**Eiwitexpressie en secretie systemen in *Lactococcus* voor therapeutische doeleinden**

Bachelor scriptie

Ydwine van der Veen (s2176890)

Begeleiders: J. Neef & G. Buist

9/4/2014

**Inhoudsopgave**

**1. Introductie 3**

**2. Productie van therapeutische eiwitten 3**

2.1 Gastheren voor de productie van therapeutische eiwitten 4

2.2 Prokaryoten als gastheer voor de productie van therapeutische eiwitten 4

2.3 *Lactococcus* als gastheer voor de productie van therapeutische eiwitten 6

**3. Modificatie van eiwitexpressie systemen van *Lactococcus* 7**

3.1 Het nisine gecontroleerde eiwitexpressie systeem 8

3.2 Het P170 gecontroleerde eiwitexpressie systeem 9

3.3 Het PznZitR gecontroleerde eiwitexpressie systeem 10

**4. Modificatie van het eiwit secretie systeem van *Lactococcus*  11**

4.1 Efficiënter maken van het SPUsp45 signaalpeptide 12

4.2 Fusie van Sp45Usp en een propeptide voor recombinante eiwitproductie 12

4.3 De secretie machinerie complementeren met SecDF 13

4.4 Overige aanpassingen aan het secretiesysteem 13

**5. Ontwikkeling van een nieuw eiwitexpressie en secretie systeem in *Lactococcus* 14**

**6. Recombinante eiwitproductie in *Lactococcus* op industrieel niveau 14**

**7. Discussie 15**

**8. Referenties 16**

**1. Introductie**

Het gebruik van eiwitten voor therapeutische doeleinden neemt toe. De beperkingen van chemische eiwitsynthese en –isolatie maken het zoeken naar een alternatief productieproces voor recombinante eiwitten noodzakelijk. Het gebruik van bacteriën als gastheer voor de productie van recombinante eiwitten is een veelbelovend alternatief om aan de vraag naar eiwitten met een therapeutische werking te voldoen. Het recombinant produceren van eiwitten met een therapeutische werking is enkele jaren geleden in verschillende studies al mogelijk gebleken. In 1990 was men al in staat om recombinant *Lactococ* een celwand gebonden antigeen van *Streptococcus mutans* te laten produceren en secreteren. Muizen die vervolgens oraal werden geïmmuniseerd met deze dode recombinante *Lactococ* ontwikkelden zowel een mucosale als een systemische immuunrespons [12]. Later bleek de productie en secretie van tetanus fragment C in recombinant *Lactococ* ook mogelijk. Dit recombinante eiwitfragment kon gebruikt worden voor de ontwikkeling van subcutane vaccins die bescherming boden tegen [tetanustoxine](http://nl.wikipedia.org/wiki/Tetanustoxine) geproduceerd door de bacterie [*Clostridium tetani*](http://nl.wikipedia.org/wiki/Clostridium_tetani). Bij toediening van levend *Lactococ* dietetanus fragment C produceert bleek orale en nasale immunisatie ook mogelijk [27,29,32]. Inmiddels zijn er al een groot aantal verschillende soorten recombinante eiwitten met een therapeutische werking in verschillende bacteriesoorten geproduceerd. Zoals blijkt uit bovenstaande voorbeelden kan het recombinante eiwit worden verwerkt in geneesmiddelen en mucosale en systemische vaccins. Directe mucosale toediening van een levende recombinante bacteriestam waarbij het recombinante eiwit rechtstreeks wordt gesecreteerd in het lichaam is ook mogelijk. Een strategie die verspreiding van de recombinante bacteriestam voorkomt is dan wel noodzakelijk alvorens deze humaan gebruikt kan worden [1,2,21].

Dit literatuuronderzoek is gericht op het gebruik van *Lactococcus* als gastheer voor de productie en secretie van recombinante eiwitten met een therapeutische werking. Verschillende eiwitexpressie systemen in *Lactococcus* zoals het nisine, P170 en het PznZitR gecontroleerde eiwitexpressie systeem zijn geschikt voor recombinante eiwitproductie door deze genetisch te modificeren. De induceerbaarheid van deze systemen en de mogelijkheid om deze systemen te fuseren met andere genen maakt ook regulatie van de eiwitexpressie en secretie mogelijk [14,22]. Door het aanbrengen van specifieke modificaties aan het secretiesysteem van *Lactococcus* kan secretie en afbraak dusdanig worden gemanipuleerd voor een zo hoog mogelijke opbrengst van het recombinante eiwit. Vervolgens is het kiezen van het juiste eiwitexpressie systeem in combinatie met het aanbrengen van de juiste modificaties in het secretiesysteem voor de productie en secretie van een specifiek recombinante eiwit het ultieme doel voor een maximale kwalitatieve en kwantitatieve opbrengst. Tevens is het belangrijk om hierbij te kijken naar de beste groeiomstandigheden voor *Lactococcus* op grote schaal zodat eiwitproductie op industrieel niveau ook maximaal is [22,25]. Door in dit literatuuronderzoek te kijken naar de werking en de eventuele aanpassingen die gedaan kunnen worden op de eiwitexpressie systemen en het secretiesysteem van *Lactococcus* worden de mogelijkheden van deze bacteriën als eiwitproducenten van eiwitten met een therapeutische werking in de farmaceutische industrie geïllustreerd.

**2. Productie van therapeutische eiwitten**

Met de huidige technologie en kennis is het steeds beter mogelijk om ziekten op genetisch en moleculair niveau te onderzoeken. Dit onderzoek levert een groot aantal genen en moleculen op die betrokken zijn bij het ontstaan of het verloop van een bepaalde ziekte. Uiteindelijk kan dit leiden tot verschillenden en vaak nieuwe moleculen die gebruikt kunnen worden voor een behandeling. Vooral de vraag, diversiteit en commerciële druk naar eiwitten met een therapeutisch werkingneemt toe[19].

Eiwitten en peptiden blijken succesvol te werken bij de behandeling van verschillende ziekten, zoals bij multiple sclerose, diabetes mellitus, reumatoïde artritis, de ziekte van Crohn en verschillende soorten kanker. Eiwitten hebben vaak verschillende therapeutische toepassingen en een doeltreffende en krachtige werking en zijn daarom interessant voor de farmaceutische industrie. Ook zijn veel eiwitten en peptiden, in tegenstelling tot veel chemisch geproduceerde geneesmiddelen, in staat de oorzaak van de ziekte aan te pakken en niet alleen de symptomen weg te nemen [9,13,19,23].

Eiwitten zoals antilichamen, hormonen, receptoren, enzymen, cytokinen, chemokinen, antibiotica of fragmenten hiervan worden veel gebruikt voor farmaceutische doeleinden [19,23]. Deze eiwitten en peptiden kunnen op verschillende manieren worden verkregen. Net als chemisch geproduceerde geneesmiddelen kunnen ze worden gesynthetiseerd. Voor kleine peptiden is dit mogelijk, maar synthese van grotere eiwitten is vaak te complex [19,20]. Toch is het vaker mogelijk om ook grotere eiwitten te synthetiseren, zoals het enzym Sortase A met een lengte van 148 aminozuren en een biologisch volledig actieve werking [5]. Ook kunnen eiwitten *in vivo* of *in vitro* uit dierlijk of plantaardig materiaal geïsoleerd worden. Echter is de opbrengst van eiwitisolatie vaak laag door verlies aan biologische activiteit ten gevolge van denaturatie of aggregaat vorming. Lage opbrengsten en de vereiste zuivering maken eiwitisolatie duur. Daarom is het zoeken naar een alternatieve route die veilig, rendabel en schaalbaar op industrieel niveau is noodzakelijk. Het gebruik van gemodificeerde gastheren als producenten van eiwitten met een therapeutische werking is een goed alternatief [19,20].

**2.1 Gastheren voor de productie van therapeutische eiwitten**

Door een gastheer genetisch te modificeren kan deze een recombinant eiwit met een therapeutische werking produceren. Expressie van bacteriële en virale antigenen of andere eiwitten voor verwerking in geneesmiddelen en mucosale en systemische vaccins, eventueel voor *in situ* behandelingen, behoren tot de mogelijkheden [1,21]. De genen voor de productie van recombinante eiwitten kunnen uit allerlei organismen komen. Ook de eiwitproductie zelf kan in tal van cellijnen en organismen plaatsvinden [22]. Zoals de productie van therapeutische eiwitten in zoogdier**-** en insectcellen, planten, schimmels en prokaryoten. Zo zijn zoogdiercellijnen al uitgebreid gebruikt voor recombinante eiwitproductie. Bijvoorbeeld het gebruik van ovarium cellen van de Chinese hamster, die in staat zijn complexe geglycosyleerde eiwitten te produceren [19,28]. Met behulp van het *Baculovirus* als vector is recombinante eiwitproductie in insectencellen en larven mogelijk [11]. Productie van een antigeen fusie eiwit is gedaan in *Nicotiana clevelandii* planten door gebruik te maken van *Potato virus X* als vector [10]. Schimmels bieden grote mogelijkheden voor een efficiënte en grootschalige productie van recombinante eiwitten, vooral gisten worden veelvuldig gebruikt [24]. Daarnaast zijn ook prokaryoten een geschikte gastheer voor het produceren van therapeutische eiwitten. Het gebruik van recombinante eiwitten in de farmaceutische industrie is in opkomst. In de voedingsindustrie en voor andere biotechnologische toepassingen worden prokaryoten al jaren gebruikt als eiwitproducenten [21,22,26].

**2.2 Prokaryoten als gastheer voor de productie van therapeutische eiwitten**

Door gebruik te maken van het productie**-** en secretiesysteem van prokaryoten kunnen deze organismen gebruikt worden voor recombinante eiwitproductie. De prokaryoot kan als levende stam worden toegediend zodat eiwitsecretie rechtstreeks in het lichaam plaatsvindt of als celfabriek fungeren voor de productie van therapeutische eiwitten. Voorbeelden hiervan zijn de productie van het NSP4 eiwit van Rotavirussen, het E7 antigeen van het humane *Papillomavirus*, het L7/L12 antigeen van *Brucella abortus* en nog vele andere therapeutische eiwitten, zoals bacteriocines, chemokinen, cytokinen en de humane hormonen leptine en insuline [1,14,22]. Deze eiwitten kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt voor mucosale immunisatie. Mucosale toediening heeft als voordeel dat het eiwit geleidelijk wordt afgegeven, er weinig bijwerkingen optreden en toediening eenvoudig is in vergelijking met een systemische toediening. Vaccinatie door mucosale toediening is een veelbelovend alternatief. Een beperking is echter dat er grote hoeveelheden aan therapeutische eiwitten nodig zijn vanwege de afbraak van deze eiwitten aan het mucosale oppervlak [1].

*E. coli* wordt al jarenlang gebruikt als eiwitproducent in de voedingsindustrie, voor andere biotechnologische toepassingen en voor therapeutische eiwitproductie. Door het jarenlange en veelvuldige gebruik van *E. coli* zijn de veiligheidsrisico’s van deze bacterie goed gedocumenteerd. *E. coli* beschikt over verschilden productie**-** en secretiesystemen die gebruikt en gemodificeerd kunnen worden zodat deze bacterie in staat is om efficiënt recombinant eiwit uit te scheiden. Enkele productie systemen zijn het T7 promotor systeem dat geïnduceerd wordt door isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) en het p*BAD* promotor systeem dat geïnduceerd wordt door L-arabinose. Over het algemeen zijn deze productiesystemen na genetische modificatie goed te gebruiken voor recombinante eiwitproductie, maar hebben ook hun beperkingen zoals de IPTG inductor die toxisch en kostbaar is. Het secretiesysteem van *E. coli* neemt ook enkele beperkingen met zich mee. *E. coli* is een aerobe en gramnegatieve bacterie die voornamelijk zijn eiwitten intracellulair of in de periplasmatische ruimte secreteerd. Dure en tijdrovende zuiveringsmethoden zijn dan vereist om het recombinanten eiwit te zuiveren. Door het toedienen van een osmotische shock kunnen eiwitten in de periplasmatische ruimte afgegeven worden aan het medium. Dit gaat gepaard met de afgifte van endotoxines waardoor extra zuivering nodig is, anders zouden de endotoxines bij toediening van het therapeutische eiwit een immuunrespons kunnen opwekken. Directe extracellulaire secretie van een recombinant eiwit door een bacterie zou een oplossing kunnen zijn. Een onvolledig transport door het cytoplasmatisch membraan en proteolyse in de periplasmatische ruimte door endotoxines zijn andere tekortkomingen. Intracellulaire accumulatie, misvouwing en aggregaat vorming zijn beperkingen bij de productie van enzymen waarbij de biologische activiteit verloren gaat. [19,22,25,26]. Door verschillende beperkingen in zowel de productie**-** als de secretiesystemen van *E. coli* is het aantrekkelijk om opzoek te gaan naar een andere gastheer voor therapeutische eiwitproductie (Tabel 1).

Een andere gramnegatieve en niet**-**pathogene bacterie die gebruikt kan worden voor recombinante eiwitproductie is *Pseudomonas fluorescens*.Van *P. fluorescens* zijn verschillende productiesystemen bekend die geschikt zijn voor therapeutische eiwitproductie. Het *tac* en *lac* promotor systeem die geïnduceerd worden door IPTG of lactose zijn hier voorbeelden van. Het uitscheiden van endotoxines is net als bij *E. coli* een beperking van het secretiesysteem die extra zuivering vergt. In *P. fluorescens* vindt zowel secretie in het periplasma plaats als extracellulair wat zuivering weer vereenvoudigd (Tabel 1) [19].

*Bacillus* is ook geschikt voor het recombinant produceren van eiwitten. Deze bacterie wordt veel gebruikt voor homologe en heterologe enzym productie voor wasmiddelen en voor gebruik in de zetmeel industrie. *Bacillen* brengen geen risico’s voor de gezondheid met zich mee en hebben een ‘generally regarded as safe’ (GRAS) status. *Bacillen* zijn grampositief wat secretie in het externe milieu vereenvoudigd, eiwitten hoeven maar één membraan te passeren. Een ander voordeel ten opzichte van *E. coli* is dat *Bacillus* geen endotoxines uitscheidt wat zuivering van recombinante eiwitten minder gecompliceerd maakt. Een beperking van het gebruik van *Bacillus* is dat het een omvangrijk en complex extracellulair proteolytisch systeem bevat dat recombinante eiwitten af kan breken. Dit proteolytische systeem bestaat uit 7 gesecreteerde en 5 celwand gebonden proteasen. Mutante stammen zijn aanwezig, zoals WB800 waarbij alle 7 gesecreteerde proteasen ontbreken en de celwand gebonden protease WprA. Een andere beperking is de plasmide instabiliteit die *Bacillus* bacteriën vertonen als deze getransformeerd worden met een ‘vreemde’ plasmide (Tabel 1) [22,26, 33].

**2.3 *Lactococcus* als gastheer voor de productie van therapeutische eiwitten**

Door de grote verscheidenheid aan therapeutische eiwitten en de beperkingen van verschillende gastheren is het wenselijk om verder te zoeken naar andere geschikte eiwit producerende bacteriën. Door de verschillende eigenschappen van *Lactococcus* die recombinante eiwitproductie vereenvoudigen zijn deze bacteriën een goed alternatief. *Lactococcen* zijn bolvormige, grampositieve en fermenterende bacteriën. Bij de omzetting van suiker in ATP met behulp van enzymen ontstaat melkzuur als bijproduct. Door de vorming van dit melkzuur worden *Lactococcen* veelvuldig gebruikt voor de industriële productie van gefermenteerde zuivelproducten, zoals melk, kaas, boter en yoghurt, maar ook als conserveermiddel of voor de productie van verschillende voedingscomponenten. Door het jarenlange gebruik van *Lactococcen* in de voedingsindustrie zijn de gezondheidseffecten van deze bacteriën goed bekend. Een *Lactococ* is niet (opportunistisch) pathogeen, maar heeft ook niet direct een gunstig effect op de gezondheid en is dus geen probiotica. *Lactococcen* komen voor in de normale darmflora en hebben net als *Bacillen* een GRAS status [1,14,21,22,26]. Verschillende eigenschappen maken *Lactococcen* een geschikte gastheer voor de productie van therapeutische eiwitten. De nucleotide volgorde van het relatief kleine genoom van *Lactococcen* is voor een aantal stammen volledig bepaald, waaronder die van de *Lactococcus lactis* laboratoriumstam MG1363. Daarnaast zijn er verschillende genetische tools ontwikkeld die het genetische modificeren van *Lactococcen* mogelijk maken. Het metabolisme van een *Lactococ* is simpel en goed bekend, wat analyseren van metabolische routes vereenvoudigd. Doordat *Lactococcen* net als *Bacillen* grampositief zijn is secretie in het externe milieu beter mogelijk en vindt er minder snel intracellulaire accumulatie en aggregaat vorming plaats bij overexpressie van het recombinante eiwit. Het secretiesysteem van een *Lactococ* is in vergelijking met *E. coli* en *Bacillen* relatief eenvoudig, er wordt hoofdzakelijk maar één extracellulair eiwit gesecreteerd. Daarnaast zijn *Lactococcen* endotoxine vrij. Dit alles zorgt voor een eenvoudige zuivering van recombinante eiwitten. In tegenstelling tot *Bacillen* bevatten *Lactococcen* een veel minder complex extracellulair proteolytisch systeem, alleen de celmembraan gebonden protease HtrA, de celwand gebonden protease PrtP en de intracellulaire protease ClpP zijn bekend. Dit verlaagt de hoeveelheid afbraak en tevens is een protease vrije mutant beschikbaar. *Lactococcen* zijn ook geschikt voor groei op industrieel niveau [1,4,14,19,22,26,30]. Een beperking aan het gebruik van *Lactococcen* als eiwitproducent is de plasmide instabiliteit. De ‘vreemde’ plasmide met het recombinante gen is dan niet goed verenigbaar met de gastheer of een reeds al aanwezige plasmide. Instabiliteit van de recombinante plasmide zorgt voor een lagere productie van het recombinante eiwit. Een oplossing zou *Lactococcus lactis* M4 kunnen zijn die geen plasmiden bevat en in staat is om gemakkelijk getransformeerde plasmiden te herbergen (Tabel 1) [26].

Tabel 1: Voordelen en beperkingen van *E. coli*, *P. fluorescens*, *Bacillus* en *Lactococcus* voor de productie van recombinante eiwitten met therapeutische doeleinden.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | ***E. coli*** | ***P. fluorescens*** | ***Bacillus*** | ***Lactococcus*** | **Referenties** |
| Secretie locatie | Intracellulair/ Periplasmatische ruimte (gramnegatief) | Periplasmatische ruimte/ Extracellulair (gramnegatief) | Extracellulair (grampositief) | Extracellulair(grampositief) | 19,22,33 |
| Endotoxines | Ja | Ja | Nee | Nee | 19, 22 |
| GRAS status | Nee | Nee | Ja | Ja | 19, 22 |
| Extracellulair Proteolytische systeem |  |  | 7 extracellulaire en 5 celwand gebonden proteasen (Een WB800 mutant is beschikbaar, waarbij alle 7 extracellulaire en één celwand gebonden protease inactief zijn) | Eén celmembraan en één celwand gebonden protease (Een geheel protease vrije mutant is beschikbaar) | 22,33 |
| Aantal gesecreteerde eiwitten |  |  | Meerdere | Hoofdzakelijk alleen Usp45  | 22 |
| Plasmide instabiliteit |  |  | Ja | Ja, maar gebruik van *Lactococcus lactis* M4 is een oplossing | 26 |

**3. Modificatie van eiwitexpressie systemen van *Lactococcus***

Genetisch manipuleren van *Lactococcus* wordt vereenvoudig door het feit dat de nucleotide volgorde van het genoom volledig bepaald is en er verschillende genetische tools beschikbaar zijn [22]. Transformatie, klonering, mutagenese en het gebruik van vectoren behoren tot de mogelijkheden [21,34]. Om *Lactococcus* recombinante eiwitten te laten produceren kan gebruik worden gemaakt van een productiesysteem, ook wel een eiwitexpressie systeem, voorkomend in een chromosoom of plasmide. Veelal worden enkele natuurlijk voorkomende genen van het eiwitexpressie systeem verwijderd en vervangen door het gen van het recombinante eiwit. Het recombinante gen wordt dan afgelezen en vertaald met behulp van de genetische en moleculaire machinerie van het al bestaande expressiesysteem. Promotors, regulator genen en epigenetische factoren behoren hier toe. Een recombinant eiwit gen, een vector en een gastheer als *Lactococcus* zijn drie vereisten voor recombinante eiwitproductie [22,26].

Een groot aantal eiwitexpressie systemen worden in *Lactococcus* aangestuurd door promotors die altijd dezelfde activiteit vertonen onder alle omstandigheden. Deze constitutieve promotors worden niet gecontroleerd door een regulator of door groei condities. Het is mogelijk om met behulp van deze constitutieve promotors recombinant eiwit te produceren in *Lactococcus*. Toch neemt het gebruik van constitutieve promotors enkele beperkingen met zich mee. Zo kan de constante activiteit van de promotor tot hoge intracellulaire eiwit concentraties leiden wat weer kan leiden tot accumulatie, aggregatie en zelfs degradatie van het eiwit. Uiteindelijk kan dit schadelijk zijn voor *Lactococcus*. Daarom verdienen induceerbare promotors de voorkeur. Dit zijn promotors die worden gecontroleerd door regulatoren als inductoren en repressoren of door omgevingsfactoren als de pH, temperatuur, osmolariteit, ion concentratie of kool**-** en stikstof bronnen, waarbij de activiteit dus afhangt van specifieke stimuli. In *Lactococcus* komen een groot aantal induceerbare promotors voor die de genexpressie reguleren. Induceerbare promotors maken het mogelijk om de productie van een recombinant eiwit te regeluren wat intracellulaire accumulatie en aggregatie kan voorkomen. In geval van toxische eiwitten is regulatie van de eiwitproductie zeer wenselijk. Naast het gebruik van constitutieve of induceerbare promotors behoort het inbouwen van een geheel nieuwe promotor ook tot de mogelijkheden. In *Lactococcus* zijn verschillende induceerbare eiwitexpressie systemen beschreven [1,17,22,34].

Het meest gebruikte en best gedocumenteerde eiwitexpressie systeem voor heterologe eiwitproductie in *Lactococcus* die aangestuurd wordt door een induceerbare promotor is het ‘NIsin-inducible Controlled gene Expression’ (NICE) systeem. Dit systeem wordt gereguleerd door de antimicrobiële peptide nisine. Andere veel gebruikte expressiesystemen zijn het P170 en hetPznZitR gecontroleerde eiwitexpressie systeem. Geïnduceerd door respectievelijk de pH of de zink concentratie in de omgeving [22]. Naast deze veelgebruikte eiwitexpressie systemen bestaan er ook systemen die worden geïnduceerd door suikers vaak in de vorm van lactose of inductie via bacteriofagen, de temperatuur, de zoutconcentratie, een purine of door een ‘heat shock’. Deze eiwitexpressie systemen zijn vaak minder goed bekend of geschikt voor recombinante eiwitproductie, waardoor het NICE, P170 en PznZitR expressiesysteem vaker worden gebruikt [6,7]. Uitgezonderd van het feit dat de activiteit van deze eiwitexpressie systemen extern kunnen worden gereguleerd, zijn er onderling ook grote verschillende. Door verschillende voor**-** en nadelen is het ene systeem geschikter voor de productie van een bepaald recombinant eiwit in vergelijking tot de ander. Zo zou een laag inductie niveau, een onwenselijke basale expressie en vereiste regulator genen beperkende kunnen werken. De juiste combinatie van een eiwitexpressie systeem en het gen van een recombinant eiwit zorgt voor een kwalitatief en kwantitatief hoge eiwitproductie [3,15,19].

**3.1 Het nisine gecontroleerde eiwitexpressie systeem**

Het NICE systeem (fig. 1) is het meest gebruikte eiwitexpressie systeem voor regulatie van recombinante eiwitproductie in *Lactococcus*, maar ook in andere melkzuur bacteriën [22,26]. Het is een veelzijdig en strak gereguleerd systeem en heeft tevens een hoge mate van inductie en is makkelijk in gebruik. Het systeem produceert de antimicrobiële peptide nisine, een lantibiotica. Nisine is een peptide van 34 aminozuren, waarvan er 5 vrij zeldzaam zijn. Deze aminozuren worden na posttranslationele modificaties in het precursor eiwit ingebouwd. Nisine heeft een hele brede antimicrobiële werking, waardoor het veelvuldig wordt gebruikt als conserveermiddel in de voedingsindustrie. Net als veel andere bacteriocine eiwitexpressie systemen wordt ook het NICE systeem gereguleerd door een twee componenten regulatiesysteem [1,21,22,34].

Het NICE systeem bestaat uit een cluster van 11 genen en 3 promotors. Het *nisA* gen is één van deze 11 genen en produceert het precursor eiwit van nisine. *NisA* wordt aangestuurd door de *PnisA* promotor. Modificatie, translocatie en verwerking van het nisine precursor eiwit wordt gereguleerd door de genen *nisB, nisC, nisP* en *nisT*. Immuniteit tegen de antimicrobiële werking van nisine wordt gereguleerd door de genen *nisI, nisF, nisE* en *nisG*. Alle deze 8 auto**-**regulerende genen worden aangestuurd door de *PnisF* promotor. De twee resterende genen in de cluster van 11 zijn *nisR* en *nisK* en zijn betrokken bij de genexpressie regulatie. De eiwitten die na transcriptie en translatie uit *nisR* en *nisK* ontstaan vormen samen het twee componenten regulatie systeem en vormen de basis van de werking het NICE systeem. De promotor *PnisRK* stuurt deze twee genen aan [21,26,34]. NisK is een histidine eiwit kinase in het cytoplasmatische membraan. Daar functioneert het als een receptor voor posttranslationeel nisine. Door binding van nisine aan de NisK receptor vindt autofosforylatie van het complex plaats. Deze autofosforylatie zorgt voor fosforylatie van de intracellulaire respons regulator NisR. Waartoe het NisR actief wordt en het de promotors *PnisA* en *PnisF* induceert zonder inductie van de eigen *PnisRK* promotor [21,34]. Inductie van *PnisA* levert na ribosomale synthese weer nieuw eiwit precursor nisine op. Na chemische en structurele verandering van nisine door verschillende enzymatische modificaties en translocatie aan het celmembraan ontstaat het biologisch actieve nisine. Binding van nisine aan LipidII, een celwand synthese precursor, levert een complex op dat in staat is kleine poriën in het cytoplasmatische membraan te vormen wat resulteert in het ‘lekken’ van kleine moleculen, zoals ATP. Dit kan uiteindelijk resulteren in celdood, de manier waarop nisine zijn antimicrobiële werking uitvoert [21].

Het NICE systeem kan zodanig gemodificeerd worden dat deze recombinante eiwitten kan produceren voor therapeutische doeleinden. Daartoe worden de genen van het NICE systeem uit *Lactococcus* verwijderd en wordt het therapeutische eiwit gen in het chromosoom of de plasmide ingebouwd. Voor dit gen wordt de promotor van de precursor nisine, *PnisA*, gezet. Daarnaast worden de genen van de genexpressie regulatoren *nisR* en *nisK* ook in het chromosoom of de plasmide gezet. Door toevoeging van een subinhiberende hoeveelheid nisine leidt dit tot binding aan de NisK receptor, activatie van NisR, inductie van de *PnisA* promotor en uiteindelijk tot productie van het recombinante eiwit. Afhankelijk van het signaalpeptide van het therapeutische eiwit kan het intracellulair, in de celwand of extracellulair terecht komen. Bij toevoeging van een steeds grotere hoeveelheid nisine ontstaat een lineaire respons curve wat impliceert dat dosering van het heterologe eiwit mogelijk is. Zo ontstaat er dus een gecontroleerde recombinante eiwitexpressie door toevoeging van nisine [21,26,34]. Door het recombinante gen en de promotor te fuseren met een oplosbaarheid verhogend eiwit gen, zoals het eiwit thioredoxine, kan productie en secretie worden verhoogd [14].

**3.2 Het P170 gecontroleerde eiwitexpressie systeem**

Het P170 expressie systeem (fig. 1) is een ander systeem dat ook geschikt is voor recombinante eiwitproductie, maar wordt minder frequent gebruikt. Het systeem bestaat uit een gen met een nog onbekende werking genaamd *orfX*. De aansturing van *orfX* vindt plaats door de promotor P170. Inductie van deze promotor vindt plaats bij een lage pH (pH<6) tijdens de overgang van transitie naar de stationaire groei fase van *Lactococcus*. De combinatie van een lage pH en een overgang in de groeifase wordt gecreëerd door de productie van melkzuur, en is daarmee indirect de inductor van de P170 promotor [14,19,22]. De promotor P170 is in het totaal 14 basen paren lang en bestaat uit de drie tetranucleotide boxen A, C en D. De boxen A en C zijn verantwoordelijk voor de P170 activiteit, waarbij de promotor activiteit meer afhangt van box C dan van box A. De correcte positionering van de drie boxen in de promotor tezamen met box D maken P170 gevoelig voor de pH. Omdat inductie van P170 afhankelijk is van de pH wordt het complex van boxen de ACiD**-**box genoemd. Een gen dat betrokken is bij de regulatie van deze ACiD**-**box is *rcfB*. RcfB is een eiwit uit de transcriptie regulator eiwit familie *Crp-Fnr* bestaande uit 11 eiwitten en voorkomend in grampositieve bacteriën. Al deze 11 eiwitten activeren of inhiberen een promotor door binding aan DNA boxen in die promotor en reguleren daarmee de transcriptie. Waarschijnlijk bindt ook RcfB aan de ACiD**-**box. En waarschijnlijk wordt de promotor van *rcfB* geactiveerd door een zure omgeving, waardoor expressie toeneemt, er meer binding aan de ACiD-box plaatsvindt en de P170 activiteit omhoog gaat. Inactiviteit van RcfB leidt tot een verminderde P170 activiteit. Overexpressie van RcfB leidt tot een verhoogde P170 activiteit bij een lage pH en in een iets mindere mate ook bij een neutrale pH. Functioneel is RcfB waarschijnlijk betrokken bij aanpassing van *Lactococcus* in stresssituaties gevormd door zuur en daarmee is de functionaliteit van *OrfX* ook gerelateerd aan een zuur stress respons [14,18].

*Lactococcus* is een fermenterende bacterie die melkzuur produceert tijdens het suiker metabolisme. Door accumulatie van melkzuur in het cytoplasma en in het extracellulaire milieu zal de pH dalen. Als de pH maar voldoende daalt zal op een gegeven moment de pH onder een bepaalde drempel waarde komen die leidt tot inductie van de P170 promotor en tot expressie van het *orfX* gen. Ondanks dat de precieze werking van dit gen onbekend is zal accumulatie van melkzuur en de daarbij gepaard gaande lage pH uiteindelijk leiden tot remming van de celgroei. Overschakeling naar de stationaire groeifase van *Lactococcus* is dan een beschermingsmechanisme getriggerd door een zuur milieu van het P170 eiwitexpressie systeem [17].

Net als het NICE expressie systeem is ook het P170 systeem auto**-**regulerend. Recombinante eiwitproductie vindt op een vergelijkbare manier plaats. *OrfX* wordt verwijderd en het gen dat een eiwit met een therapeutische werking produceert wordt in het chromosoom of in de plasmide ingebouwd. Plaatsing van dit gen voor de P170 promotor en toevoeging van suiker zal resulteren in expressie van het recombinante eiwit bij overgang van de transitie naar de stationaire groeifase. Het grote voordeel van het P170 systeem is dat *Lactococcus* zelf melkzuur produceert en dus indirect zelf voor inductie van de P170 promotor zorgt, een zelf induceerbaar systeem. Vele andere eiwitexpressie systemen, waaronder het NICE systeem, zijn niet zelf induceerbaar en is toevoeging van een exogene component zoals nisine, IPTG, natriumbenzoaat of antranilaat noodzakelijk [17].

**3.3 Het PznZitR gecontroleerde eiwitexpressie systeem**

Het PznZitR gecontroleerde eiwitexpressie systeem (fig. 1) is net als het NICE systeem een strak gereguleerd eiwitexpressie systeem, goedkoop en geschikt voor de productie van eiwitten op grote schaal en dus zeer bruikbaar voor het controleren van de productie van recombinante eiwitten [15]. PznZitR is de promotor van het *zitRSQP* operon. Dit operon bestaat uit vier genen, *zitR, S, Q* en *P*. ZitS is een lipoproteïne, ZitQ is een ATPase en ZitP is een permease. Samen vormen deze eiwitten een ABC transporter die betrokken is bij Zn­2+ opname. ZitR is een repressor eiwit en behoort tot de MarR familie van transcriptie regulatoren. ZitR reguleert de genen coderend voor de ABC transporter en daarmee indirect de zink opname. Inductie of repressie van de PznZitR promotor vindt plaats via zink. Een overmaat aan zink (Zn2+ > 1mM) zorgt voor repressie van de PznZitR promotor, terwijl een zink depletie (Zn2+ < 10μM) voor inductie zorgt. Ook ‘Ethylenediaminetetraacetic acid’ (EDTA) is in staat de PznZitR promotor te induceren, doordat het zinkionen kan binden en daarmee het binden van deze ionen aan de promotor voorkomt. Door het plaatsen van de PznZitR promotor voor een recombinant gen kan de expressie hiervan gereguleerd worden via de zink concentratie op verschillende manieren: zink en EDTA kunnen worden toegevoegd of inductie kan bereikt worden door zink depletie door eigen gebruik van *Lactococcus* [15,16,22].



Figuur 1: Schematische weergave van induceerbare eiwitexpressie systemen voor *Lactococcus*. Het nisine gecontroleerde genexpressie (NICE) systeem wordt geïnduceerd door binding van nisine aan NisK wat leidt tot autofosforylatie van dit complex, tot fosforylatie en activatie van NisR en tot inductie van de *PnisA* promotor (1). Het P170 gecontroleerde eiwitexpressie systeem wordt indirect geïnduceerd door melkzuur dat de pH gevoelige ACiD-box van de P170 promotor stimuleert door binding aan het regulator eiwit RcfB (2). Het PznZitR gecontroleerde eiwitexpressie systeem wordt geïnduceerd door zink depletie of EDTA, terwijl repressie plaats vindt door een hoge zink concentratie (3). Door de genen die normaal voorkomen in het eiwitexpressie systeem (*nisA, orfX, zitSQP*) te vervangen door een gen (*gen X*) dat een eiwit tot expressie brengt met een therapeutsische werking kan dit eiwit geproduceerd worden met behulp van de machinerie van het eiwitexpressie systeem.

**4. Modificatie van het eiwit secretie systeem van *Lactococcus***

Therapeutische eiwitproductie in *Lactococcus* is mogelijk door insertie van het recombinante gen in een vector door gebruik te maken van een eiwitexpressie systeem. Door gebruik te maken van induceerbare systemen is het mogelijk de recombinante eiwitproductie te reguleren [22]. Nadat het recombinante eiwit geproduceerd is kan het op verschillende cellulaire locaties terecht komen: intracellulair, celwand gebonden of extracellulair. Afhankelijk van het therapeutische eiwit en doel verdient een bepaalde cellulaire locatie de voorkeur. Het voordeel van intracellulaire geproduceerde therapeutische eiwitten is dat deze in staat zijn te ontsnappen aan extreme omstandigheden in het lichaam, zoals zure maagsappen na orale toediening of aan degradatie enzymen op de slijmvliezen. Hierbij is er wel een mindere interactie van het eiwit en de omgeving wat bij extracellulaire secretie niet het geval is. Extracellulaire gesecreteerde eiwitten zijn daarentegen weer gevoeliger voor afbraak. Recombinante celwand gebonden eiwitten hebben als voordeel dat ze zowel een redelijke interactie met de omgeving hebben als een beperkte afbraak [1]. Om een recombinant eiwit in de celwand of in het externe milieu te krijgen kan gebruik worden gemaakt van een homologe signaalpeptide van het secretiesysteem. Het gen van deze signaalpeptide wordt dan samen met een promotor gekoppeld aan het gen van het recombinante eiwit.

*Lactococcus* heeft een relatief eenvoudig secretie systeem, genaamd het ‘Sec-pathway’ (fig. 2). Er wordt hoofdzakelijk één eiwit gesecreteerd, de celwand hydrolase Usp45 [22]. Dit celwand hydrolyserende en segregerende eiwit bevat de signaal peptide SPUsp45. Deze signaalpeptide is zeer efficiënt in het secreteren van Usp45 en daarmee uitermate geschikt voor recombinante eiwitsecretie. Andere maar vaak minder efficiënte signaalpeptiden van *Lactococcus* als SP310, SPExp4 en AL9 zijn ook in staat gebleken recombinante eiwitten te secreteren [22,25]. Daarnaast zijn nog een paar andere kleine secretiesystemen in *Lactococcus* bekend, zoals de ‘Tat pathway’ en die van de ABC-transporteurs [14]. Het secretie systeem van *Lactococcus* is grofweg in drie stappen onder te verdelen. Eerst vinden de zogenaamde vroege secretiestappen plaats in het cytoplasma. Bestaande uit synthese en herkenning van het precursor eiwit en de daaropvolgende sturing naar de translocatie machinerie. Sturing van het precursor eiwit vindt voornamelijk plaats door de signaalpeptide zelf. Daarna volgen de intermediaire secretie stappen in het celmembraan bestaande uit passage van het precursor eiwit door het celmembraan via het zogenaamde Sec translocon en het afknippen van de signaalpeptide aan de N**-**kant door een type I signaal peptidase, SipL. De late secretiestappen vinden plaats in de celwand. Hier wordt het eiwit gevouwen en afgegeven aan het medium. Vouwing van het eiwit in de uiteindelijke actieve vorm vindt plaats door verschillende eiwitten als chaperonnes en vouwingskatalysatoren welke deel uit maken van een groter eiwit netwerk. Onder dit netwerk vallen ook de proteasen die ongevouwen of slecht gevouwen eiwitten afbreken. In geval van overexpressie breken proteasen ook eiwitten af [19,22,25]. Eiwitsecretie is in Lactococcus een meer stappen proces waarbij veel verschillende factoren in verschillende cel compartimenten, zoals het cytoplasma, celmembraan en de celwand, een rol spelen. Deze verschillende factoren zouden vooral bij overexpressie van een recombinante eiwit limiterend kunnen werken op de eiwitsecretie (Fig. 2). Deze limiterende factoren zijn: de efficiëntie en translocatie van SPUsp45, modificatie door chaperonnes en transport door de celwand. Door aanpassingen aan te brengen, zoals het introduceren van een synthetische propeptide of complementatie van het Sec translocon, kan het secretiesysteem verbeterd worden resulterend in een kwalitatief en kwantitatief hogere eiwitopbrengst [22,25].

**4.1 Efficiënter maken van het SPUsp45 signaalpeptide**

Ondanks dat SPUsp45 in vergelijking met andere signaalpeptiden al zeer efficiënt is in het secreteren van eiwitten kan deze nog efficiënter worden gemaakt. Dit kan door kleine aanpassingen aan te brengen in de mRNA sequentie en de aminozuurvolgorde, alvorens deze bepaald te hebben. De huidige limitatie van de mRNA structuur van SPusp45 is de secundaire structuur van het mRNA molecuul. Deze structuur leidt tot een verminderde translatie initiatie. Door kleine aanpassingen in de vouwing van het mRNA molecuul aan te brengen kan de secretie verhoogd worden met 16%. Nog meer effect hebben aanpassingen in de aminozuurvolgorde op de eiwitsecretie. Door mutaties aan te brengen op bepaalde posities is het gelukt de secretie te verhogen naar 45%. Naast aanpassingen in de mRNA sequentie of de aminozuurvolgorde zijn er nog vele andere aanpassingen die gedaan kunnen worden om SPUsp45 nog efficiënter te maken in het secreteren van eiwitten. Bijvoorbeeld het aanbrengen van aanpassingen in de algehele ladingsbalans, de hydrofobiciteit of in de interacties tussen de N-, H- en C-regio’s van de signaalpeptide [25].

**4.2 Fusie van Sp45Usp en een propeptide voor recombinante eiwitproductie**

Door fusie van SPUsp45 en het recombinante eiwit met een propeptide kan secretie worden verhoogd. Een voorbeeld van een propeptide is ‘LEISSTCDA’, die een verhoogde secretie liet zien voor verschillende eiwitten bij fusie met verschillende signaalpeptiden. Waarschijnlijk zorgt de negatieve lading van de propeptide voor optimalisering van de ladingsbalans rond het transmembraan domein van de signaalpeptide en vergroot daarmee de efficiëntie van eiwit translocatie [22,25].

**4.3 De secretie machinerie complementeren met SecDF**

Het Sec translocon van *Lactococcus* bestaat uit verschillende delen. SecA is een ATPase afhankelijke motor die voor een groot deel de energie levert die nodig is voor translocatie van het ongevouwen eiwit. SecY, SecE en SecG zijn eiwitten die in het membraan van *Lactococcus* zitten en een kanaal vormen door dit hydrofobe membraan zodat membraanpassage van het eiwit mogelijk is. Het Sec translocon van *Lactococcus* is redelijk eenvoudig in vergelijking met bijvoorbeeld de Sec machinerie in *Bacillen* en *E. coli.* Beide bevatten nog extra translocon eiwitten, namelijk SecD en SecF voor *E. coli* en SecDF voor *Bacillen*. Door SecDF van een *Bacil* aan het Sec translocon systeem van *Lactococcus* toe te voegen kan de eiwitsecretie worden verhoogd, zoals is aangetoond met de recombinante *Staphylococcus aureus* nuclease NucT [14,25].

**4.4 Overige aanpassingen aan het secretiesysteem**

Verder zijn er nog tal van andere kleine aanpassingen die gedaan zouden kunnen worden om de secretie van recombinante eiwitten te verhogen. Zo kan de type 1 signaalpeptidase SipL van *Lactococcus* tot overexpressie worden gebracht. Secretie inefficiëntie door het niet goed knippen van SPUsp45 wordt dan voorkomen. *Lactococcus* bevat *ffh* genen die voor eiwitcomponenten coderen die deel uitmaken van signaal herkenningseiwitten en betrokken zijn bij de eiwitsecretie en –vouwing. Door overexpressie van deze eiwitten kan de secretie efficiënter worden gemaakt. Door aanpassingen aan te brengen in verschillende eiwitten die betrokken zijn bij de vouwing en afbraak van eiwitten zoals chaperonnes, vouwingskatalysatoren en proteasen kan secretie worden verbeterd. Een voorbeeld is het lipoproteïne PmpA, dat eiwitten aan het celoppervlak de juiste vorm geeft, tot overexpressie laten brengen zodat het aandeel ongevouwen of slecht gevouwen eiwitten afneemt. Een ander voorbeeld is de inactivatie van de celmembraan gebonden protease HtrA. HtrA is verantwoordelijk voor de afbraak van niet functionele eiwitten of normale eiwitten bij overexpressie. Door een HtrA vrije mutant recombinant eiwit te laten produceren kan de opbrengst worden verhoogd. Inactivatie van de celwand gebonden protease PrtP en de intracellulaire protease ClpP zal de opbrengst verder verhogen [4,14,22].

****

Figuur 2: Schematische weergave van het ‘Sec-pathway’ secretiesysteem van *Lactococcus*. Na genetische modificatie ondergaat het recombinante eiwit (Eiwit X) verschillende stappen voordat deze extracellulair gesecreteerd kan worden. Na synthese van Eiwit X (1) vindt degradatie van een niet functioneel eiwit plaats (2a) of struring van het eiwit naar het ‘Sec translocon’ (2b). Tijdens membraanpassage via het ‘Sec translocon’ (3) wordt het signaalpeptide van Eiwit X verwijderd door het signaalpeptidase SipL (4). Vervolgens krijgt het ongevouwen Eiwit X zijn actieve conformatie door chaperonnes en andere vouwingsfactoren (5a). Ongevouwen of foutief gevouwen Eiwit X wordt afgebroken door proteasen, zoals het celmembraan gebonden protease HtrA (5b en 6). Uiteindelijk vindt extracellulaire secretie van eiwit X plaats (7). Door verschillede aanpassingen in het secretiesysteem van *Lactococcus* aan te brengen kan secretie en opbrengst van Eiwit X worden verhoogd. Deze aanpassingen (in rood aangegeven) zijn: het tot overexpressie brengen van *ffh* genen, SipL en vouwingsfactoren of door de signaalpeptide van Eiwit X efficiënter te maken, te fuseren met een propeptide, het ‘Sec translocon’ systeem complementeren met SecDF of het ontwikkelen van een protease vrije *Lactococcus* mutant.

**5. Ontwikkeling van een nieuw eiwitexpressie en secretie systeem in *Lactococcus***

Voor recombinante eiwitproductie is een eiwitexpressie systeem vereist. De hoeveelheid, biologische activiteit en intracellulaire locatie zijn variabele factoren die gestuurd kunnen worden door het eiwitexpressie systeem zelf en door het secretiesysteem van *Lactococcus*. Wenselijk is een kwalitatief en kwantitatief zo hoog mogelijke opbrengst. Dit kan bereikt worden door niet alleen een passend eiwitexpressie systeem te kiezen, maar dit ook te combineren met verschillende strategieën die het secretieproces bevorderen.

Zo werd de combinatie van recombinante eiwitproductie met behulp van het PznZitR eiwitexpressie systeem en een SPexp4 signaalpeptide in een HtrA vrije mutant getest. Door het combineren van meer verschillende eiwitexpressie**-** en secretiesystemen en strategieën is verdere verhoging van de recombinante eiwit opbrengst mogelijk [22].

**6. Recombinante eiwitproductie in *Lactococcus* op industrieel niveau**

Om afbraak van het recombinante eiwit en de dosis**-** en toedieningsfrequentie van recombinant eiwit producerende bacteriën zo laag mogelijk te houden is het noodzakelijk om de secretie van recombinante eiwitten voor therapeutische doeleinden zo efficiënt en hoog mogelijk te maken [1,22]. Het verhogen van de recombinante eiwitproductie kan op verschillende manieren, door in te grijpen op of het verbeteren van de al bestaande eiwitexpressie**-** en secretiesystemen of door een heel nieuw eiwitexpressie**-**/ secretiesysteem samen te stellen, om uiteindelijk secretie en productie van recombinante eiwitten te vergroten en zuivering te vereenvoudigen [22]. *Lactococcus* heeft voor groei alleen voeding in de vorm van suiker en pH en temperatuur regulatie nodig, wat groei op industrieel niveau vereenvoudigd [14]. Echter kan de productie van melkzuur een beperking vormen. Melkzuur remt de groei zelfs als de pH constant wordt gehouden door een base. Remming van de groei leidt tot een verminderde recombinante eiwit opbrengst. Daarom is er een nieuwe technologie ontwikkelend, de ´Reverse Electro Enhanced Dialysis´ technologie. Deze technologie maakt gebruik van een filter die kleine negatief geladen moleculen, zoals melkzuur, kunnen filtreren waardoor de melkzuur concentratie laag wordt gehouden en groei van *Lactococcus* niet wordt geremd [14,19,22]. De groeiperiode en de overleving op lange termijn van *Lactococcus* kunnen vergroot worden door toevoeging van heme. Normaal gesproken heeft zuurstof een negatief effect op de groei en overleving van *Lactococcen*, omdat deze bacteriën facultatief anaeroob zijn. Door toevoeging van heme zijn *Lactococcen* in staat om te respireren, waarbij groei en overleving meer toenemen dan onder fermentatie condities [8]

**7. Discussie**

De eiwitexpressie systemen en het secretie systeem van *Lactococcus* in combinatie met de specifieke eigenschappen maken deze gastheer geschikt voor recombinatie eiwitproductie die gebruikt kan worden voor verschillende therapeutische toepassingen. Productie van recombinante eiwitten is mogelijk door gebruik te maken van het NICE, P170 of PznZitR gecontroleerde eiwitexpressie systeem. De recombinante eiwitproductie kan dan gereguleerd worden door de inductoren nisine en melkzuur in geval van het NICE en P170 expressiesysteem. PznZitR gecontroleerde expressie vindt plaats via de zinkconcentratie, die bij hoge concentraties zorgt voor inductie en bij lage concentraties voor repressie van het systeem. Door een gen dat codeert voor een eiwit die de oplosbaarheid van het recombinante eiwit verhoogd toe te voegen aan het eiwitexpressie systeem kan de secretie van het recombinante eiwit worden verhoogd [19,22]. Andere aanpassing die secretie verhogen zijn: het efficiënter maken van het vaak gebruikte signaalpeptide SPUsp45, een signaalpeptide fuseren met een propeptide, het Sec translocon systeem complementeren met SecDF uit *Bacillen*, een HtrA en PrtP protease vrije mutant maken of door *ffh* genen, de signaalpeptidase SipL, chaperonnes en andere vouwingskatalysatoren tot overexpressie te laten brengen. Het ultieme doel is vervolgens om de juiste combinatie van een eiwitexpressie systeem en aanpassingen in het secretiesysteem te vinden om de recombinante eiwit opbrengst zoveel mogelijk te optimaliseren [1,14,22,25]. Door verder nog beperkingen in de groei van *Lactococcus* op grote schaal weg te nemen, bijvoorbeeld door gebruik te maken van de ´Reverse Electro Enhanced Dialysis´ technologie die groeiremming als gevolg van melkzuur accumulatie voorkomt, of door toevoeging van heme kan de recombinante eiwit opbrengst volledig gemaximaliseerd worden [14,19, 33]. Naast de verwerking van therapeutische eiwitten in geneesmiddelen en mucosale en systemische vaccins kan ook de gastheer zelf *in situ* worden toegediend, zodat er een rechtstreekse secretie van het therapeutische eiwit in het lichaam plaats vindt. Deze *in situ* toedieningsvorm kan ook op een andere manier gerealiseerd worden. Een mogelijkheid is om gebruik te maken van het LysM domein van LysM bevattende eiwitten die in staat zijn niet covalent maar wel sterk te binden aan de celwand van grampositieve bacteriën. Door deze LysM domeinen te fuseren met therapeutische eiwitten is het mogelijk om deze eiwitten te laten binden aan de celwand van grampositieve bacteriën, zodat een bacterie ontstaat die het therapeutische eiwit op zijn celwand tot expressieve brengt en vervolgens kan worden gebruikt voor bijvoorbeeld mucosale of systemische vaccins. Het voordeel hiervan in vergelijking met het toedienen van bacteriën die het therapeutische eiwit in het lichaam rechtstreeks secreteerd, is dat er geen gebruik gemaakt hoeft te worden van genetisch gemodificeerde bacteriën zodat humane toediening ook mogelijk is [31]. Daarnaast zal een verminderde werking van het therapeutische eiwit door een verminderde eiwitsecretie ook niet aan de orde zijn. Toch nemen beide toetsingsvormen enkele beperkingen met zich mee bij orale toediening. Vooral de hoge proteolytische activiteit, de lage pH en de verminderde permeabiliteit van het darmkanaal in het verteringsstelsel voorkomen dat therapeutische eiwitten en levende gastheren de plek van werking zullen bereiken. Dit resulteert in een toename van de dosis**-** en toedieningsfrequentie van het eiwit of de gastheer. Chemische modificaties van het therapeutische eiwit of remming van afbraakenzymen in het verteringsstelsel verlagen deze dosis**-** en toedieningsfrequentie, wat het belang van het zoeken naar alternatieve toedieningsvormen van therapeutische eiwitten niet doet afnemen. Door gebruik te maken van nanodeeltjes gemaakt van polymeren of liposomen kan een therapeutisch eiwit beschermd worden tegen afbraak in het verteringsstelsel en kan absorptie via de darmen beter worden gereguleerd. Waardoor chemische en fysische modificaties van het actieve eiwit zelf niet meer nodig zijn [9].

*Lactococcus* is in potentie dus een geschikte gastheer voor de productie van recombinante eiwitten voor therapeutische doeleinden. Eigenschappen van deze bacteriën als het grampositief zijn, het kleine genoom dat relatief genetische gemakkelijk te modificeren valt, het eenvoudige secretie en extracellulaire proteolytische systeem en het ontbreken van endotoxines maakt *Lactococcus* een geschikte gastheer boven *E. coli*, *B. subtilus* en *P. fluorescens*. De therapeutische eiwitproductie voor ontwikkeling van geneesmiddelen en mucosale en systemische vaccins is dan zo kosten**-**efficiënt mogelijk, wat bevorderend werkt bij de behandeling van verschillende ziekten [1,14,19,22].

**8. Referenties**

[1] Bermúdez-Humarán, L. G. (2009). *Lactococus lactis* as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. *Hum Vaccin., 5*(4), 264-267.

[2] Bermúdez-Humarán, L. G., Kharrat, P., Chatel, J. and Langella, P. (2011). *Lactococci* and *lactobacilli* as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microb Cell Fact., 10*(Suppl 1), S4.

[3] Bernaudat, F., Frelet-Barrand, A., Pochon, N., [Dementin, S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dementin%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Hivin, P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hivin%20P%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Boutigny, S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Boutigny%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Rioux, J. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rioux%20JB%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Salvi, D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Salvi%20D%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Seigneurin-Berny, D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Seigneurin-Berny%20D%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Richaud, P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Richaud%20P%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Joyard, J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Joyard%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Pignol, D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pignol%20D%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Sabaty, M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sabaty%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Desnos, T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Desnos%20T%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Pebay-Peyroula, E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pebay-Peyroula%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Darrouzet, E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Darrouzet%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205)., [Vernet, T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Vernet%20T%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205). and [Rolland, N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rolland%20N%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22216205). (2011). Heterologous Expression of Membrane Proteins: choosing the appropriate Host. *PLoS One, 6*(12), e29191.

[4] [Cortes-Perez, N. G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cortes-Perez%20NG%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16946256)., [Poquet, I](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Poquet%20I%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16946256)., [Oliveira, M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Oliveira%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16946256)., [Gratadoux, J. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gratadoux%20JJ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16946256)., [Madsen, S. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Madsen%20SM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16946256)., [Miyoshi, A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Miyoshi%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16946256)., [Corthier, G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Corthier%20G%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16946256)., [Azevedo, V](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Azevedo%20V%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16946256)., [Langella, P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Langella%20P%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16946256). and [Bermúdez-Humarán LG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Berm%C3%BAdez-Humar%C3%A1n%20LG%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16946256) (2006). Construction and characterization of a Lactococcus lactis strain deficient in intracellular ClpP and extracellular HtrA proteases. *Microbiology., 152*(Pt 9), 2611-2618.

[5] Deng, F. K.., Zhang, L., Wang, Y. T., Schneewind, O. and Kent, S. B. (2014). Total Chemical Synthesis of the Enzyme Sortase AΔN59 with Full Catalytic Activity. *Angew Chem Int Ed Engl.*, doi: 10.1002/anie.201310900.

[6] Djordjevic, G. M. and Klaenhammer, T. R. (1998). Inducible gene expression systems in *Lactococcus lactis*. *Mol Biotechnol., 9*(2), 127-139.

[7] Dodd, H. M., Horn, N., Hao, Z. and Gasson, M. J. (1992). A *lactococcal* expression system for engineered nisins. *Appl Environ Microbiol., 58*(11), 3683-3693.

[8] [Duwat](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Duwat%20P%5Bauth%5D), P., [Sourice](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sourice%20S%5Bauth%5D), S., [Cesselin](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cesselin%20B%5Bauth%5D), B., [Lamberet](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lamberet%20G%5Bauth%5D), G.,[Vido](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Vido%20K%5Bauth%5D), K.,[Gaudu](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gaudu%20P%5Bauth%5D), P.,[Le Loir](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Le%20Loir%20Y%5Bauth%5D), Y., [Violet](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Violet%20F%5Bauth%5D), F., [Loubière](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Loubi%26%23x000e8%3Bre%20P%5Bauth%5D),P. and [Gruss](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gruss%20A%5Bauth%5D), A. (2001). Respiration Capacity of the Fermenting Bacterium *Lactococcus lactis* and Its Positive Effects on Growth and Survival. *J Bacteriol., 183*(15), 4509-4516.

[9] Gupta, S., Jain, A., Chakraborty, M., Sahni, J. K., Ali, J. and Dang, S. (2013). Oral delivery of therapeutic proteins and peptides: a review on recent developments. [*Drug Deliv.*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23869787)*, 20*(6), 237-246.

[10] [Hendy, S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hendy%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=10648933)., [Chen Z. C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chen%20ZC%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=10648933)., [Barker, H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Barker%20H%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=10648933)., [Santa Cruz, S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Santa%20Cruz%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=10648933)., [Chapman, S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chapman%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=10648933)., [Torrance, L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Torrance%20L%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=10648933)., [Cockburn, W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cockburn%20W%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=10648933). and [Whitelam, G. C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Whitelam%20GC%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=10648933). (1999). Rapid production of single-chain Fv fragments in plants using a *potato virus X* episomal vector. [*J Immunol Methods.*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648933)*, 231*(1-2), 137-146.

[11] Hitchman, R. B., Possee, R. D. and King, L. A. (2009). Expression systems for recombinant protein production in insect cells. *Recent Pat Biotechnol., 3*(1), 46-54.

[12] Iwaki, M., Okahasi, N., Takahasi, I., Kanamoto, T., Sugita-konishi, Y., Aibara, K. and Koga, T. (1990). Oral immunization with recombinant Streptococcus lactis carrying the *Streptococcus* mutans surface protein antigen gene. *Infect Immun., 58*(9), 2929-2934.

[13] [Jain, A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jain%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23662604)., [Jain, A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jain%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23662604)., [Gulbake, A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gulbake%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23662604)., [Shilpi, S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shilpi%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23662604)., [Hurkat, P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hurkat%20P%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23662604). and [Jain, S. K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jain%20SK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23662604). (2013). Peptide and protein delivery using new drug delivery systems.[*Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23662604)*, 30*(4), 293-329.

[14] Jørgensen, C. M., Vrang, A. and Madsen, S. M. (2014). Recombinant protein expression in *Lactococcus* *lactis* using the P170 expression system. *FEMS Microbiol Lett., 351*(2)*,* 170-178.

[15] Llull, D. and Poquet, I. (2004). New expression system tightly controlled by zinc availability in *Lactococcus* *lactis*. *Appl Environ Microbiol., 70*(9), 5398-5406.

[16] [Llull, D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Llull%20D%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21317326)., [Son, O](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Son%20O%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21317326)., [Blanié, S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Blani%C3%A9%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21317326)., [Briffotaux, J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Briffotaux%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21317326)., [Morello, E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Morello%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21317326)., [Rogniaux, H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rogniaux%20H%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21317326)., [Danot, O](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Danot%20O%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21317326). and [Poquet, I](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Poquet%20I%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21317326). (2011). *Lactococcus* *lactis* ZitR is a zinc-responsive repressor active in the presence of low, nontoxic zinc concentrations in vivo. *J Bacteriol., 193*(8), 1919-1929.

[17] Madsen, S. M., Arnau, J., Vrang, A., Givskov, M. and Israelsen, H. (1999). Molecular characterization of the pH-inducible and growth phase-dependent promoter P170 of *Lactococcus* *lactis*. *Mol Microbiol., 32*(1), 75-87.

[18] Madsen, S. M., Hindré, T., Le Pennec, J. P., Israelsen, H. and Dufour, A. (2005). Two acid-inducible promoters from *Lactococcus* *lactis* require the cis-acting ACiD-box and the transcription regulator RcfB. *Mol Microbiol., 56*(3), 735-746.

[19] Madsen, S. M. and MacDonald, S. A. (2006). Bacterial Systems Breed New Expectation. *Ebr*, 122-126. PDF: <http://www.bioneer.dk/files/Files/EBR_P170.pdf>.

[20] Meer, I., Knol, J., and Janssens, B. (2012). Samenvatting Pilotstudie Hoogwaardige functionele eiwitten uit reststromen. PDF: http://www.zeeland.nl/digitaalarchief/zee1200190‎.

[21] Mierau, I. and Kleerebezem, M. (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus* *lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol., 68*(6), 705-717.

[22] Morello, E., Bermúdez-Humarán, L. G., Llull, D., Solé, V., Miraglio, N., Langella, P. and Poquet, I. (2008). *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol., 14*(1-3), 48-58.

[23] Nefarme (2013). Biologische geneesmiddelen en biosimilars. *Biosimilars*, 1-28. PDF: <http://www.nefarma.nl/stream/com-biologische-geneesmiddelen-en-biosimilars>.

[24] Nevalainen, H. and Peterson, R. (2014). Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? *Front Microbiol., 5*(75), doi: [10.3389/fmicb.2014.00075](http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00075).

[25] Ng, D. T. W. and Sarkar, C. A. (2013). Engineering Signal Peptides for Enhanced Protein Secretion from *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol., 79*(1), 347-356.

[26] Noreen, N., Wei Yeng, H., Baradaran, A., Rosfarizan, M., Sieo, C. C., Rosli, M. I., Yusoff, K. and Raha A. R. (2011). *Lactococcus* *lactis M4*, a potential host for the expression of heterologous proteins. *Microb Cell Fact., 10*(28), doi:  [10.1186/1475-2859-10-28](http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-10-28).

[27] Norton, P. M., Wells, J. M., Brown, H.W., Macpherson, A. M. and Le Page, R. W. (1997). Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine., 15*(6-7), 616-619.

[28] Picanco-Castro, V., Biaggio, R. T., Cova, D. T. and Swiech, K. (2013). Production of recombinant therapeutic proteins in human cells: current achievements and future perspectives. *Protein Pept Lett., 20*(12), 1373-1381.

[29] Robinson, K.., Chamberlain, L. M., Schofield, K. M., Wells, J. M. and Le Page, R. W. (1997). Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol.,* *15*(7), 653-657.

[30] Steidler, L. and Rottiers, P. (2006). Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. *Ann N Y Acad Sci.,* 1072, 176-186.

[31] Visweswaran, G. R., Leenhouts, K., van Roosmalen, M., Kok, J. and Buist, G. (2014). Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.*

[32] Wells, J.M., Wilson, P.W., Norton, P. M., Gasson, M.J. and Le Page, R. W. (1993). *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol Microbiol.,8*(6), 1155-1162.

[33] Wu, S. and Wong, S. (2002). Engineering of a *Bacillus subtilus* Strain with Adjustable Levels of Intracellular Biotin for Secretory Production of Functional Streptavidin. *Appl Environ Microbiol., 68*(3), 1102-1108.

[34] Zhou, X. X., Li, W. F., Ma, G. X. and Pan, Y. J. (2006). The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements. *Biotechnol Adv., 24*(3), 285-295.