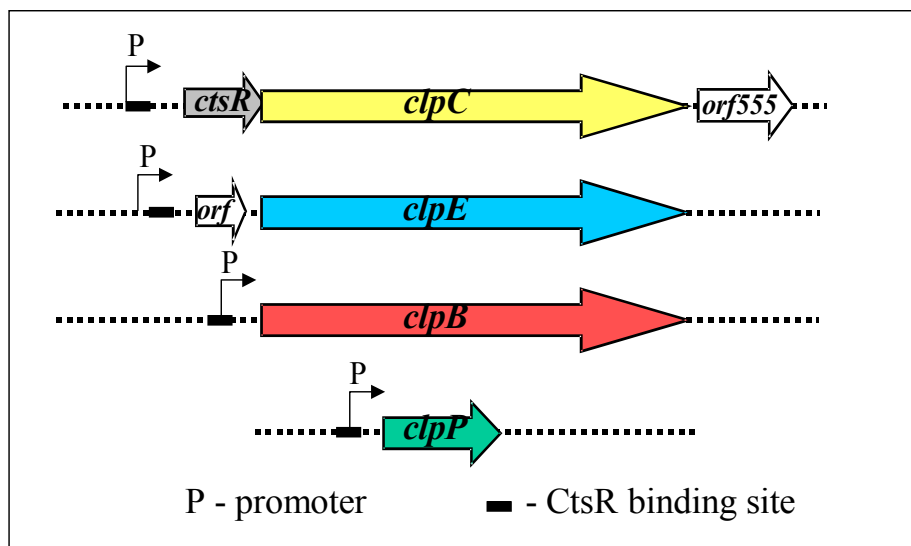


Fig. 1 Genetisk organisation af CtsR regulerede gener i *L. lactis*. Generne er angivet som farvede pile medens genkendelses stederne for CtsR repressoren er angivet som sorte kasser.

Sekvens- og Northern Blot analyse viste desuden at *clpB*, og *clpP* er monocistroniske, mens *clpE* sandsynligvis aflæses sammen med en ekstra læseramme fra en promoter

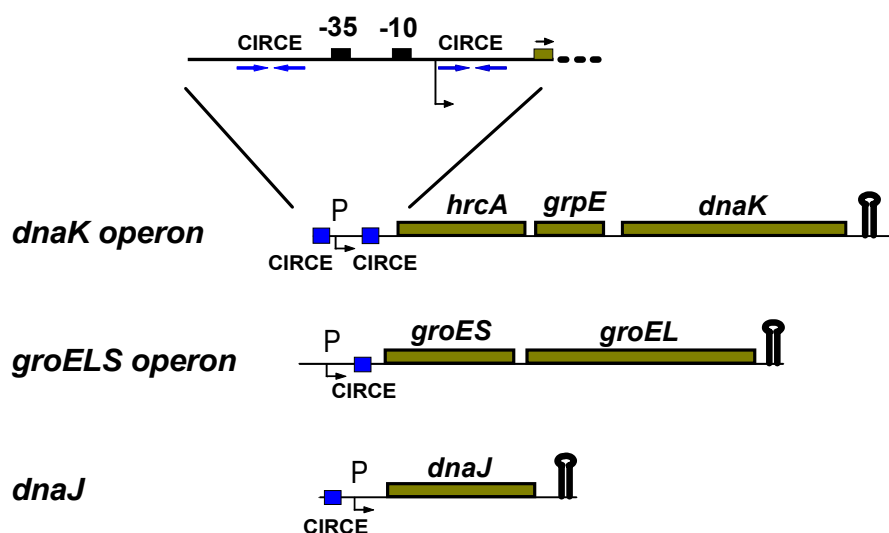
før denne (Fig 1). Der blev fundet CtsR bindingssteder i promoterområderne for *clpB*, *clpE*, og *clpP*.

Nukleotid sekvens af *groESL* operonen.

Ved projektets start var nukleotidsekvensen af alle HrcA regulerede gener i *L. lactis* offentliggjort, men transkriptions start punktet for disse gener var ikke bestemt. Til denne analyse måtte vi først bestemme sekvensen for *groESL* operonen fra subspecies *cremoris*. Sekvensen er nu deponeret i Genbank under accession nummeret AY029215.

Mapning af transkriptions start for *dnaJ* genet samt *groESL* og *hrcA-grpE-dnaK* operonerne.

Transkriptions starten blev bestemt for alle HrcA regulerede gener ved hjælp af primer extension. Forsøgene viste at promotorerne var placeret som forventet, med en enkelt promoter foran hver transkriptions enhed (Fig 2).



(CIRCE = Controlling Inverted Repeat
for Chaperone Expression)

Fig. 2 Genetisk organisation af HrcA regulerede gener i *L. lactis*. Generne er angivet som brune kasser medens genkendelses stederne for HrcA repressoren (CIRCE elementerne) er angivet som blå kasser.

Konstruktion af og isolering af nulmutanter i *clpB*, *clpC* og *clpE* generne.

Vi havde i et tidligere samarbejdsprojekt med MFF konstrueret og analyseret insertionsmutanter i *clpC*, *clpE* og *clpB* generne. Der var kun blevet iagttaget svage fænotypiske ændringer i mutanterne i forhold til vildtypen. Vi ville undersøge om dette skyldtes at de enkelte Clp genprodukter kan substituere for hinanden og fremstillede derfor nulmutanter ved deletion af et stort stykke af hvert gen og forsøgte at kombinere flere af disse i samme stamme. Det lykkedes at fremstille $\Delta clpB$, $\Delta clpC$ og $\Delta clpE$ mutanter i MG1363 samt $\Delta clpC \Delta clpB$ og $\Delta clpE \Delta clpB$ dobbelt mutanter.

Vi troede i lang tid at vi også havde fremstillet $\Delta clpC \Delta clpE$ dobbelt mutanten og trippelmutanten $\Delta clpC \Delta clpB \Delta clpE$, men de viste sig ikke at være korrekte, da stammerne ved en teknisk fejl havde fået genetableret *clpC* vildtypegenet.

For $\Delta clpC$ og $\Delta clpE$ mutanterne sås ingen vækstfænotyper der adskilte sig fra vildtypen. For $\Delta clpB$ fik vi to kolonivarianter, en der voksede normalt ved 30°C (ii) og en der var langsomt voksende (i) (tabel 1). Southern Blot analyser viste, at begge varianter har *clpB* deletionen. Den hurtigt voksende har derfor formentlig en sekundær mutation, der suppresserer *clpB* deletionen. Ved en gentagen konstruktion af *clpB* insertionsmutanten så vi også disse to kolonifænotyper. Disse suppresserende mutationer forekommer med høj frekvens. Kombinationen af deletionsmutanterne $\Delta clpC \Delta clpB$ havde samme fænotype som den (ved 30°C) langsomt voksende $\Delta clpB$ (i), mens den konstruerede $\Delta clpE \Delta clpB$ mutant opførte sig som den hurtigt voksende $\Delta clpB$ variant (ii). Endelig opfører den $\Delta clpE \Delta clpB$ dobbeltmutant som vi oprindeligt troede var en trippelmutant sig helt anderledes, idet den hverken vokser ved 37°C eller i tilstedeværelse af 20 µg/ml puromycin (Tabel 1). Vi kan ikke i øjeblikket forklare hvad der sker, når vi fremstiller en $\Delta clpB$ mutant.

Tabel 1. Vækst fænotyper af chaperone mutanter

Stamme	Vækst på GM17 plader ved 30°C	Vækst på GM17 plader ved 37°C	Vækst på GM17 plader + puromycin ved 30°C
MG1363 vildtype	+++	+	(+)
MG1363 $\Delta clpB$ (i) PV11	+	++	++
MG1363 $\Delta clpB$ (ii) PV10	+++	+	(+)
MG1363 $\Delta clpC$ HI1924	+++	+	(+)
MG1363 $\Delta clpE$ HI1931	+++	+	(+)
MG1363 $\Delta clpB$, $\Delta clpC$ HI2053	+	++	++
MG1363 $\Delta clpB$, $\Delta clpE$ HI2051	+++	+	(+)
MG1363 $\Delta ctsR$ PV1	++	(+)	(+)
MG1363 $\Delta ctsR$ PV2	++	(+)	(+)
MG1363 <i>hrcA</i> <i>insertion</i> AN1	++	-	Ikke foretaget
MG1363 <i>dnaK</i> <i>insertion</i> BK6	+	-	Ikke foretaget
MG1363 <i>dnaJ</i> <i>insertion</i> KIS1001	+++	-	Ikke foretaget

+++ betyder god vækst; - ingen vækst. Efter 48 timers inkubation

Alle *clp*-nulmutanterne var alle lige følsomme over for fem forskellige fager, c2, sk1, ø712, p2, jj50, der angriber MG1363.

Forsøg på konstruktion af *dnaK* og *grpE* nulmutanter.

I forbindelse med det tidligere samarbejdsprojekt med MFF havde vi fremstillet en mutant hvor *dnaK* var inaktiveret med en insertion mutation. Denne mutant havde en temperatur sensitiv fænotype, og udviste en forøget syntese af de fleste chaperoner. Det var imidlertid uklart om begge fænotyper var forårsaget af mangelen på DnaK protein, eller om de regulatoriske effekter kunne skyldes, at ophobning af en inaktiv stump af DnaK proteinet påvirkede varmechok regulationen, fordi proteinstumpen beslaglagde chaperonerne. Vi forsøgte derfor at konstruere en $\Delta dnaK$ mutant hvor hele *dnaK* genet var fjernet. Dette projekt har været ekstremt arbejdskrævende og på trods af stadig gentagne forsøg lykkedes det aldrig. Hver gang vi har forsøgt at klonede dele af *dnaK* genet i *E. coli*, og virkelig har presset metoderne til det yderste, har vi fået kloner med plasmider hvor *dnaK* genet indeholder mutationer. På samme måde har det været umuligt at opnå $\Delta grpE$ mutanter.

Hvis der skal uddrages en lære af en sammenligning mellem den succesfulde konstruktion af *clp* deletioner og manglen på tilsvarende deletioner af proteiner fra DnaK chaperone komplekset kunne det være at jo større fænotypiske ændringer en chaperone mutation giver, jo sværere er det at opnå den.

Regulation af varmechok gener:

Som tidligere nævnt har vort arbejde vist, at der findes der to varmechok regulations systemer i *Lactococcus*, som hver regulerer sit eget set af gener. CtsR repressoren regulerer alle *clp* generne, hvorimod HrcA regulerer DnaK og GroE chaperone komplekserne. I det følgende vil først arbejdet med CtsR regulation og siden HrcA regulation blive beskrevet.

Konstruktion og karakterisering af *ctsR* nul-mutanter.

For at påvise at CtsR er involveret i reguleringen af *clp*-generne i *Lactococcus*, blev der først konstrueret to in-frame deletionsmutanter i *ctsR* genet. Den ene af disse (benævnt PV1) havde mistet 2/3 af genet og kodede ikke længere for det mulige DNA-bindende domæne i den N-terminale del, mens den anden (PV2), der havde mistet 1/3 af genet, stadig havde dette domæne.

Udtrykket af *clpP*, *clpB*, *clpC* og *clpE* viste sig ved Northern blot analyse at være kraftigt forøget i PV1 ved 30°C. Dette viser, at det muterede CtsR protein ikke længere kan hæmme udtrykket af disse gener, og vi kan derfor konkludere at CtsR virker som en repressor af udtrykket af *clp*-generne. Fra 5-30 min efter varmechok ved 43°C i PV1 mutanten sås ingen forøget induktion for *clpP*, hvilket tyder på at *clpP* udelukkende er reguleret af CtsR. *clpB* og *clpE* blev induceret mere end 2 gange ved varmechok i samme forsøg. Hvorvidt der sker induktion af *clpC* under varmechok i PV1 stammen er ikke klart, fordi *clpC* i forvejen ikke induceres særlig kraftigt af varmechok. Resultaterne viser at der ud over CtsR findes yderligere heat chok kontrolmekanismer for *clpB* og *clpE*. I tilsvarende undersøgelser med PV2 stammen så vi at *clp*-generne fortsat var delvist represseret ved 30°C, ligesom der skete en induktion af alle *clp*-generne ved varmechok. CtsR mutantproteinet i PV2 stammen har således bibeholdt en del af sin repressoraktivitet.

Udtrykkene af *clp* gener i henholdsvis vildtype stammen og PV1 mutanten blev undersøgt ved en række stress betingelser. I vildtypen MG1363 induceres *clpB* og *clpC* ved kulde- (10°C) og saltchok (2,5 % NaCl), men ikke under pH stress (pH 5,0),

mens *clpE* og *clpP* induceres af pH stress og saltchok, men ikke af kuldechok. I PV1 stammen blev der ligeledes set induktion af *clpB* og *clpC* under kuldechok, hvilket indikerer, at CtsR ikke er involveret i reguleringen af *clpB* og *clpC* under kuldechok. Til sammenligning kan det nævnes, at *clpC*, *clpE* og *clpP* i *B. subtilis* er under kontrol af en ukendt regulationsmekanisme ud over CtsR.

Ved 2-D gelelektroforese af radioaktivt mærkede proteiner, isoleret fra PV1 mutanten ved normal vækst ved 30°C, sås et øget udtryk af ClpE og ClpP samt flere andre proteiner med ukendt funktion. Derimod så vi ikke øget udtryk af ClpB. Årsagen til dette er ikke kendt, men skyldes formentlig tekniske problemer, idet vi heller ikke så induktion af ClpB under varmechok i vildtypen i parallelforsøgene, hvilket vi tidligere har set.

PV1 og PV2 stammerne vokser langsommere end MG1363 i GM17 ved både 30°C (10 %) og 37°C (33 %) (se Tabel 1). Dette indikerer at det forøgede udtryk af *clp*-generne hæmmer væksten både ved normal og høj temperatur. Vi så ingen ændringer i følsomheden over for salt (4 og 5 % NaCl), kulde (10 °C) og puromycin (20 µg/ml). Der var heller ingen forandring i mutanternes overlevelse ved høj temperatur (53°C, 15 min), eller deres evne til at inducere termotolerance (forinkubering ved 40°C inden 53°C i 15 min). Der sås ingen ændringer af PV1's fagfølsomhed.

Konstruktion og analyse af *clpP-gusA*, *ctsR-clpC-gusA*, *clpE-gusA* og *orf555-gusA* promoterfusioner.

For på en simpel måde at kunne analysere genekspressionen af *clpP*, *clpC*, *clpE* og *clpB* generne *in vivo* konstruerede vi fusioner mellem de respektive promotorer og et rapportergen. Som rapportergen anvendte vi i første omgang *gusA* genet fra *E. coli*. Promotorerne for *clpP*, *ctsR-clpC*, *clpE*, samt 2 forskellige dele af promotoren for *orf555* blev opformeret fra MG1363 og indsat i pLB85 vektoren foran *gusA* genet fra *E. coli* (Brøndsted & Hammer (1999) Appl. Environ. Microbiol. 65, 752-758). Promoterfusioner med korrekt nukleotidskevens blev derefter integreret på kromosomerne i *Lc. lactis* MG1363 (vildtype) og i PV1 stammen (Δ *ctsR*). *clpP-gusA* promoterfusionen blev integreret i Δ *clpP*, Δ *clpB*, Δ *clpC* og Δ *clpE* nulmutanterne udover i MG1363 og PV1 (se nedenfor).

Tabel 2: Reaktionen med *gusA* promoterfusioner på agar med X-gluc (kulhydrat analog der spaltes af GusA, og som spaltet frigiver en blå farve)

Stamme baggrund	<i>ctsR-clpC-orf555</i> -promoter fusion		<i>clpE</i> -promoter fusion		<i>clpP</i> -promoter fusion	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
Vildtype	Hvid	Hvid	Hvid	Sv. Blå	Hvid	Sv. Blå
Δ <i>ctsR</i> (PV1)	Hvid	Hvid	Blå	Blå	Blå	Blå
Δ <i>clpB</i>					Hvid	Sv. Blå
Δ <i>clpC</i>					Hvid	Sv. Blå
Δ <i>clpE</i>					Hvid	Sv. Blå
Δ <i>clpP</i>					Sv. Blå	Blå

Resultaterne af de indledende screeninger på agarassays er vist i tabel 2. På trods af det lave udtryk var det muligt at observere varmechok regulation fra alle promotorer undtagen i *ctsR-clpC-orf555 promoterfusionen*. Northern Blot analyser har vist at *ctsR-clpC* operonen er meget svagt udtrykt og selv under varmechok sker der kun en 2-3 gange forøgelse af *ctsR-clpC-orf555* mRNA. Vore undersøgelser viser at *gusA*

ikke er et godt rapportergen for svagt udtrykte gener, idet den specifikke aktivitet bliver for lav for sådanne fusioner.

Som nævnt indeholder *ctsR-clpC-orf555* operonen en promoter foran *orf555*. Promoterområdet indeholder et omvendte repeat opstrøms fra -10 og -35 regionen, som kunne have en regulatorisk funktion. Vi lavede to fusioner til *gusA* genet: En hvor repeat strukturen var med, en hvor repeatstrukturen mangler, men hvor -35 og -10 regionen stadig findes. Når fusionerne blev udtrykt i *E. coli* udviste det største promoterområde varmechok regulation (30°C til 38,5°C), hvorimod fusionen uden repeat strukturen var ureguleret. Disse eksperimenter kunne tyde på at repeatstrukturen er nødvendig for varmechok reguleringen af *orf555* og at den er uafhængig af *Lactococcus* proteiner da den kan ses i *E. coli*.

Introduktion af et nyt rapportergen, *pepI* fra *Lb. helveticus*, og analyse af *ctsR-clpC-pepI*, *clpB-pepI* og *orf555-pepI* promoterfusioner.

Da *ctsR-clpC* promoteren udtryktes meget svagt selv i PV1 stammen forsøgte vi om det var muligt at anvende et andet rapportergen i stedet for *gusA*. Valget faldt på *pepI* genet fra *Lb. helveticus*, dels fordi PepI fra *Lb. helveticus* har en meget høj specifik aktivitet, og derfor kan påvises selv om der ikke udtrykkes meget protein, dels fordi PepI fra *Lb. helveticus* er i stand til at spalte Pro-*p*-nitroanilid og Pro- β -naphtylamid peptidanalogerne under frigørelse af farvede forbindelser (Varmanen et al. (1996) *Microbiology* 142, 3459-3468). En vigtig faktor for anvendeligheden af *Lb. helveticus pepI* er at PepI fra *Lactococcus* (og flere andre mælkesyrebakterier) ikke kan spalte disse peptidanaloger. Efter udskiftning af *gusA* genet med *pepI* genet i pLB85 blev *ctsR-clpC-pepI* fusionen integreret i både MG1363 og PV1 stammerne. Ved 30°C ses 3-4 gange mere PepI aktivitet i PV1 end i MG1363 med *ctsR-clpC* fusionen. Disse tal er sammenlignelige med dem der findes fra Northern Blot analyse. Denne forskel er også tydelig på agarplade assays med Pro- β -naphtylamid som substrat. PepI fra *Lb. helveticus* er derfor et udmærket rapportergen til at undersøge udtrykket af især svagt udtrykte gener i *Lactococcus*.

Der var problemer med at konstruere *clpB*-promoterfusionen til *gusA* i *E. coli*, idet alle kloner der blev screenet indeholdt mutationer i promoterområdet af *clpB*. Vi søgte derfor at lave konstruktionen ved integration direkte i *Lc. cremoris* MG1363. Det lykkedes at lave en fusion uden mutationer med *clpB* promoteren til *pepI* ved at anvende pLB85 integrationsvektoren hvor *gusA* var blevet udskiftet med *pepI*. På plader med Pro- β -Naphtylamid er kolonier dyrket ved 37°C mere røde end kolonier dyrket ved 30°C. Vi har endnu ikke analyseret celleekstrakter for PepI aktivitet, og kan derfor ikke se om de forskelle vi ser alene skyldes varmechok respons, eller om der blot er tale om større specifik aktivitet af PepI ved 37°C end ved 30°C. Da konstruktionen er integreret kan den ikke overføres fra MG1363 til PV1 stammen som et plasmid. Vi har derfor forsøgt at overføre konstruktionen fra MG1363 til PV1 v.h.j.a. bakteriofag transduktion. Vi har forsøgt med fem forskellige lytiske fager (c2, p2, sk1, ø712, og jj50), men det er endnu ikke lykkedes.

Analyse af Clp proteiners virkning på CtsR repressorens aktivitet. I *B. subtilis* har det været foreslået en model for CtsR medieret varmechok regulation hvor CtsR proteinets aktivitet er afhængig af ClpC (Krüger et al. (2001) *EMBO J.* 20: 852-863). For at analysere dette, overførte vi den kraftigt regulerede *clpP*-promoterfusion til $\Delta clpP$, $\Delta clpB$, $\Delta clpC$ og $\Delta clpE$ nulmutanterne. Vi så ingen effekt af $\Delta clpB$ og $\Delta clpC$

mutationerne på udtrykket fra *clpP* promoteren. Derimod så vi i $\Delta clpE$ mutanten en ca. 2-fold forøgelse af udtrykket fra *clpP* promoteren ved høje temperaturer (37°C - 38,5 °C). Ved Northern Blot analyse af *clpP* ekspression under varmekok sås der i vildtype stammen en hurtig stigning i mængden af *clpP* mRNA efterfulgt af et fald efter ca 20 min. Faldet skete ikke så hurtigt i $\Delta clpE$ mutanten som i vildtype stammen. Da tilstedeværelsen af *clpE* på et plasmid i mutanten gav samme *clpP* mRNA kinetik som i vildtype stammen blev vi klar over at stabiliseringen af det høje *clpP* mRNA niveau skyldtes $\Delta clpE$ mutationen.

Stigningen i mRNA mængde umiddelbart efter varmekok skyldes ophævelse af CtsR repressionen, men det efterfølgende fald kan have flere årsager. Det kunne skyldes at I) mRNA var mere stabilt i $\Delta clpE$ mutanten, II) at ClpE helt eller delvist var ansvarlig for refolding (dvs. chaperone effekt) af CtsR så det efter varmekok igen kan binde til operator sitet, eller III) at CtsR på en anden måde er mere ustabil i en $\Delta clpE$. Vi kunne ikke se nogen forskel i *clpP* mRNA stabilitet i vildtype og $\Delta clpE$ mutant. Af fusionsstudierne se at der også i $\Delta clpP$ mutanten var en meget forøget ekspression (ca. 6-fold) fra *clpP*-promoterfusionen. Det er derfor en oplagt hypotese at ClpP er involveret i nedbrydningen af CtsR, og at fraværet af ClpE i $\Delta clpE$ -mutanten gør CtsR mere følsom over for proteolytisk nedbrydning. Hypotesen understøttes af studier i *B. subtilis* der har vist at ClpCP komplekset kan nedbryde CtsR, og at to proteiner, MscB og MscA, henholdsvis fremmer og inhiberer nedbrydningen (Krüger et al. (2001) EMBO J. 20: 852-863). Vi ville gerne have afprøvet vores hypotese ved at studere CtsR-proteinets stabilitet ved hjælp af Western Blot analyse med CtsR specifikt antistof, men der har været problemer med at få CtsR overført fra geler til PVDF membraner, så vi har ikke kunnet analysere om antistoffet vi har fået lavet mod CtsR er specifikt nok til analysen.

Vi og andre har observeret, at der findes et zink-finger motiv i den N-terminale del af ClpE som kunne være involveret i protein-protein interaktion. For at undersøge om dette var involveret in ClpE's rolle i nedreguleringen konstruerede vi en mutant hvor det ene af fire cysteiner (Cys-29) i motivet blev udskiftet med serin, og undersøgte om denne mutant kunne komplementere $\Delta clpE$ mutationen. Når Cys-29 er udskiftet med serin kan komplementering ikke længere finde sted, og *clpP* expressionen forblev høj efter varmekok. Det tyder på at zink-finger motivet er involveret i ClpE's funktion i nedreguleringen af *clpP*. Vi ville gerne i den sidste fase af projektet have fremstillet punktmutanter i *clpE* med henblik at analysere andre områder der er vigtige for ClpE's funktion. På grund af langvarig sygdom i foråret 2001 blev dette ikke nået. Vi havde håbet at gennemføre denne del efter projektets udløb, men har ikke kunnet finde finansiering til dette.

PCR-mutagenese af *ctsR*.

Flere forsøg viste at vi havde svært ved at klonere vildtype *ctsR* i *E. coli* (se også nedenfor). Denne egenskab blev anvendt sammen med PCR-mutagenisering til at selektere for muterede *ctsR* gener der kunne kloneres i *E. coli*. Mutagenese øgedes ved at anvende skæve pools af dNTP, samt ved anvendelse af mange PCR-cyklus. Disse muterede PCR fragmenter klonedes derefter i en vektor, pLB85, hvori promoteren opstrøms *ctsR* var indsat. Derved kom udtrykket af *gusA* genet der findes i pLB85 under kontrol af *ctsR* promoteren samt de mulige muterede CtsR proteiner. Vi forsøgte at screene for kolonier der blev mindre blå på X-gluc. I sådanne kolonier var det forventet at CtsR binder bedre til *ctsR*-operatorsitet. Vi analyserede dog 25

kolonier, der virkede mindre blå, og endte med 4 kloner der havde mutationer der gav anledning til 2-5 aminosyreændringer i CtsR. Målet var at overføre disse til *Lc. cremoris* MG1363 og til PV1 stammen og undersøge hvorledes disse opførte sig, og efterfølgende clone og oprense de muterede CtsR proteiner og undersøge deres bindinger til promoterregionerne. Det blev lagt på hylden p.g.a. de store problemer der var med at isolere CtsR i aktiv form.

Overudtryk, oprensning af CtsR og analyse af CtsR binding.

Der blev tidligt i projektet lavet flere forsøg på at overudtrykke CtsR i *E. coli*, først som et fusionsprotein til GST. Dette fusionprotein fik vi aldrig udtrykt i *E. coli*, selv om det tidligere er lykkedes at udtrykke andre stressproteiner i dette system. Vi forsøgte derefter med indsættelse af 6 ekstra histidin aminosyrer i proteinets N-terminus, en såkaldt His-tag. Det var nu muligt at udtrykke store mængder protein i *E. coli*, men uheldigvis fandtes proteinet på denatureret form i inklusionslegemer uanset induktionsbetingelser. Vi lagde derfor oprensningen af CtsR til side, men vi genoptog forsøget på at lave biologisk aktivt CtsR i slutningen af projektet efter at det var lykkedes Mogens Kilstrup at refolde HrcA ved solubilisering via 4 M Guanidium-HCl. Efter refoldning kunne vi ved gelretardering vise at CtsR bandt til *clpP*, *ctsR-clpC*, *clpE* og *clpB* promoterne, men som forventet ikke til *hrcA-dnaK-grpE* promotoren. Tiden har ikke tilladt at undersøge bindingen nærmere og heller ikke at se hvorledes de CtsR mutantproteiner vi isolerede ved PCR mutagenese (se ovenfor) opfører sig i tilsvarende studier.

Det His-Tag'ede protein blev også anvendt til at fremstille antistof mod CtsR, men som nævnt ovenfor har vi ikke kunne analysere dette antistofs specificitet ved Western Blot.

Konstruktion af en *hrcA* nul-mutant og karakterisering af mRNA niveauerne for HrcA/CIRCE regulerede gener.

Fra projektets start var det godt gjort i *Bacillus subtilis* at HrcA proteinet var den repressor som bandt til CIRCE elementerne i promoterområderne foran *dnaJ* genet samt *hrcA-grpE-dnaK* og *groESL* operonerne. Det var derfor af høj prioritet for analysen af varmechok responset at opnå mutanter som manglede repressoren, og helst en $\Delta hrcA$ mutant. Trods ihærdige forsøg af tre forskellige forskere igennem hele projektperioden viste det sig umuligt for os at konstruere en ren deletion af *hrcA* genet. Imidlertid blev det muligt at konstruere en disruption mutant hvor et plasmid pAN1 blev indsat i *hrcA* genet. Den efterfølgende analyse af denne mutant viste at HrcA repressoren enten var helt inaktiv eller kun gav en meget svag repression (se herunder).

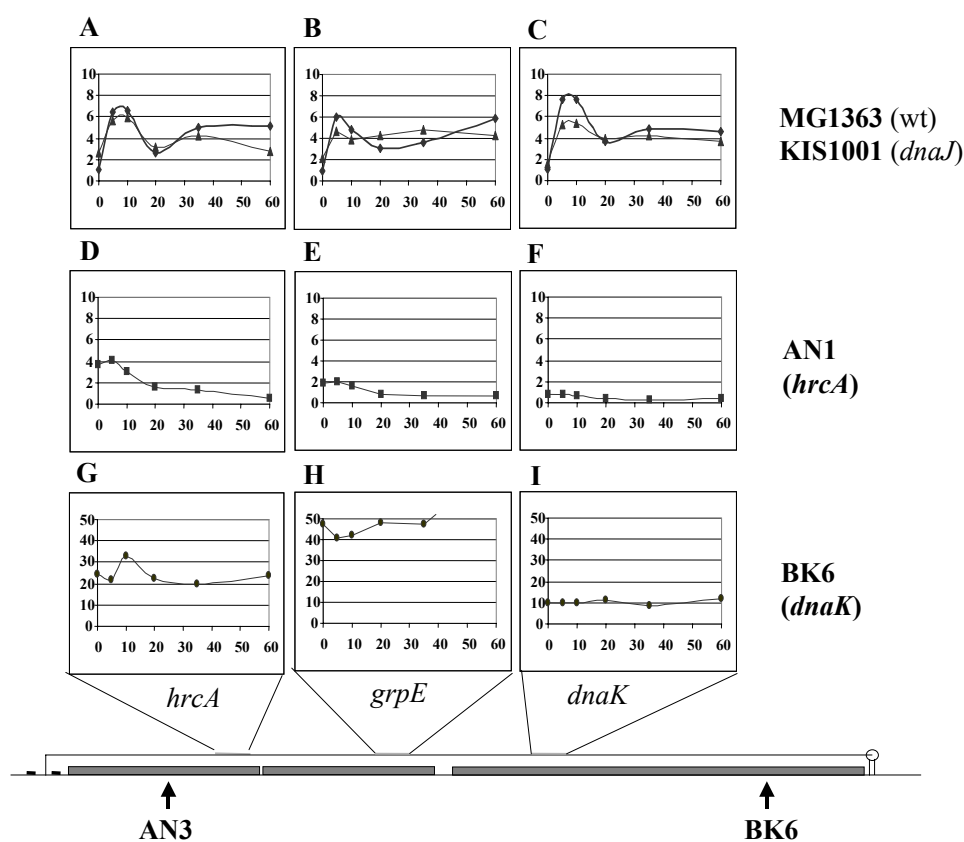
Til analyse af ekspressionsniveauet fra HrcA/CIRCE regulerede gener blev der udført mRNA kvantificeringer af alle generne. Det drejede sig om *hrcA*, *grpE*, *dnaK*, *dnaJ*, *groES* og *groEL*. Kvantificeringen skete ved slot blot hybridiserings teknikken, hvor RNA prøverne bindes til en nylon-membran i et slot mønster, og mængden af specifikke mRNA molekyler findes ved hybridisering af radioaktive prober.. Samtidig inkluderede vi prober til detektion af ribosomalt RNA (rRNA) for at kunne normalisere alle data til mængden af rRNA.

I et sideløbende LMC-støttet projekt havde MK og KH i samarbejde med Professor Søren Molin og PhD studerende Martin C. Hansen observeret at mængden af rRNA

per celle går kraftigt ned under et varmechok i *Lactococcus*. Dette blev kvantificeret ved rRNA fluorescent *In situ* hybridisering (FISH), og vi estimerede at den totale RNA mængde per celle faldt mindst 50% under varmechok. Da alle hybridiseringsprotokoller til kvantificering af mRNA (Northern blotting, dot blotting og slot blotting) anvender normalisering til den totale mængde RNA, vil mRNA niveauerne fejlagtigt stige gennem et varmechok. Ved at anvende data for rRNA mængde per celle fra FISH analyser og normalisere alle mRNA niveauer fra vores slot blots til niveauet af rRNA under samme betingelser, kunne vi beregne niveauerne af mRNA per celle. Denne normaliseringsteknik besluttede vi at anvende i dette projekt og indgik et samarbejde med M.C. Hansen og S. Molin, hvor de foretog FISH analyser på alle vore prøver.

I dette stort anlagte eksperiment blev varmechok responset analyseret i vildtype stammen MG1363, *hrcA*::pAN100 mutanten AN1, en *dnaJ*::pKS2 insertion mutant KIS1001, som blev konstrueret under det tidligere samarbejdsprojekt med MFF, og den føromtalte *dnaK*::pBK103 insertion mutant MK6. Der blev udtaget prøver før, og til forskellige tider efter varmechok (Hansen et al (2001) J.Bacteriol. 183:4747-4751).

Som nævnt i introduktionen har vi en model for den HrcA medierede varmechok regulation hvor HrcA repressoren kræver chaperone assistance for at kunne binde til DNA. Under varmechok vil mange af cellens proteiner blive misfoldede, hvilket vil kræve en stor chaperone aktivitet. Effekten af den følgende mangel på chaperoner vil være at HrcA repressoren ikke bliver foldet korrekt, hvorfor de HrcA regulerede gener ikke mere represses.

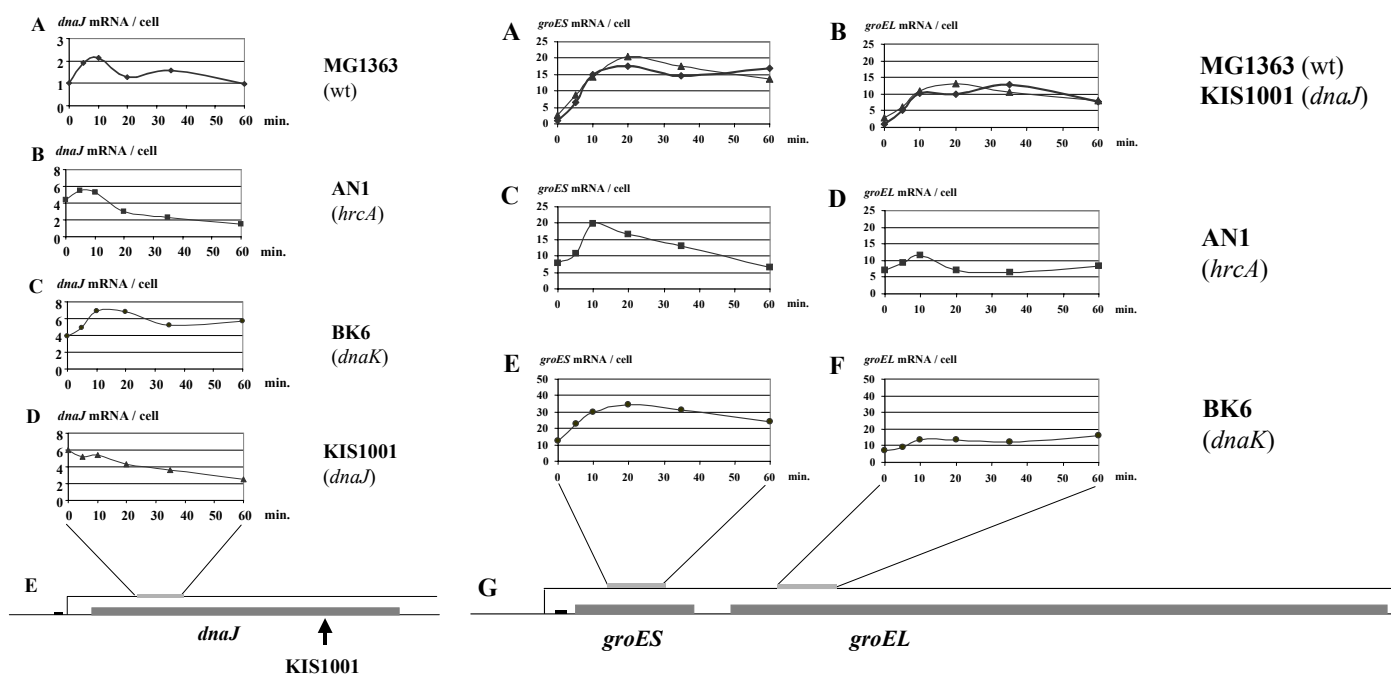


Figur. 3 Cellulære mRNA niveauer for generne i *hrcA-grpE-dnaK* operonen analyseret med en kombination af slot blotting og rRNA FISH.

Relative mRNA niveauer er angivet for de forskellige gener til forskellige tider (minutter) efter varmechok for forskellige mutanter.

I ovenstående figur 3 ses resultaterne fra analyserne af generne i *hrcA-grpE-dnaK* operonen. Niveauerne af mRNA per celle er vist for hvert gen, således at første søjle viser analysen af *hrcA* mRNA, anden søjle viser *grpE* mRNA og sidste søjle viser *dnaK* mRNA niveauerne. Den øverste række diagrammer (A, B, C) viser niveauerne i vildtype stammen (\diamond), og i *dnaJ* mutanten (Δ). Det første der springer i øjnene er at mRNA niveauerne beskriver en bølgebevægelse: først en stigning, så et fald, og så igen en stigning. Niveauerne viser, at vi har at gøre med et groft feed-back regulations system som overkorrigerer.

Det ses at alle tre gener i operonen er reguleret ens. I analysen af *hrcA* mutanten AN1 blev vi forbløffet over at se, at stammen faktisk indeholder normale niveauer af *grpE* og *dnaK* mRNA under vækst ved lav temperatur. Det samme billede har vi set på protein niveau, hvor mængden af DnaK protein var næsten normalt i AN1 ved 30°C. Vi formoder, at mRNA syntesen stammer fra en promotor i det plasmid, som er integreret i *hrcA* genet. Dette passer med, at *grpE* og *dnaK* mRNA niveauerne falder i stedet for at stige under varmechok. Da transkriptionen fra operonens rigtige promotor er blokeret af plasmidet kan vi ikke se effekten af *hrcA* mutationen på disse gener. Men det er til gengæld tydeligt at *dnaK* mutationen i BK6 (nederste række: G, H, I), som tidligere rapporteret, medfører stærkt forhøjede niveauer af mRNA fra alle generne.



Figur. 4 Cellulære mRNA niveauer for *dnaJ* genet og *groESL* operonen, analyseret med en kombination af slot blotting og rRNA FISH.

Når niveauerne af *dnaJ* mRNA analyseres (figur 4) kan det ses at *dnaJ* genet reguleres på samme måde som *hrcA* operonen, men i dette tilfælde er det tydeligt at mutationen af *hrcA* i AN1 medfører totalt depresserede niveauer, ligesom i *dnaK* mutanten BK6.

Niveauerne af *groES* og *groEL* mRNA i MG1363 udviser en lidt anden profil under varmechok end de øvrige gener. Toppunktet kommer tidsmæssigt lidt senere, og det maksimale induktionsniveau er højere. Samtidig findes der stadig varmechok induktion af operonen i *hrcA* og *dnaK* mutanterne. Dette gav os en indikation på at

operonen er reguleret af to varmechok regulations systemer, og ved nøjere undersøgelse fandt vi et perfekt CtsR bindings site i *groESL* operonens promoter.

Under analysen af *hrcA* mutanten AN1 opdagede vi, at der under varmechok sker en meget større rRNA nedbrydning end i MG1363. Dette er meget interessant, men vi har ikke haft tid til at analysere effekten nøjere.

Konstruktion og analyse af *hrcA-grpE-dnaK-gusA*, *dnaJ-gusA* og *groESL-gusA* promoterfusioner.

For at lette analysen af varmechok regulationen fusionerede vi *gusA* genet efter hver af de genetiske enheder på chromosomet af MG1363 (før terminatorerne). Desuden konstruerede vi en fusion mellem *hrcA* promotoren og *gusA* i plasmidet pLB85, som blev integreret i attachment sitet for baktereofagen TP901-1.

Alle disse fusions stammer udviste omkring 4-fold varmechok induktion af GusA aktivitet. Som det blev set for *gusA* fusionerne til *clp* generne er den specifikke aktivitet meget lav. Både *groESL-gusA* og *hrcA-grpE-dnaK-gusA* fusionerne er hvide på plader med X-gluc ved 30°C men bliver tydeligt blå ved 37°C (se fig. 5).

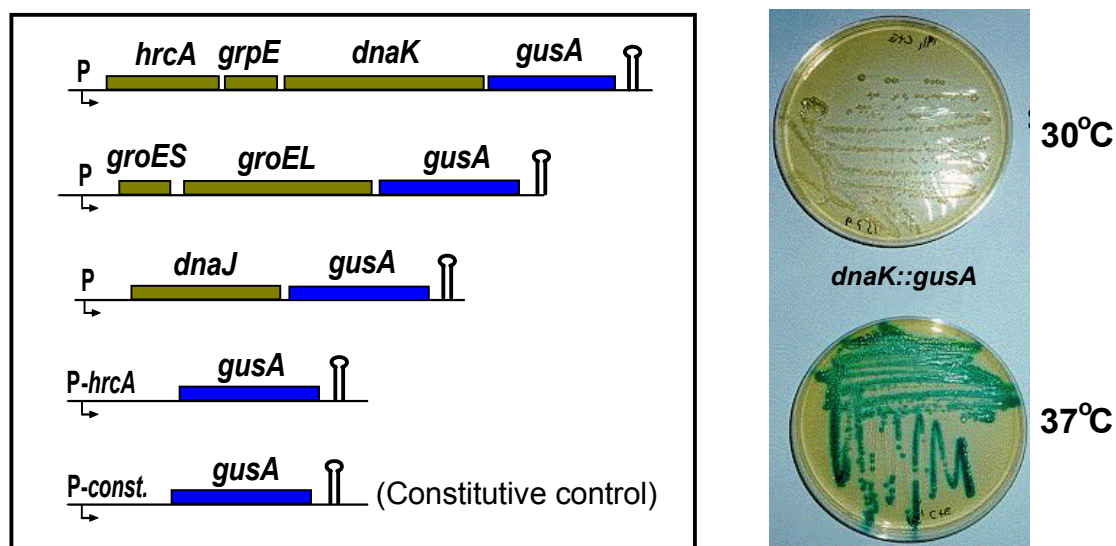
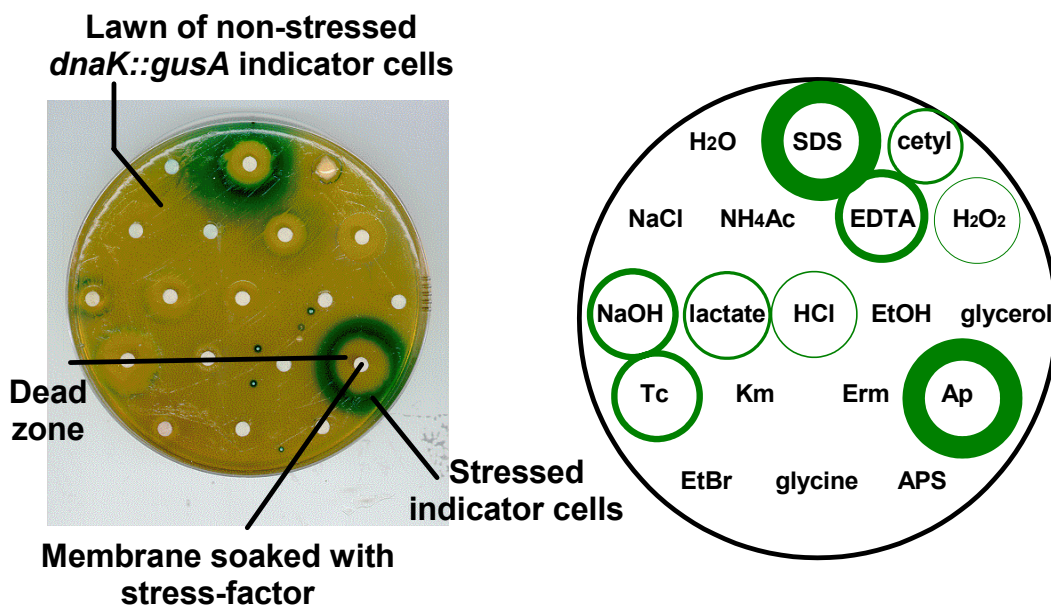


Fig. 5. *gusA* fusioner til CIRCE regulerede gener. Til venstre ses den genetiske organisation af fusionerne, og til højre ses *gusA* udtrykket under varmechok regulering af *dnaK* fusionen som blå farveudvikling på GM17 plader med X-gluc.

Anvendelse af *groESL-gusA* fusionen til selektion af mutanter med forhøjet GroESL niveau. Forskellen på blåfarvningen af *groESL-gusA* fusionen ved henholdsvis 30°C og 37°C blev anvendt til selektion af up-mutanter. Ved selektion af mørkeblå kolonier på plader med X-gluc ved 30°C kunne vi opnå mutanter som havde forhøjet udtryk af *groESL* operonen. I et studenterprojekt blev der selekteret 5 mutanter med forhøjet udtryk, men de er ikke blevet analyseret videre.

Etablering af en farve-test for stressfaktorer med *hrcA-grpE-dnaK-gusA* fusionen Da vi havde observeret at *hrcA-grpE-dnaK-gusA* fusions stammen kunne gå fra hvid til blå kolonifarve på X-gluc plader ved varmechok, forsøgte vi at identificere

kemiske forbindelser som kunne give samme fænotype. For mange af stofferne kan der identificeres en drabszone lige rundt om påsætningspunktet. Hvor der sker en induktion af HrcA repressionen forekommer der en zone med kraftig blåfarvning. Denne zone findes lige inden for drabszonen. Specielt ses SDS og ampicillin at kunne inducere HrcA, formodentlig ved denaturering af cellens proteiner. Hvorfor ampicillin har denne virkning er ikke klart, men det kunne skyldes at cellernes væg er så ødelagte at fremmedstoffer nemt kan trænge ind og denaturere proteiner.

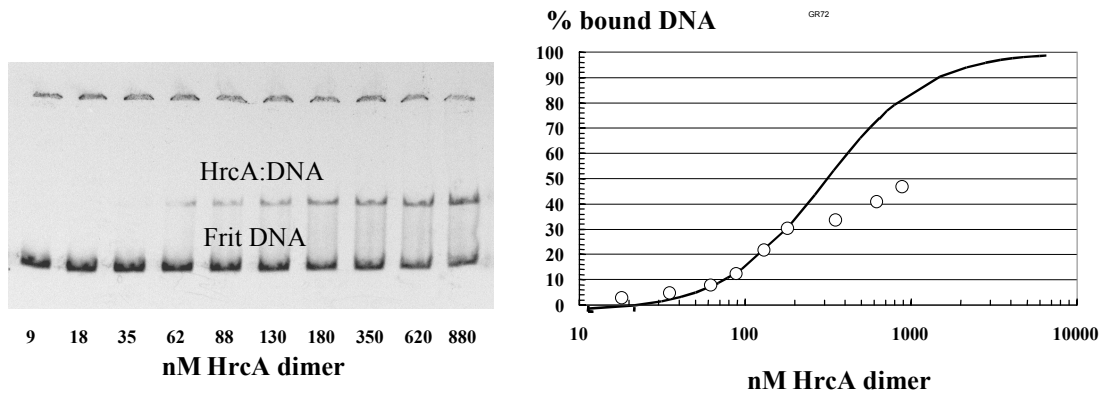


Figur. 6 Farve-test for stress faktorer med indikatorbakterie. *DnaK-gusA* fusionen blev udstreget på en GM17 X-gluc plade og test-stofferne blev tilsat på små stykker filterpapir.

Orensning og biokemisk karakterisering af HrcA repressoren.

For at karakterisere HrcA repressionen i detaljer har vi oprenset HrcA repressoren fra en *E. coli* stamme hvor *hrcA* genet befandt sig på et plasmid efter en inducibel promotor. Som det var kendt fra andre gram-positive bakterier kunne HrcA proteinet kun oprensnes som et precipitat i cellerne, de såkaldte inclusion bodies. Disse inclusion bodies bestod af ca 95% rent HrcA, så efter fraktioneringen og opløsning af inclusion bodies i en 8M urinstof opløsning, havde vi en næsten ren HrcA præparation.

Når HrcA blev fortyndet til en endelig urinstof koncentration på 400 mM foldede HrcA spontant til en konformation som kunne binde til DNA som indeholdt CIRCE elementer. Ved analyse af DNA binding med stigende koncentrationer af HrcA i en urinstof koncentration på 400 mM så vi altid atypiske bindingskurver. Normalt ser man en bindingskurve som går fra 10% til 90% binding over en 100 fold repressor koncentration. Med HrcA fik vi imidlertid altid kurver som var mere stejle end normalt, og som pludselig ved en given protein koncentration ikke gav væsentlig bedre binding ved forøgelse af HrcA koncentrationen. Et sådant eksempel ses på figur 7.



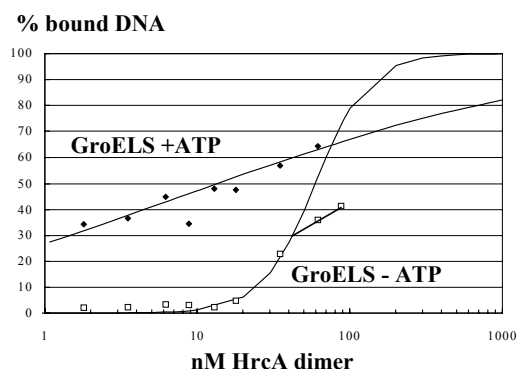
Figur. 7 Binding af HrcA repressoren til *groE* promoter området.

Til venstre ses et gelretarderings forsøg, og til højre er fraktionen af HrcA bundet DNA fra forsøget plottet som funktion af HrcA koncentrationen.

Vi tolker de stejle bindingskurver som evidens for at den spontane foldning af HrcA sker bedre ved højere protein koncentration, så forøgelsen af proteinmængde både giver forøget foldning og forøget DNA binding. Den pludselige afvigelse fra kurven skyldes formentlig at en kritisk protein koncentration er nået, hvor HrcA begynder at udfælde.

Vi har ved at variere både DNA og protein koncentrationerne i bindings assays påvist at kun omkring 10% af HrcA i 400 mM urinstof opløsning er aktivt DNA bindende, men at tilsætning af DNA kan forøge denne fraktion. Vores hypotese er at DNA kan fungere som støbeform for foldningen af HrcA.

For at identificere den præcise binding af HrcA i *groESL* promoterområdet har vi foretaget et såkaldt footprinting eksperiment, hvor DNA området nedbrydes partielt i både tilstedeværelse og fravær af HrcA. I tilfælde hvor et DNA bindende protein beskytter DNA kæden mod nedbrydning kan dette ses på nedbrydningsmønsteret. For at opnå 100% DNA binding af HrcA måtte vi oprense et kompleks mellem HrcA og DNA fra et bindings assay, og efterfølgende analysere nedbrydningsmønsteret. Vi kunne detektere at det spontant foldede HrcA bandt til CIRCE motivet. Et sådant footprint har aldrig været publiceret før.



Figur. 8 Foldning og binding af HrcA til *groESL* promotoren i tilstedeværelse af oprenset *E. coli* GroELS chaperone.

Til slut analyserede vi effekten af chaperoner på foldning og DNA binding af HrcA. Vi så ingen specifik effekt af DnaK chaperone komplekset, udover en generel effekt af protein tilsætning, som også kunne detekteres ved tilsætning af bovin serum albumin. Men tilsætning af GroELS chaperone komplekset sammen med ATP gav en voldsom forøgelse af DNA binding ved meget lave HrcA koncentrationer (Fig. 8) Konklusionen er derfor, at GroELS er nødvendig for HrcA foldning i *Lactococcus*.

Betydning for MFF:

Projektet har først og fremmest givet øget grundvidenskabelig indsigt i regulering af stressrespons i mesofile starterkulturer. Som beskrevet i resuméet er der identificeret to forskellige regulatoriske systemer reguleret af de to repressorer CtsR og HrcA. Det er vist at begge repressorer kræver chaperoner for deres foldning eller stabilitet. Der ser desuden ud til at være mindst endnu et system der giver en svag varme regulering af *clpB* og *clpE* generne.

De HrcA regulerede chaperoner ser ud til at være vitale for cellens vækst, mens Clp proteinerne lettere kan undværes, muligvis fordi de har delvist overlappende funktioner. Den praktiske anvendelighed af disse resultater forekommer umiddelbart begrænset, men øget kendskab til starterkulturens reaktion på stress har betydning for analyse og håndtering af starterkulturer, så de bedre opfylder de krav industrien stiller til dem.

Praktiske anvendelser af resultaterne kan dog også foreslås:

De fusioner til rapporter gener som er fremstillet i projektet kan anvendes til monitoring af stres fremkaldende behandlinger af stammen (se Fig. 6). I den forbindelse er et prolin specifikt peptidasegen *pepI* fra *Lb. helveticus* udviklet som et nyt og mere sensitivt reporter gen til mælkesyrebakterier. Ud over anvendelsen til udviklings- og forskningsformål kan man forestille sig at genet evt. kan finde anvendelse i biosensorer. Det vil dog kræve yderligere undersøgelser omkring bl.a. enzymets stabilitet og peptidanaloger.

Kuldesensitive *clpB* mutanter vil evt. kunne udnyttes til at kontrollere eftersyrning i fermenterede produkter, idet ClpB er vist at have betydning for vækst ved lav temperatur. Der er dog set høj frekvens af suppressor mutationer, der ophæver effekten af mutationen. Naturen af suppressor mutationerne kender vi ikke, derfor er yderligere forskning nødvendige for udnyttelsen af *clpB* mutanter.

Chaperoner må formodes også at spille en rolle ved eksport af proteiner, det ville derfor være væsentligt senere at få undersøgt denne rolle i samarbejde med Hans Israelsens gruppe. Det er blevet drøftet i indeværende projekt, men ikke udført i vores del af projektet.

Betydning for andre samarbejdsprojekter:

Clp mutanter har været brugt i Camilla Udsen's Ph.D. projekt hos professor Søren Molin (BioCentrum-DTU).

Clp mutanter er udleveret til Bioteknisk Institut til brug i forsøg på ekspresion af plasmin (sektionsleder Hans Israelsen).

Andre Samarbejdspartnere:

Prof. Airi Palva, Section Veterinary Microbiology, Dept. of Basic Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki

Publikationer:

VARMANEN, P., INGMER, H. & VOGENSEN, F.K.: *ctsR* of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of *clp* gene expression. *Microbiology-UK* 2000, 146, 1447-1455.

FREES, D., VARMANEN, P., INGMER H.: Inactivation of a gene that is highly conserved in Gram-positive bacteria stimulates degradation of non-native proteins and concomitantly increases stress tolerance in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 2001, 41, 93-103.

VARMANEN, P., VOGENSEN, F.K., HAMMER, K., AND INGMER, H. ClpE of *Lactococcus lactis* promotes repression of CtsR dependent gene expression. *Submitted til J. Bacteriol.*

HANSEN, M. C., NIELSEN, A. K., MOLIN, S., HAMMER, K., & KILSTRUP*, M. (2001). Changes in Ribosomal RNA levels During Stress Invalidates Results from mRNA Blotting: Fluorescence In Situ rRNA Hybridization Permits Re-normalization for Estimation of Cellular mRNA levels. *J. Bacteriol.* 183 (16) 4747-4751

KILSTRUP*, M., PULKA-AMIN, M. D., & HAMMER, K. (2002) Spontaneous folding of the heat-chok specific HrcA repressor fromn *Lactococcus lactis* and its binding to CIRCE elements. *Submitted til European Journal of Biochemistry*

Publikationer under vejs:

VARMANEN, P., INGMER, H & VOGENSEN, F.K.: Stress regulation of the *clpC*-operon in *Lactococcus*: *orf555* belongs to two heat-chok regulons. *Manuskript under udarbejdelse.*

VARMANEN, P., SAVIJOKI, K. & VOGENSEN, F.K.: Use of the *Lactobacillus helveticus pepI* as a reporter gene for promoter analysis in lactic acid bacteria. *Manuskript under udarbejdelse.*

ALLAN K. NIELSEN, MARTIN C. HANSEN, KIM I. SØRENSEN, KARIN HAMMER, AND MOGENS KILSTRUP* An *hrcA* disruption mutant of *Lactococcus lactis* displaying heat induced degradation of ribosomal RNA and derepressed cellular levels of *groESL* and *dnaJ* mRNA. *Manuskript under omarbejdelse*

