

**Abschlussbericht zum Vorhaben 2635**

**Entwicklung eines kostengünstigen Expressionssystems für die biotechnologische Produktion von Impfstoffen am Beispiel des Porins PorA1 aus *Neisseria meningitidis***

Prof. Dr. Robin Ghosh  
Abt. Bioenergetik,  
Biologisches Institut  
Universität Stuttgart  
70550 Stuttgart

## **Abstract**

Das Protein PorA1 aus der äußeren Membran (OM) des pathogenen Bakteriums *Neisseria meningitidis*, eines weit verbreiteten Verursachers von Kindermeningitis, wird bereits heute weltweit als Impfstoff gegen *N. meningitidis* eingesetzt; doch seine Herstellung birgt immer noch Nachteile in sich. In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, PorA1 als funktionelles Protein im nicht-pathogenen Wirtsorganismus *Rhodospirillum rubrum* unter Kontrolle eines sehr starken endogenen Promotors zu überexprimieren. Dieser Organismus ist für den Menschen nicht pathogen und kann durch ein neues biotechnologisches Verfahren in sehr großen Mengen gezüchtet werden. Die Expression von PorA1 erwies sich jedoch als schwieriger als erwartet, und es konnten nur sehr kleine Mengen produziert werden. Obwohl die *R. rubrum*-eigene Cytochrom  $c_2$  (*cycA*) Signalsequenz in der Lage ist, rekombinante Proteine, auch in *Escherichia coli*, durch die innere Membran zu sekretieren, wurde in einem Kontrollversuch, bei dem versucht wurde, das *cycA-porA1* Fusionsprotein unter Kontrolle eines starken *E. coli* Promotors zu exprimieren, festgestellt, dass die Detektion mit einem Anti-PorA1 polyklonalen Antikörper nur ein sehr kleines Signal lieferte. Da die PorA1-Aminosäuresequenzen viele Homologien zu der gut charakterisierten  $\beta$ -Fasstruktur von *E. coli* Porinen aufweisen, arbeiten wir zur Zeit an der Hypothese, dass die periplasmatisch-lokalisierten Polypeptidausschweifungen, die deutlich länger als diejenigen von *E. coli* sind, besonders anfällig für proteolytischen Verdau sind. Diese Hypothese wird zur Zeit experimentell geprüft.

## **Zielsetzung**

Das Protein PorA1 aus der äußeren Membran (OM) des pathogenen Bakteriums *N. meningitidis*, eines weit verbreiteten Verursachers von Kindermeningitis, soll in der OM von *R. rubrum* mittels Anwendung einer neuen, viel versprechenden Strategie exprimiert werden. Das PorA1 Protein [3,4] wird bereits heute weltweit als Impfstoff gegen *N. meningitidis* eingesetzt [13,16]; seine Herstellung birgt trotzdem noch Nachteile in sich.

Wir beabsichtigen, das Porin „Serotyp B Klasse 1“ (PorA1) aus *N. meningitidis* als funktionelles Protein im nicht pathogenen Wirtsorganismus *R. rubrum* zu überexprimieren. Unser PorA1-Protein wird durch seine besonderen Eigenschaften einen großen Beitrag in der Impfstoffforschung liefern können und sich als sehr gute, kostengünstige Alternative für den bereits vorhandenen Impfstoff gegen Kindermeningitis anbieten. Das rekombinante PorA1 wird eine neue Quelle an Antigenmaterial für die Impfstoffentwicklung werden, welche verbunden ist mit geringen Entwicklungskosten und niedrigem technologischen Aufwand und somit neben den Industrieländern auch den Entwicklungsländern zu Gute kommen. Die

erhaltenen, großen Mengen an Protein werden eine detaillierte Analyse der Struktur ermöglichen und dadurch eine erhebliche Hilfestellung bei der Entwicklung weiterer Impfstoffe leisten.

### **Systemauswahl**

Einige Forschungsgruppen sind derzeit in der Impfstoffproduktion gegen diesen Organismus involviert. Die jetzigen Ansätze basieren auf (a) Lipopolysaccharid-(LPS) Präparationen [15]. (b) Porinen der OM als LPS-freie Inklusionskörper in *Bacillus subtilis* [10]. (c) OM-Präparationen, die mit PorA1 angereichert wurden [13]. (d) anderen Oberflächenproteinen (opa) [15].

Obwohl bestätigt worden ist, dass Impfstoffe bestehend aus kapselförmigen Polysacchariden einen Schutz gegen die durch „Serogruppe A und C“ verursachte Krankheit bieten, zeigt sich für die Polysaccharide der „Serogruppe B“ ein anderes Bild. Sie sind schwach immunogen und eignen sich nicht als Impfstoffe, da es bei der Anwendung zu einer möglichen Kreuzreaktion mit dem Zuckeranteil der Glykoproteine in einigen menschlichen Zellen kommen kann. Die extrahierten OM-Präparationen (c) können wiederum den Nachteil haben, dass sie immer noch unzureichende Mengen an PorA1 aufweisen, um effektiv wirken zu können, gleichzeitig aber immer noch LPS-kontaminiert sein können, was toxische Nebeneffekte induzieren könnte. Die opa-Oberflächenproteine (d) könnten sich ebenso als ungeeignete Impfstoffkandidaten erweisen, da sie hinsichtlich der Stämme, in denen sie vorkommen, aber auch im Hinblick auf deren Wachstumsphasen, in ihrer Zusammensetzung variieren [15].

Von den fünf bekannten Porinen der OM stellen die Porine der Klasse 1 die interessantesten dar, da sie einen Schutz gegen viele Varianten von *N. meningitidis* Serotyp B bieten [13].

Die Gruppe von Sarvas und Mäkelä (National Institute of Health, Helsinki, Finnland) hat das PorA1-Protein als inclusion bodies in einem gram-positiven, LPS-freien Wirtsorganismus, *B. subtilis*, exprimiert [15]. Wegen technischer Schwierigkeiten ist diese Methode zur Impfstoffentwicklung derzeit nicht im Einsatz.

Leider gibt es immer noch keine leicht zugängliche Quelle für das PorA1-Protein. Es wurde bereits versucht, PorA1 in *Escherichia coli* zu exprimieren. Dies führte aber aufgrund der hohen Toxizität des Genprodukts nicht zu ausreichenden Mengen an rekombinantem Protein [1,3,4]. Ein weiterer erheblicher Nachteil beim Einsatz von *E. coli* als Expressionssystem besteht darin, dass die LPS in der anfänglichen Präparation vorhanden sind und durch eine aufwendige Reinigung entfernt werden müssen. Die Hauptquelle für PorA1-Protein stellt somit immer noch *N. meningitidis* dar.

In diesem jetzigen Vorhaben haben wir das gram-negative Bakterium *R. rubrum* aufgrund seiner besonderen Eigenschaften als neues Expressionssystem eingesetzt: (1) *R. rubrum* ist nicht pathogen, wächst bei 32°C unter optimalen Bedingungen und ist bei 37°C nicht lebensfähig.

(2) Die LPS-Strukturen von vielen eng verwandten Bakterien (z.B. *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*) sind ca.  $10^4$ -  $10^5$ -fach weniger toxisch als die LPS-Struktur von *E. coli* [12]. (3) Durch die Entwicklung eines neuen Mediums ist es gelungen, *R. rubrum* in sehr hoher Zelldichte unter **aeroben, dunklen** Bedingungen sehr schnell zu züchten [7].

(4) Die genetischen Werkzeuge (z.B. Promotoren, Vektoren) sowie auch die Genomsequenz sind vorhanden bzw. bekannt [6,17].

## Versuche

### (1) Expressionsversuche in *R. rubrum*.

Folgende *R. rubrum* Expressionsstrategie wurde verwendet: Das *N. meningitidis porA1*-Gen, ohne dessen native Signalsequenz, wurde mit der *R. rubrum*-Signalsequenz von Cytochrom *c*<sub>2</sub>, unter Kontrolle des *R. rubrum puf*-Promotors [2] fusioniert. Die Fusionsstelle mit der *cycA*-Signalsequenz [14] wurde so gewählt, dass das erste Aminosäuren-Paar von *cycA* korrespondierend mit der Leaderpeptidase-Bindungsstelle beibehalten wurde. Wir haben die Signalsequenz vom Cytochrom *c*<sub>2</sub> für den Transport von Prä-PorA1 durch die cytoplasmatische Membran in den periplasmatischen Raum gewählt, da dieses im Periplasma von *R. rubrum* in sehr hohen Mengen exprimiert wird. Das ATG-Startcodon unseres *cycA-porA1*-Konstrukts ist ca. 16 bp downstream von der ribosomalen Bindungsstelle platziert und unterliegt der Kontrolle des *puf*-Promotors. Das Ende des Gens bildet der starke *trp*-Terminator (Abbildung 1). Der *puf* Promotor ist sehr stark (produziert ca. 100 000 Kopien des endogenen Genprodukts (die  $\alpha$  und  $\beta$  Polypeptide des Lichtsammelkomplexes 1), und wird von Sauerstoff stark reprimiert. Dieses Konstrukt wurde in das Ausgangsplasmid pRK404, welches sich sowohl in *R. rubrum* als auch in *E. coli* vermehren kann, inkloniert. Das Expressionsplamid wurde als pRKpufPorA1 designiert.

In den üblichen Expressionsstrategien von *R. rubrum* werden die rekombinanten Zellen im hochzellichten Medium, M2SF, in Batch-Verfahren kultiviert. Bei niedrigen Zelldichten ist die lokale O<sub>2</sub> Konzentration sehr hoch und der *puf* Promotor wird reprimiert. In der exponentiellen Phase ist die Zelldichte hoch genug, so dass die lokale O<sub>2</sub> Konzentration unter 0,5% sinkt. Unter dieser Bedingung ist der *puf* Promotor aktiv und das gewünschte Genprodukt

wird exprimiert. Das Gesamtkonstrukt wurde am Schluss sequenziert, um die Richtigkeit zu beweisen.

Die Ergebnisse dieser ersten Versuchsreihe waren enttäuschend. Obwohl der rekombinante Stamm *R. rubrum* (pRKpufPorA1) gutes, fast wild-typ-ähnliches Wachstum zeigte, konnte weder auf mit Coomassie-Blue bzw. mit Silber-gefärbten SDS-PAGE Gelen eine zusätzliche Bande festgestellt werden, noch konnte ein positives Signal mit Hilfe eines gegen PorA1-generierten polyklonalen Antikörpers (ein Geschenk von Prof. Matti Sarvas, Universität Helsinki) nach Western Blotting gezeigt werden. Auch eine massenspektroskopische Proteinanalyse (durchgeführt von Prof. M. Hippler, Universität Münster) der SDS-PAGE Gele des rekombinanten Stammes zeigt keine Peptide, die zur PorA1 Sequenz zugeordnet werden konnten.

## **(2) Expressionsversuche in *E. coli*.**

Um zu prüfen, ob die *cycA-porA1* – Fusion exprimierbar war, wurde folgender Versuch durchgeführt: Das ATG-Startcodon vom *ompF* Gen wurde an ein *E. coli* OmpF-Expressionsplasmid (pBsOmpF1 [8]) fusioniert mit dem Startcodon des *cycA-porA1*-Konstruktes, und in einen OmpF-Deletionsstamm (BZB1107) transferiert. Das Parentalplasmid, welches den sehr starken OmpF-Promotor enthält, exprimiert *E. coli* OmpF bis zu 80% vom gesamten äußeren Membranprotein [8].

Auch diese Versuche waren enttäuschend: Nur ein sehr schwaches PorA1-Signal konnte mit dem polyklonalen Anti-PorA1-Antikörper detektiert werden.

## **Fazit und Ausblick**

Das sehr niedrige Expressionsniveau sowohl in *R. rubrum* als auch in *E. coli* führt zu der Schlussfolgerung, dass das gewünschte Genprodukt instabil ist. Die Möglichkeit, dass die Signalsequenz nicht für Membransekretion aktiv ist, konnte ausgeschlossen werden, da auch in isolierten inneren Membranen kein Western Blot-Signal detektiert werden konnte. Ein Sequenzvergleich (nach Jeanteur *et al.* [9]) von zwei *E. coli* Porinen mit bekannter dreidimensionaler Struktur [5] mit PorA1 zeigt eine klare Homologie zwischen den Aminosäuresequenzen, die an der  $\beta$ -Fassstruktur beteiligt sind, aber sehr große Unterschiede in den periplasmatisch lokalisierten Polypeptidschlaufen („Loops 1, 4 und 5“, siehe unten).

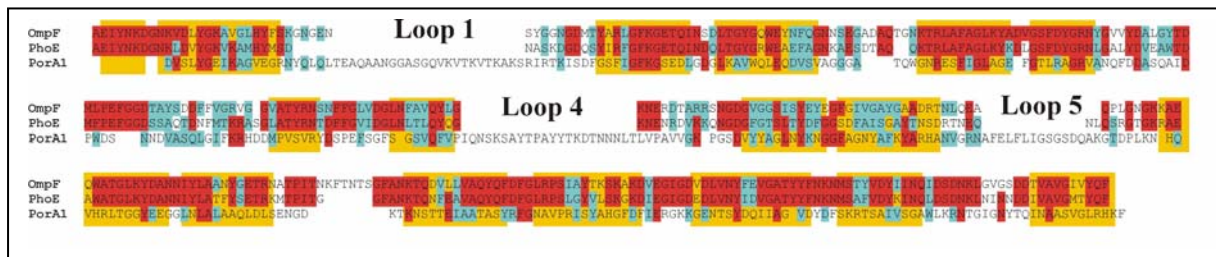
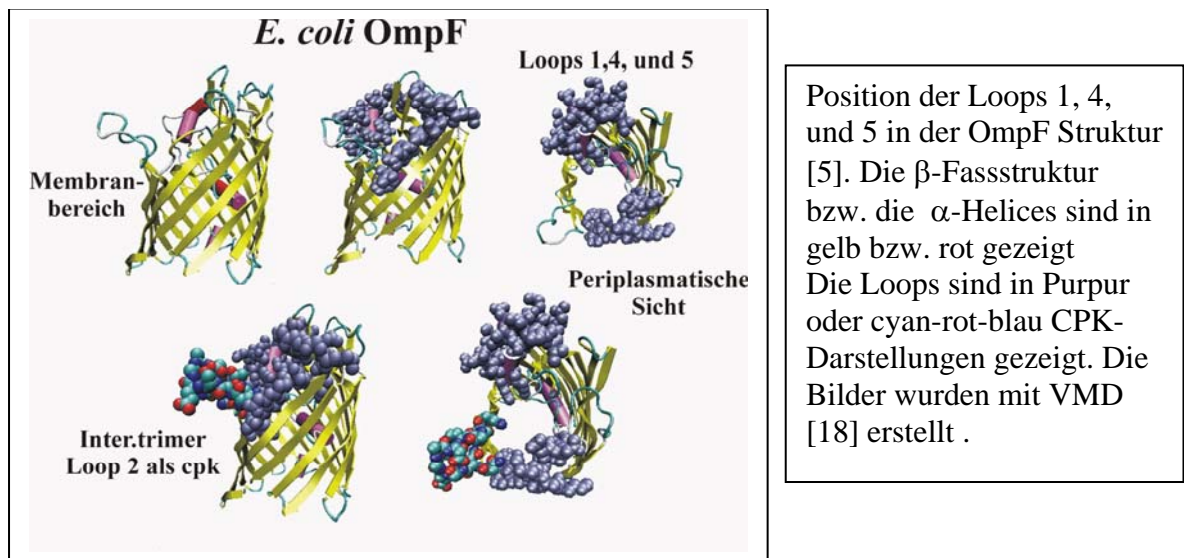


Abb. 1: Homologievergleich zwischen OmpF und PhoE aus *E. coli* und PorA1 aus *N. meningitidis*. Die Farbkodierung ist: rot, Aminosäurereste mit 100% Homologie; blau, semikonservative Änderungen. Die orangefarbenen Rahmen zeigen die Polypeptidbereiche, die an den  $\beta$ -Fasstrukturen beteiligt sind.



Es ist durchaus möglich, dass die Loops sehr empfindlich gegen periplasmatische Proteasen in *E. coli* oder *R. rubrum* sind. Eine weitere Strategie, die zur Zeit in unserer Gruppe verfolgt wird, ist der systematische Austausch der PorA1 Loops 1, 4, und 5 gegen die strukturell sehr gut definierten Loops von *E. coli*. Wir sind auch dabei, die Transporteffizienz der *cycA*-Leadersequenz im *E. coli*-Expressionssystem zu prüfen.

## Danksagung

Wir danken der Max-Buchner Forschungsstiftung für ihre Unterstützung.

## Referenzen:

1. Barlow, A. K., Heckels, J. E., and Clarke, I. N. (1989) The class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*: gene sequence and structural and immunological similarities to the gonococcal porins. *Mol. Microbiol.* **3**, 131-139.
2. Bélanger, G., and Gingras, G. (1988) Structure and expression of the *puf* operon messenger RNA in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **263**, 7639-7645

3. **Carbonetti, N. H., and Sparling, P. F.** (1987) Molecular cloning and characterization of the structural gene for protein I, the major outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9084-9088.
4. **Carbonetti, N. H., Simnad, V. I., Seifert, H. S., So, M., and Sparling, P. F.** (1988) Genetics of protein I of *Neisseria gonorrhoeae*: construction of hybrid porins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6841-6845.
5. **Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N., and Rosenbusch, J. P.** (1992) Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358, 727-733.
6. **Ghosh, R., Elder, D. J. E., Kelly, D. J., and Bachofen, R.** (1994) New vectors and procedures for transposon Tn5 mutagenesis in *Rhodospirillum rubrum*. *Gene* 150, 97-100.
7. **Ghosh, R., Hardmeyer, A., Thönen, I., and Bachofen, R.** (1994) Optimization of the Sistro culture medium for large-scale batch cultivation of *Rhodospirillum rubrum* under semi-aerobic conditions with maximal yield of photosynthetic membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1698-1700.
8. **Ghosh, R., Steiert, M., Hardmeyer, A., Wang, Y.-F. and Rosenbusch, J. P.** (1995) Overexpression of outer membrane porins in *E. coli* using pBluescript-derived vectors. *Gene Expression*, 7, 149-161.
9. **Jeanteur, D., Lakey, J. H., and Pattus, F.** (1991) The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol. Microbiol.* 5, 2153-2164.
10. **Nurminen, M., Butcher, S., Idänpään-Heikilä, I., Wahlstrom, E., Mutttilainen, S., Runeberg-Nyberg, K., Sarvas, M., and Mäkelä, P. H.** (1992) The class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* produced in *Bacillus subtilis* can rise to protective immunity. *Mol. Microbiol.* 6, 2499-2508.
11. **Palva, I., Sarvas, M., Lehtovaara, P., Sibakov, M., and Kääriäinen, L.** (1982) Secretion of *Escherichia coli* b-lactamase from *Bacillus subtilis* by the aid of a-amylase signal sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5582-5586.
12. **Pietsch, K., Weckesser, J., Fischer, U., and Mayer, H.** (1990) The lipopolysaccharides of *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum moischianum*, and *Rhodophila globiformis*. *Arch. Microbiol.* 154, 433-437.
13. **Saukkonen, K., Abdillahi, H., Poolman, J. T., and Leinonen, M.** (1987) Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B.15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development. *Microb. Pathogen.* 3, 261-267.
14. **Self, S. J., Hunter, C. N., and Leatherbarrow, R. J.** (1988) Molecular cloning, sequencing and expression of cytochrome c<sub>2</sub> from *Rhodospirillum rubrum*. *Bioch. J.* 265, 599-604
15. **Stern, A., and Meyer, T. F.** (1987) Common mechanism controlling phase and antigenic variation in pathogenic neisseriae. *Mol. Microbiol.* 1, 5-12.
16. **Van der Ley, P., and Poolman, J. T.** (1992) Construction of a multivalent meningococcal vaccine strain based on the class 1 outer membrane protein. *Infection and Immunity* 60, 3156-3161.
17. **Shotgun genomic sequence of *R. rubrum*** (<http://genome.ornl.gov/microbial/rub/>).
18. **Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K.** (1996) VMD-Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics* 14.1, 33-38.