



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“การพัฒนาระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย:
การสร้างออร์กาโนฟอสฟอรัสไฮโดรเลสบนผิวเซลล์ *Synechococcus*
PCC7942 เพื่อย่อยสลายยาฆ่าแมลงออร์กาโนฟอสเฟต”

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา จึ้งจตุพรชัย และคณะ

สิงหาคม 2549

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์



โครงการ

“การพัฒนาระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย:
การสร้างออร์กาโนฟอสฟอรัสไฮโดรเลสบนผิวเซลล์ *Synechococcus*
PCC7942 เพื่อย่อยสลายยาฆ่าแมลงออร์กาโนฟอสเฟต”

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา จีงจตุพรชัย
นางสาวศิริรัตน์ ฟาอรุณสวัสดิ์
นางสาวแพมลา อุทะนุต

สังกัด

สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์
สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์
สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในระหว่าง กันยายน 2546- สิงหาคม 2549 ทุนดังกล่าวมีส่วนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาปริญญาโท สาขาอนุพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์ ได้แก่ นางสาวแพมมาลา อุทะนุต และนางสาวชุตีรัตน์ อัครเทพ และการทำวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาปริญญาเอก สาขาอนุพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์ นายชนะกาญจน์ มั่นชูพาณิชย์ นับว่าได้มีส่วนช่วยเสริมสร้างความเข้มแข็งแก่งานวิจัยอย่างยิ่ง คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สกว. มา ณ. โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิฑูรย์ ถิระโสภณ ที่เอื้อเฟื้อในการเตรียม antisera ในหนู และ ศูนย์สังเคราะห์ภาพระดับนาโน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้บริการการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดด้วยเลเซอร์ (CLSM) และชนิดส่องผ่าน (TEM)

บทคัดย่อ

มีการนำโปรตีนที่แสดงออกบนผิวเซลล์ของจุลชีพมาประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น screening-displayed peptide libraries, whole-cell biocatalysts และ biosensor อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย มีการแสดงให้เห็นว่า (i) activated cyanobacteria-reactor เป็นวิธีที่ประหยัดในการบำบัดน้ำเสียจากครัวเรือนหรืออุตสาหกรรม (ii) organophosphorus hydrolase (OPH) สามารถย่อยสลายพิษกลุ่ม Organophosphate (OP) ซึ่งมีพิษสูงและใช้เป็นยาฆ่าแมลง (pesticide) ทางเกษตรกรรมและในครัวเรือนอย่างแพร่หลาย ดังนั้นรีคอมบิแนนท์ไซยาโนแบคทีเรียที่สร้าง OPH จึงอาจเป็นวิธีใหม่สำหรับย่อยสลายยาฆ่าแมลง เพื่อพัฒนาระบบแสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีนบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ใช้ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC7942 เป็น model system ในการสร้าง OPH จาก *Flavobacterium* sp. และ green fluorescent protein (GFP) จาก *Aequorea victoria* บนผิวเซลล์โดยใช้ *Lpp'-OmpA* system ของ *E. coli* หรือ ice nucleation protein ของ *Pseudomonas syringae* เป็น anchoring motif ได้เปรียบเทียบ OPH activity ของ *Synechococcus* ที่มี *opd* ซึ่งสร้าง OPH ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ λP_R และ tRNA promoter (P_{IRNA}) พบว่า P_{IRNA} ทำงานเข้มข้นกว่า λP_R ดังนั้นจึงสร้าง shuttle plasmid ที่มี *Lpp'-OmpA* ซึ่ง fused in frame กับยีน *opd* ภายใต้การควบคุมของ P_{IRNA} แล้ว transformed เข้าสู่ *Synechococcus* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการสร้าง *opd* mRNA แต่ไม่พบ OPH activity ดังนั้น gene cassette P_{IRNA} -(*Lpp'-OmpA*)-*opd* ไม่สามารถสร้างโปรตีน OPH เพื่อศึกษาการใช้ ice nucleation protein เป็น anchoring motif จึงสร้าง shuttle plasmid ที่มี gene cassettes สำหรับสร้างโปรตีนภายในเซลล์ (P_{IRNA} -*opd* และ P_{IRNA} -*gfp*) และภายนอกเซลล์ (P_{IRNA} -*inaK-opd* และ P_{IRNA} -*inaK-gfp*) แล้ว transformed เข้าสู่ *Synechococcus* เมื่อตรวจสอบ OPH activity ของเซลล์ที่เลี้ยงในวันต่างๆพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงสองวันให้ค่า OPH activity สูงสุด การสร้างโปรตีน OPH ภายในเซลล์หรือบนผิวเซลล์ไม่มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต ตรวจสอบ kinetic parameters ของ OPH พบว่าเซลล์สด (fresh whole cells) ที่มี P_{IRNA} -*opd* และ P_{IRNA} -*inaK-opd* มีค่า V_{max} เป็น 141.67(\pm 29.58) และ 2.78(\pm 0.37) Unit/L/OD₇₃₀ ส่วนเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง (frozen/thawed whole cells) มีค่า V_{max} เป็น 477.50(\pm 51.86) และ 11.04(\pm 0.68) Unit/L/OD₇₃₀ ตามลำดับ เนื่องจากไม่พบ OPH activity ใน cell lysate ของเซลล์ที่มี P_{IRNA} -*inaK-opd* จึงบ่งชี้ว่ามีการสร้างโปรตีน OPH บนผิวเซลล์เท่านั้น ได้เตรียม anti OPH polyclonal antibody ในหนู โดยใช้ antigen คือ GST-OPH fusion protein ที่สกัดบริสุทธิ์จาก *E. coli* ที่มี *GST-opd* fusion gene ได้ใช้ antibody ดังกล่าวทำปฏิกิริยากับ OPH ที่สร้างบนผิวเซลล์ แล้วตรวจสอบโดยใช้ diaminobenzidine และส่องดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดด้วยเลเซอร์ (CLSM) ผลการทดลองบ่งชี้ว่ามี OPH อยู่บนผิวเซลล์ที่มี P_{IRNA} -*inaK-opd* นอกจากนี้การทดลอง proteinase accessibility assay ก็ยืนยันว่ามี OPH อยู่บนผิวเซลล์ เนื่องจากสามารถตรวจพบ OPH activity ในเซลล์ที่มี P_{IRNA} -*opd* ซึ่งสร้างโปรตีน OPH ภายในเซลล์ แสดงให้เห็นว่า

substrate (paraoxon) สามารถผ่านผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย ผลการใช้ CLSM แสดงให้เห็นว่า โปรตีน GFP เกือบทั้งหมดอยู่ใน periplasm ของ *Synechococcus* ที่มี $P_{irna}-inaK-gfp$ และพบ GFP immune complexes เพียงเล็กน้อยบนผิวเซลล์ มองเห็นไม่ชัดเจนนัก สาเหตุอาจเนื่องจาก GFP ไม่เหมือน OPH ที่ไม่ใช่โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ membrane

Abstract

Microbial cell surface display has a wide range of biotechnological applications, for examples: screening-displayed peptide libraries, whole-cell biocatalysts and biosensor. So far, there is no report concerning surface display system in cyanobacteria. It has been shown that: (i), the activated cyanobacteria-reactor is an economical method for treating both domestic and industrial wastewater; (ii), organophosphorus hydrolase (OPH) can effectively detoxify organophosphorus compounds which are highly toxic and used extensively as agricultural and domestic pesticides. Therefore, recombinant cyanobacteria expressed OPH could be used as a novel method for biodegradation of pesticides. In this study, in order to develop a system to display recombinant proteins in cyanobacteria, *Synechococcus* PCC7942 was used as a model system to surface display the OPH of *Flavobacterium* sp. and the green fluorescent protein (GFP) of *Aequorea victoria* by using the Lpp'-OmpA system of *E. coli* or ice nucleation protein of *Pseudomonas syringae* as anchoring motif. Comparison of OPH activities of *Synechococcus* harboring the *opd* gene encoding OPH under the control of λP_R promoter and tRNA promoter (P_{IRNA}) indicated that P_{IRNA} is stronger than λP_R . Therefore, the shuttle plasmid containing Lpp'-OmpA gene fused in frame with the *opd* gene under the control of P_{IRNA} was constructed and transformed into *Synechococcus*. Results revealed that the *opd* mRNA was transcribed, however, no OPH activity was detected. Thus, the gene cassette P_{IRNA} - (Lpp'-OmpA)-*opd* was not able to expressed functional OPH protein. To study the ice nucleation protein as anchoring motif, the shuttle plasmids containing gene cassettes for intracellular (P_{IRNA} -*opd* and P_{IRNA} -*gfp*) and surface-expressed (P_{IRNA} -*inaK-opd* and P_{IRNA} -*inaK-gfp*) proteins were constructed and transformed into *Synechococcus*. Determination of OPH activity of cultures at various intervals revealed that the two-days cultures of recombinant *Synechococcus* expressed highest OPH activity. Expression of OPH protein either intracellular or on cell surface had no effect on cell growth. Investigation of kinetic parameters of OPH showed that the V_{max} of fresh whole cells harboring P_{IRNA} -*opd* and P_{IRNA} -*inaK-opd* were 141.67(\pm 29.58) and 2.78(\pm 0.37) Unit/L/OD₇₃₀; frozen/thawed whole cells, 477.50(\pm 51.86) and 11.04(\pm 0.68) Unit/L/OD₇₃₀, respectively. No OPH activity was detected in cell lysate of cell harboring P_{IRNA} -*inaK-opd*, therefore, the OPH was only expressed on cell surface. The mouse anti OPH polyclonal antibody, obtained by using the GST-OPH fusion protein purified from *E. coli* harboring GST-*opd* fusion gene as antigen, was used to react with surfaced expressed OPH; reactivity of immune complexes was visualized using diaminobenzidine under confocal laser scanning microscopy (CLSM). Results showed that OPH was surface expressed on *Synechococcus* harboring P_{IRNA} -*inaK-opd*. In

addition, proteinase accessibility assay also confirmed the presence of surface expressed OPH. The OPH activity was detected in cells (P_{IRNA} -*opd*) with intracellular OPH protein, indicating that the substrate (paraoxon) was able to transport across the cyanobacterial cell wall. CLSM revealed GFP to be almost exclusively located in the periplasm of *Synechococcus* harboring P_{IRNA} -*inaK-gfp*, the reactivity of GFP immune complexes was barely detectable on *Synechococcus* cell surface. This might be due to the fact that GFP, unlike OPH, is not membrane associated protein.

Executive Summary

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย): การพัฒนาระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย: การสร้างออร์กาโนฟอสฟอรัสไฮโดรเลสบนผิวเซลล์ *Synechococcus* PCC7942 เพื่อย่อยสลายยาฆ่าแมลงออร์กาโนฟอสเฟต

(ภาษาอังกฤษ): Development of Cyanobacterial Surface-Display System: Surface-Expressed Organophosphorus Hydrolase by *Synechococcus* PCC7942 for Degradation of Organophosphorus Pesticides.

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ: รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา จิงจุฑพรชัย

สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา อ.พุทธมณฑล

จ. นครปฐม 73170 โทรศัพท์: 02 800 3624-8 ต่อ 1235 โทรสาร: 02 441 9906

E-mail: stwcj@mahidol.ac.th

3. ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี (กันยายน 2546- สิงหาคม 2549)

4. ปัญหาที่ทำการวิจัย

ระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์จุลชีพ (Microbial cell-surface display system) คือการทำให้โปรตีนเป้าหมายไปแสดงออกบนผิวเซลล์ โดยนำโปรตีนเป้าหมายไป fused กับ anchoring motifs ต่างๆซึ่งมักเป็นโปรตีนที่แสดงออกบนผิวเซลล์ (cell surface protein) มีการนำโปรตีนที่แสดงออกบนผิวเซลล์ของจุลชีพมาประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) เป็นจุลชีพ prokaryote ที่สามารถสังเคราะห์แสงเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูก การใช้ไซยาโนแบคทีเรีย (activated cyanobacteria reactor) บำบัดน้ำเสียจากครัวเรือนหรืออุตสาหกรรมเป็นวิธีที่ประหยัด การสร้าง heterologous proteins ต่างๆของไซยาโนแบคทีเรียเป็นการสร้างภายในเซลล์ ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย เพื่อพัฒนาระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย โครงการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC7942 โปรตีนเป้าหมายที่จะใช้ในโครงการวิจัยนี้คือ Organophosphorus hydrolase ซึ่งย่อยสลายยาฆ่าแมลงกลุ่ม Organophosphate

สารเคมีกลุ่ม Organophosphate (OP) เป็นสารมีพิษ (toxic) มากที่สุดกลุ่มหนึ่ง OP ถูกนำมาใช้เป็นยาฆ่าแมลง (pesticide) ทางเกษตรกรรมอย่างแพร่หลาย ผู้ได้รับสาร OP จะมีอาการป่วยต่างๆและมักเสียชีวิต ดังนั้นการปนเปื้อนของ OP ในสิ่งแวดล้อม เช่น ผลผลิตทางเกษตรและแหล่งน้ำ จึงเป็นเรื่องน่าเป็นห่วงและมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาวิธีที่สะดวก ปลอดภัย และมีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจในการสลายพิษยาฆ่าแมลง OP, มีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ Organophosphorus hydrolase (OPH) จาก *Flavobacterium* sp. strain ATCC27551 เพื่อใช้ย่อยสลายพิษ OP อย่างไรก็ดี

ดีแบคทีเรียดังกล่าวเจริญเติบโตช้า การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียให้เพียงพอแก่การใช้งานจึงเป็นไปได้ยาก จึงได้มีการสร้าง OPH โดยใช้ *E. coli* เป็นเจ้าบ้าน แม้จะสามารถเพิ่มจำนวน *E. coli* ได้โดยง่าย แต่การปนเปื้อน *E. coli* อาจก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพในบางคน หากแก้ปัญหาโดยการสกัด OPH บริสุทธิ์จาก *E. coli* มาใช้ก็อาจไม่คุ้มทุนทางเศรษฐกิจ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงเสนอวิธีใหม่และทางเลือกใหม่ ในการย่อยสลายยาฆ่าแมลง Organophosphate ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ โดยใช้การสร้าง OPH บนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

5. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

และสร้างเอ็นไซม์

Organophosphorus hydrolase บนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย เพื่อย่อยสลายยาฆ่าแมลงกลุ่ม Organophosphate

1. ศึกษาการแสดงออกของยีน *opd* และ *gfp* ที่ผิวเซลล์ *Synechococcus* PCC7942 โดยใช้ Ice Nucleation Protein System และภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ λP_R หรือ P_{IRNA}
2. ศึกษาการแสดงออกของยีน *opd* และ *gfp* ที่ผิวเซลล์ *Synechococcus* PCC7942 โดยใช้ Lpp'-OmpA System และภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ λP_R หรือ P_{IRNA}

6. ผลการวิจัยและวิจารณ์

ได้เปรียบเทียบ OPH activity ของ *Synechococcus* ที่มียีน *opd* ซึ่งสร้าง OPH ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ λP_R และ tRNA promoter (P_{IRNA}) พบว่า P_{IRNA} ทำงานเข้มข้นกว่า λP_R ดังนั้นจึงสร้าง shuttle plasmid ที่มียีน Lpp'-OmpA ซึ่ง fused in frame กับยีน *opd* ภายใต้การควบคุมของ P_{IRNA} แล้ว transformed เข้าสู่ *Synechococcus* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการสร้าง *opd* mRNA แต่ไม่พบ OPH activity ดังนั้น gene cassette P_{IRNA} - (Lpp'-OmpA)-*opd* ไม่สามารถสร้างโปรตีน OPH เพื่อศึกษาการใช้ ice nucleation protein เป็น anchoring motif จึงสร้าง shuttle plasmid ที่มี gene cassettes สำหรับสร้างโปรตีนภายในเซลล์ (P_{IRNA} -*opd* และ P_{IRNA} -*gfp*) และภายนอกเซลล์ (P_{IRNA} -*inaK*-*opd* และ P_{IRNA} -*inaK*-*gfp*) แล้ว transformed เข้าสู่ *Synechococcus* เมื่อตรวจสอบ OPH activity ของเซลล์ที่เลี้ยงในวันต่างๆพบว่า เซลล์ที่เลี้ยงสองวันให้ค่า OPH activity สูงสุด การสร้างโปรตีน OPH ภายในเซลล์หรือบนผิวเซลล์ไม่มีผลกระทบต่อการใช้เจริญเติบโต ตรวจสอบ kinetic parameters ของ OPH พบว่าเซลล์สด (fresh whole cells) ที่มี P_{IRNA} -*opd* และ P_{IRNA} -*inaK*-*opd* มีค่า V_{max} เป็น $141.67(\pm 29.58)$ และ $2.78(\pm 0.37)$ Unit/L/OD₇₃₀ ส่วนเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง (frozen/thawed whole cells) มีค่า V_{max} เป็น $477.50(\pm 51.86)$ และ $11.04(\pm 0.68)$ Unit/L/OD₇₃₀ ตามลำดับ เนื่องจากไม่พบ OPH activity ใน cell lysate ของเซลล์ที่มี P_{IRNA} -*inaK*-*opd* จึงบ่งชี้ว่ามีการสร้างโปรตีน OPH บนผิวเซลล์เท่านั้น ได้เตรียม anti OPH polyclonal antibody ในหนู โดยใช้ antigen คือ GST-OPH fusion protein ที่สกัดบริสุทธิ์จาก *E. coli* ที่มี GST-*opd* fusion gene ได้ใช้ antibody ดังกล่าวทำปฏิกิริยากับ OPH ที่สร้างบนผิวเซลล์ แล้วตรวจสอบโดยใช้

diaminobenzidine และส่องดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดด้วยเลเซอร์ (CLSM) ผลการทดลองบ่งชี้ว่ามี OPH อยู่บนผิวเซลล์ที่มี $P_{IRNA-inaK-opd}$ นอกจากนี้การทดลอง proteinase accessibility assay ก็ยืนยันว่ามี OPH อยู่บนผิวเซลล์ เนื่องจากสามารถตรวจพบ OPH activity ในเซลล์ที่มี $P_{IRNA-opd}$ ซึ่งสร้างโปรตีน OPH ภายในเซลล์ แสดงให้เห็นว่า substrate (paraoxon) สามารถผ่านผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย ผลการใช้ CLSM แสดงให้เห็นว่าโปรตีน GFP เกือบทั้งหมดอยู่ใน periplasm ของ *Synechococcus* ที่มี $P_{IRNA-inaK-gfp}$ และพบ GFP immune complexes เพียงเล็กน้อยบนผิวเซลล์ มองเห็นไม่ชัดเจนนัก สาเหตุอาจเนื่องจาก GFP ไม่เหมือน OPH ที่ไม่ใช่โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ membrane

7. Output ที่ได้จากโครงการ

7.1. เสนอผลงานวิชาการ

- 1). **Wipa Chungjatupornchai** and Sirirat Fa-aroonsawat. Cyanobacterial surface display of recombinant proteins using ice nucleation protein as an anchoring motif. Abstract In: The 6th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria. September 25-28, 2005, Gdansk, Poland.
- 2). **Wipa Chungjatupornchai** and Sirirat Fa-aroonsawat. Display of recombinant proteins on the cyanobacterial cell surface using ice nucleation protein as an anchoring motif. Abstract In: The 12th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes. August 27- September 1, 2006. Pau, France.

7.2. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

- 1). Fa-aroonsawat, S. and **Chungjatupornchai, W.** (2006) Biodegradation of organophosphorus insecticides by a genetically engineered cyanobacterium with surface-expressed organophosphorus hydrolase. (To be submitted)
- 2). Fa-aroonsawat, S. and **Chungjatupornchai, W.** (2006) Targeting expression of green fluorescent protein using ice nucleation protein in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. (In preparation)

3). (เป็นผลงานวิจัยที่ทุนวิจัยโครงการนี้มีส่วนสนับสนุน)

Monshupanee, T., Fa-aroonawat, S. and **Chungjatupornchai, W.** (2006) A cyanobacterial strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: a single nucleotide mutation of 23S rRNA confers temperature-sensitive phenotype. *Microbiology* 152: 1417–1425.

4). (เป็นผลงานวิจัยเพิ่มเติมที่ได้รับการสนับสนุนจากทุนสกว.คราวก่อน)

Plansangkate, P., Fa-aroonawat, S., Panyim, S., **Chungjatupornchai, W.** (2004) The light-responsive promoter of cyanobacterial *ORF76* gene overlaps with the *htpG* terminator. *FEMS Microbiology Letters* 235: 341–347.

เนื้อหางานวิจัย

1. บทนำ

ระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์จุลชีพ (Microbial cell-surface display system) คือการทำให้โปรตีนเป้าหมายไปแสดงออกบนผิวเซลล์ โดยนำโปรตีนเป้าหมายไป fused กับ anchoring motifs ต่างๆซึ่งมักเป็นโปรตีนที่แสดงออกบนผิวเซลล์ (cell surface protein) มีการนำโปรตีนที่แสดงออกบนผิวเซลล์ของจุลชีพมาประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น แสดง viral antigen เพื่อใช้เป็นวัคซีน (Lee *et al.*, 2000), screening-displayed peptide libraries (Boder and Wittrup, 1997), immobilizing enzymes เพื่อใช้เป็น whole-cell biocatalysts (Richins *et al.*, 1997), anchoring enzymes เพื่อใช้เป็น biosensor (Shibasaki *et al.*, 2001) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (blue green algae) เป็นจุลชีพ prokaryote ที่สามารถสังเคราะห์แสง เจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูก เป็นที่ยอมรับกันว่า การใช้ไซยาโนแบคทีเรีย (activated cyanobacteria reactor) บำบัดน้ำเสียจากครัวเรือนหรืออุตสาหกรรมเป็นวิธีที่ประหยัด นอกจากนี้ มีความสนใจเป็นอันมากที่จะใช้ไซยาโนแบคทีเรียเป็นเจ้าบ้าน เพื่อผลิตโปรตีนต่างๆที่มีประโยชน์ทางเศรษฐกิจ (Tandeau de Marsac *et al.*, 1987; Chungjatupornchai, 1990; Kawata *et al.*, 1991; Fukuda *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตาม การสร้าง heterologous proteins ต่างๆของไซยาโนแบคทีเรียเป็นการสร้างภายในเซลล์ ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย เพื่อพัฒนาระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย โครงการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC7942 เพราะเราได้พัฒนาระบบ host-vector system และได้ค้นพบโปรโมเตอร์แข่งขัน P_{trnA} (Chungjatupornchai *et al.*, 1999; Chungjatupornchai *et al.*, 2002) ซึ่งน่าจะเหมาะสมสำหรับควบคุมการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย โปรตีนเป้าหมายที่จะใช้ในโครงการวิจัยนี้คือ

Organophosphorus hydrolase ซึ่งย่อยสลายยาฆ่าแมลงกลุ่ม Organophosphate

สารเคมีกลุ่ม Organophosphate (OP) เป็นสารมีพิษ (toxic) มากที่สุดกลุ่มหนึ่ง OP ถูกนำมาใช้เป็นยาฆ่าแมลง (pesticide) ทางเกษตรกรรมอย่างแพร่หลาย เช่น Methylparathion, Parathion, Malathion, Paraoxon, Coumaphos และ Diazinon นอกจากนี้ OP ยังถูกนำมาใช้เป็น chemical nerve agents ทางทหาร เช่น Sarin และ Soman (Compton, 1988), OP เป็น Acetylcholinesterase inhibitor ผู้ได้รับสาร OP จึงมีอาการป่วยต่างๆและมักเสียชีวิต (Donarski *et al.*, 1989) ดังนั้นการปนเปื้อนของ OP ในสิ่งแวดล้อม เช่น ผลผลิตทางเกษตรและแหล่งน้ำ จึงเป็นเรื่องน่าเป็นห่วงและมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาวิธีที่สะดวก ปลอดภัย และมีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจในการสลายพิษยาฆ่าแมลง OP, มีรายงานการใช้แบคทีเรียซึ่งสามารถสลายพิษ OP เช่น *Flavobacterium* sp. strain ATCC27551 มีการศึกษาเป็นอันมากเกี่ยวกับเอ็นไซม์ Organophosphorus hydrolase (OPH) ซึ่งเป็น membrane-associated protein จาก

Flavobacterium sp. strain ATCC27551 (Mulbry and Karns, 1989) เพื่อใช้ย่อยสลายพิษ OP อย่างไรก็ดีแบคทีเรียดังกล่าวเจริญเติบโตช้า การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียให้เพียงพอแก่การใช้งานจึงเป็นไปได้ยาก เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการสร้าง OPH โดยใช้ *E. coli* เป็นเจ้าบ้าน (Mulchandani *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002) แม้จะสามารถเพิ่มจำนวน *E. coli* ได้โดยง่ายและโดยทั่วไปไม่ใช่เชื้อก่อโรค แต่การปนเปื้อน *E. coli* อาจก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพในบางคน หากแก้ปัญหาโดยการสกัด OPH บริสุทธิ์จาก *E. coli* มาใช้ก็อาจไม่คุ้มทุนทางเศรษฐกิจ

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ จึงเสนอวิธีใหม่และทางเลือกใหม่ ในการย่อยสลายยาฆ่าแมลง Organophosphate ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ โดยใช้การสร้าง OPH บนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งเจริญเติบโตได้ง่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาถูก และสามารถพัฒนาเป็น Bioreactor ได้

2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาระบบแสดงโปรตีนบนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย และสร้างเอ็นไซม์

Organophosphorus hydrolase บนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย เพื่อย่อยสลายยาฆ่าแมลงกลุ่ม Organophosphate

1. ศึกษาการแสดงออกของยีน *opd* และ *gfp* ที่ผิวเซลล์ *Synechococcus* PCC7942 โดยใช้ Ice Nucleation Protein System และภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ λP_R หรือ P_{IRNA}
2. ศึกษาการแสดงออกของยีน *opd* และ *gfp* ที่ผิวเซลล์ *Synechococcus* PCC7942 โดยใช้ Lpp'-OmpA System และภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ λP_R หรือ P_{IRNA}

หมายเหตุ: ยีน *opd* (Mulbry *et al.*, 1986) สร้างโปรตีน Organophosphate hydrolase (OPH), ยีน *gfp* (Matthysse *et al.*, 1996) สร้าง Green fluorescent protein (GFP), Ice Nucleation Protein (Inp) System จาก *Pseudomonas syringae* (Jung *et al.*, 1998), Lpp'-OmpA System จาก *E. coli* (Francisco *et al.*, 1992), โปรโมเตอร์ λP_R จาก λ bacteriophage (Tsurimoto *et al.*, 1982) และ โปรโมเตอร์ P_{IRNA} จากยีน $irna^{pro}$ ของ *Synechococcus* PCC7942 (Chungjatupornchai *et al.*, 2002)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

- 1). ศึกษาและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *opd* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ λP_R และ P_{IRNA} ในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

- 1.1). โคลนยีน *opd* ที่สร้าง Organophosphate Hydrolase (OPH) เอ็นไซม์จาก *Flavobacterium* sp. strain ATCC27551

ได้ใช้ specific primers (โดยใช้ข้อมูลจาก GenBank sequence M29593) และ genomic DNA ของ *Flavobacterium* sp. strain ATCC27551 เป็น template ในการทำ PCR ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 kb ของยีน *opd* แล้วโคลนเข้าพลาสมิด pUC18-GUS ได้พลาสมิด

pUC18-OPH ซึ่งมี promoterless- *opd* และ Nos-ter (รูปที่ 1) พร้อมทั้งได้ตรวจสอบลำดับเบสของยีน *opd* ที่โคลนได้ พบว่ามีลำดับเบสถูกต้อง (ไม่ได้แสดงผล)

1.2). สร้างพลาสมิดที่มียีน *opd* อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ λP_R (λP_R -*opd*)

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วย BamHI/EcoRI จากพลาสมิด pUC18-OPH ซึ่งมี promoterless- *opd* และ Nos-ter (รูปที่ 1) มาโคลนเข้าสู่พลาสมิด pKG ผลที่ได้คือพลาสมิด shuttle vector pKOPH ที่มี promoterless- *opd* และ Nos-ter (รูปที่ 2) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่มีโปรโมเตอร์ λP_R โคลนเข้า BamHI site ของพลาสมิด pKOPH และได้พลาสมิด pKOPH- P_R ซึ่งมี λP_R -*opd* และ NosTer (รูปที่ 3) โดยมีกรดอะมิโนจำนวน 12 ตัวของ λP_R structural gene ซึ่ง fused in frame กับ 5' end ของยีน *opd* (รูปที่ 4)

1.3). ปรับปรุงการแสดงออกของ λP_R -*opd*

เนื่องจาก λP_R -*opd* ในพลาสมิด pKOPH- P_R เกิด secondary structure ด้าน 5' end ของ *opd* transcript (รูปที่ 5) ดังนั้นจึงแก้ไขโดยใช้วิธี overlap extension PCR ซึ่งไม่ต้องใช้การโคลนด้วย restriction sites (รูปที่ 6) แล้วสร้างพลาสมิด pK-POP (รูปที่ 7 และ 8) ซึ่งสามารถลด secondary structure ด้าน 5' end ของ *opd* transcript ได้ (รูปที่ 9)

1.4). สร้างพลาสมิดที่มียีน *opd* อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ P_{IRNA} (P_{IRNA} -*opd*)

สร้างชิ้นดีเอ็นเอที่มี gene cassette P_{IRNA} -*opd* โดยใช้วิธี overlap extension PCR (รูปที่ 10) แล้วโคลนเข้าพลาสมิด pUC18-GUS ผลที่ได้คือพลาสมิด pUC-TOPH (รูปที่ 11) แล้วโคลนเข้าพลาสมิด shuttle vector pKGT ผลที่ได้คือพลาสมิด pKT-OPH (รูปที่ 12) แล้ว transform เข้าสู่ cyanobacteria

1.5). ศึกษาและเปรียบเทียบ OPH activity ในเซลล์ *E.coli* และ *Synechococcus*

ได้ตรวจหา OPH activity โดยวิธี Spectrophotometry ที่ 400 nm ติดตามสาร p-nitrophenol ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายสาร paraoxon (Kang et al., 2002) (รูปที่ 13) ผลการทดลองค่า OPH activity ใน *E. coli* ได้แสดงในตารางที่ 1 ส่วนผลการทดลองค่า OPH activity ใน *Synechococcus* ได้แสดงในตารางที่ 2 ผลการทดลองพบว่าใน *E.coli* ทั้งสองพลาสมิด pKOPH- P_R และ pK-POP ให้ค่า OPH activity ไม่แตกต่างกันนัก แต่ในไซยาโนแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pK-POP ให้ค่า OPH activity สูงกว่า และไซยาโนแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pKT-OPH ให้ค่า OPH activity สูงกว่า pK-POP ในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย นั่นคือโปรโมเตอร์ P_{IRNA} ทำงานได้ดีกว่าโปรโมเตอร์ λP_R ดังนั้นการทดลองต่อจากนี้จึงใช้ P_{IRNA} ในการควบคุมการแสดงออกของยีน

2). การเตรียม antibody ต่อโปรตีน OPH ในหนู

2.1). สร้างพลาสมิดที่มี GST-OPH fusion protein เพื่อใช้ในการ raise antibody

เนื่องจาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pKOPH-P_R มีการแสดงออกของโปรตีน OPH ต่ำไม่เหมาะที่จะใช้เตรียมโปรตีน OPH บริสุทธิ์ จึงได้เปลี่ยนมาใช้ในการโคลนยีน *opd* เข้าพลาสมิด pGEX-5x-1 ผลที่ได้คือพลาสมิด pGEX-OPH (ดูรูปที่ 14) เพื่อเกิด GST-OPH fusion protein และเมื่อได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนพบว่ามียกระดับ GST-OPH fusion protein ในระดับสูงพอสมควร (ดูรูปที่ 15, 16 และ 17)

2.2). การเตรียม antisera ในหนู

ได้ตัด GST-OPH fusion protein ออกจาก acrylamide gel แล้วนำมาใช้ฉีดเข้า หนู จำนวน 3 ตัว เพื่อ raise antibody ต่อ OPH ในการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่า antiserum หนูตัวที่ 3 ให้ผลดีที่สุด (ดูรูปที่ 18) แต่อย่างไรก็ดี หนูตัวที่ 3 ได้เสียชีวิตลงก่อนที่จะเก็บ antiserum ดังนั้นจึงสามารถเก็บ antisera ได้จากหนูตัวที่ 1 และ 2 เท่านั้น

3). ศึกษาการแสดงออกของยีน *opd* ที่ผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้ Lpp'-OmpA System

3.1). สร้างพลาสมิดที่มี gene cassette P_{IRNA} -(Lpp'-OmpA)-*opd*

ได้สร้างพลาสมิด pKT-OMP-OPH ซึ่งมี gene cassette P_{IRNA} -(Lpp'-OmpA)-*opd* ใน shuttle vector pKGT ดังได้แสดงวิธีทำโดยย่อในรูปที่ 19 แล้ว transform เข้าเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

3.2). ศึกษา OPH activity ของเซลล์ *Synechococcus* ที่มีพลาสมิด pKT-OMP-OPH

ผลการทดลองพบว่า OPH activity ของเซลล์ *Synechococcus* ที่มีพลาสมิด pKT-OMP-OPH มีน้อยมาก (0.17 ± 0.02 Unit/L/OD₇₃₀) ได้ทำ DNA sequencing ของ gene cassette P_{IRNA} -(Lpp'-OmpA)-*opd* พบว่ามีลำดับเบสถูกต้อง และเมื่อตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR สามารถตรวจพบ *opd* mRNA (ดูรูปที่ 20) ดังนั้นผลการทดลองจึงบ่งชี้ว่า gene cassette P_{IRNA} -(Lpp'-OmpA)-*opd* ไม่สามารถสร้าง OPH ที่มี activity ได้ ดังนั้น Lpp'-OmpA จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็น anchoring motif ในไซยาโนแบคทีเรีย

4). ศึกษาการแสดงออกของยีน *opd* ที่ผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้ Inp System

4.1). สร้างพลาสมิดที่มี gene cassette P_{IRNA} -*inaK*-*opd*

ได้สร้างพลาสมิด pKT-INP-OPH ที่มี gene cassette P_{IRNA} -*inaK*-*opd* ดังได้แสดงวิธีทำโดยย่อในรูปที่ 21 แล้ว transform เข้าเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

4.2). ศึกษา OPH activity ของเซลล์ *Synechococcus* ที่มียีน *opd*

เพื่อตรวจสอบหาวันที่เซลล์เจริญเติบโตแล้วให้ OPH activity ดีที่สุด จึงได้ทดสอบหา OPH activity ของเซลล์ที่เลี้ยงในจำนวนวันต่างๆ ผลการทดลอง (ดูรูปที่ 22) พบว่า *Synechococcus* ที่มีพลาสมิด pKT-OPH หรือ pKT-INP-OPH ต่างมี OPH activity สูงสุดเมื่อเลี้ยงเซลล์สองวัน

เพื่อตรวจสอบว่าการสร้าง OPH มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์หรือไม่ จึงได้ตรวจสอบ Growth curve ของเซลล์ ผลการทดลอง (ดูรูปที่ 23) พบว่า *Synechococcus* ที่มีพลาสมิด pKGT, pKT-OPH หรือ pKT-INP-OPH มีการเจริญเติบโตไม่ต่างกัน ดังนั้นการสร้าง OPH จึงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

ได้ตรวจสอบ Kinetic parameters ของเอนไซม์ OPH พบว่า (ดูตารางที่ 3) พบว่าเซลล์สด (fresh whole cells) ที่สร้าง OPH ภายในเซลล์ (pKT-OPH) และ และบนผิวเซลล์ (pKT-INP-OPH) มีค่า V_{max} เป็น $141.67(\pm 29.58)$ และ $2.78(\pm 0.37)$ Unit/L/OD_{730} ; ส่วนเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง (frozen/thawed whole cells) มีค่า V_{max} เป็น $477.50(\pm 51.86)$ และ $11.04(\pm 0.68)$ Unit/L/OD_{730} ตามลำดับ ในกรณีค่า K_m เซลล์ที่สร้าง OPH ภายในเซลล์ (pKT-OPH) ทั้งของเซลล์สดและเซลล์ผ่านการแช่แข็ง $[1.03(\pm 0.06)$ และ $1.05(\pm 0.19)$ mM ตามลำดับ] และของเซลล์สดที่สร้าง OPH บนผิวเซลล์ (pKT-INP-OPH) $[0.96(\pm 0.30)$ mM] มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ค่า K_m ของเซลล์ที่สร้าง OPH บนผิวเซลล์และผ่านการแช่แข็งมีค่าต่ำกว่าอย่างชัดเจน $[0.35(\pm 0.09)$ mM] ผลการทดลองบ่งชี้ว่าการแช่แข็งอาจทำให้องค์ประกอบของ cell wall บางส่วนเสียหายทำให้ OPH บนผิวเซลล์สามารถ bind กับ substrate ได้ดีขึ้น

ได้ตรวจสอบสภาวะของเซลล์สด (fresh whole cells) และเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง (-80°C frozen/thawed whole cells) และ Proteinase K ว่ามีผลต่อ OPH activity อย่างไร ผลการทดลองในตารางที่ 4 แสดงว่า ไม่พบ OPH activity ใน cell lysate ที่ได้จากเซลล์ที่มี pKT-INP-OPH นั้นหมายความว่า OPH ทั้งหมดสร้างอยู่บนผิวเซลล์เท่านั้น เนื่องจากยีน *opd* ใน pKT-OPH และ pKT-INP-OPH ต่างอยู่ภายใต้การควบคุมของ P_{IRNA} ดังนั้น INP-OPH มีผลทำให้ทำให้การแสดงออกของ OPH ต่ำลง, การใช้ Proteinase K สามารถย่อยโปรตีนบางส่วนบน cell wall จึงทำให้ substrate สามารถผ่านเข้าออกเซลล์สดที่มี pKT-OPH ทำให้มี OPH activity สูงขึ้น และทำให้ OPH ที่อยู่บนผิวเซลล์ที่มี pKT-INP-OPH สามารถ พบกับ substrate ได้ดียิ่งขึ้นจึงมีค่า OPH activity สูงขึ้น ในกรณีของ frozen เซลล์ซึ่งมีผลทำให้โปรตีนบางส่วนบน cell wall เสียหาย การใช้ Proteinase จึงมิได้ทำให้ substrate ผ่านเข้าออกเซลล์ที่มี pKT-OPH ได้ดีขึ้น แต่ทำสามารถย่อยโปรตีน OPH บนผิวเซลล์ที่มี pKT-INP-OPH ได้ดียิ่งขึ้น มีผลทำให้ค่า ค่า OPH activity ลดลง

4.3). ตรวจสอบการสร้าง OPH บนผิวเซลล์โดยใช้ confocal laser scanning microscopy (CLSM)

ได้ตรวจสอบการสร้าง OPH บนผิวเซลล์ *Synechococcus* ที่มีพลาสมิด pKT-OPH หรือ pKT-INP-OPH โดยใช้ antiserum ต่อ OPH ที่เตรียมได้จากหนูเป็น 1st Antibody แล้วใช้ IgG conjugated with horseradish peroxidase เป็น 2nd Antibody ตรวจ immune complexes ที่ได้โดยใช้ diaminobenzidine และ amidazole ส่องดูโดยใช้ CLSM ผลการทดลอง (รูปที่ 24) พบว่า สามารถตรวจพบ immune complexes บนเซลล์ที่มีพลาสมิด pKT-INP-OPH แต่ไม่พบบนเซลล์ที่มีพลาสมิด pKT-OPH ดังนั้นผลการทดลองนี้สนับสนุนการตรวจพบการสร้าง OPH บนผิวเซลล์ ที่มีพลาสมิด pKT-INP-OPH

4.4). ตรวจสอบการสร้าง OPH โดยใช้ Immunogold transmission electron microscopy (TEM)

เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์ *Synechococcus* ที่มีพลาสมิด pKT-INP-OPH สร้าง OPH ตรงส่วนใดของเซลล์บ้าง จึงใช้ antiserum ต่อ OPH ที่เตรียมได้จากหนูเป็น 1st Antibody แล้วใช้ protein A- gold และตรวจดูโดยใช้ TEM ผลการทดลอง (รูปที่ 25) พบว่ามี gold particle ติดอยู่ภายในเซลล์และมีเล็กน้อยติดอยู่บริเวณผิวเซลล์ ผลการทดลองไม่ชัดเจนนักอาจต้องตรวจสอบซ้ำ

5). ศึกษาการแสดงออกของยีน *gfp* ที่ผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้ Inp System

5.1). สร้างพลาสมิดที่มี gene cassette P_{IRNA} -*gfp* หรือ P_{IRNA} -*inaK*-*gfp*

ได้สร้างพลาสมิด pKT-GFP ที่มี gene cassette P_{IRNA} -*gfp* (ดูวิธีทำโดยย่อในรูปที่ 26) และพลาสมิด pKT-INP-GFP ที่มี gene cassette P_{IRNA} -*inaK*-*gfp* (ดูวิธีทำโดยย่อในรูปที่ 27) แล้ว transform เข้าเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

5.2). ตรวจสอบการสร้างโปรตีน GFP โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และ

Spectrofluorometer

ได้ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GFP ในเซลล์ *Synechococcus* ที่มีพลาสมิด pKT-GFP หรือ pKT-INP-GFP โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าตรวจสอบยากมาก ผลการทดลองไม่คงที่ (ผลการทดลองมิได้แสดง) อาจเป็นเพราะแสงฟลูออเรสเซนซ์ จากโปรตีน GFP ไม่เสถียร ได้ปรับปรุงวิธีการตรวจสอบโดยจะใช้เครื่อง Spectrofluorometer ซึ่งสามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีน GFP แต่ให้ผลการทดลองก็ยังไม่คงที่ (ผลการทดลองมิได้แสดง)

5.3). ตรวจสอบการสร้าง GFP บนผิวเซลล์โดยใช้ confocal laser scanning microscopy (CLSM)

ผลการตรวจสอบ GFP บนผิวเซลล์โดยใช้ CLSM (รูปที่ 28) พบว่า *Synechococcus* ที่มีพลาสมิด pKT-GFP สร้าง GFP ใน cytoplasm และมีความเข้มมากกว่า เซลล์ที่มี pKT-INP-

GFP ซึ่งไม่พบ GFP ใน cytoplasm แต่พบ GFP เฉพาะขอบเซลล์ ซึ่งน่าจะเป็นบริเวณ periplasmic space แต่ไม่สามารถระบุแน่ชัดว่าอยู่บนผิวเซลล์หรือไม่

5.4). ตรวจสอบการสร้าง GFP บนผิวเซลล์โดยใช้ Immuno-CLSM

เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์ที่มี pKT-INP-GFP สร้าง GFP บนผิวเซลล์หรือไม่ จึงใช้ monoclonal Ab ต่อ GFP เป็น 1st Antibody แล้วใช้ IgG conjugated with horseradish peroxidase เป็น 2nd Antibody ตรวจ immune complexes ที่ได้โดยใช้ diaminobenzidine และ amidazole ส่องดูโดยใช้ CLSM ผลการทดลอง (ดูรูปที่ 29) พบว่ามี immune complexes เพียงเล็กน้อยบนผิวเซลล์ มองเห็นไม่ชัดเจนนัก ดังนั้นน่าจะมี GFP เพียงเล็กน้อยบนผิวเซลล์ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก GFP มิใช่ membrane protein การสร้างบนผิวเซลล์จึงได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร

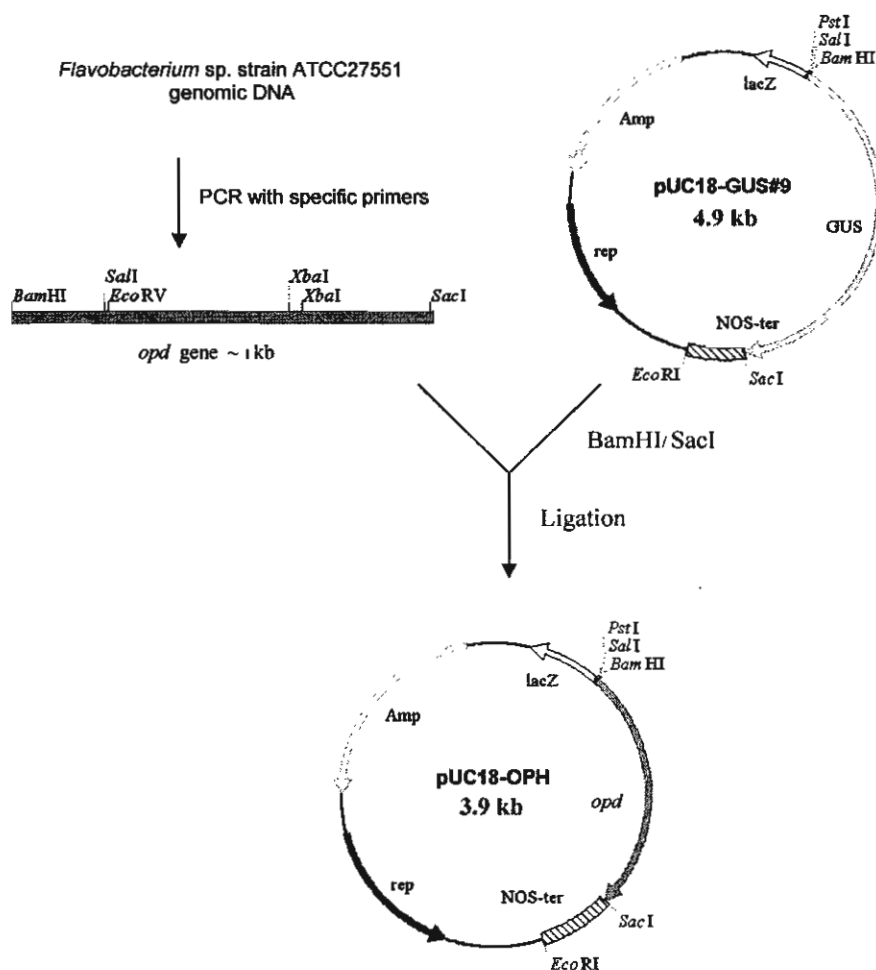


Figure 1. Flowchart of procedure used to construct plasmid pUC18-OPH
 The plasmid pUC18-OPH harbors *opd* gene and Nos-ter in pUC18 vector.
 The figure is not drawn to scale.

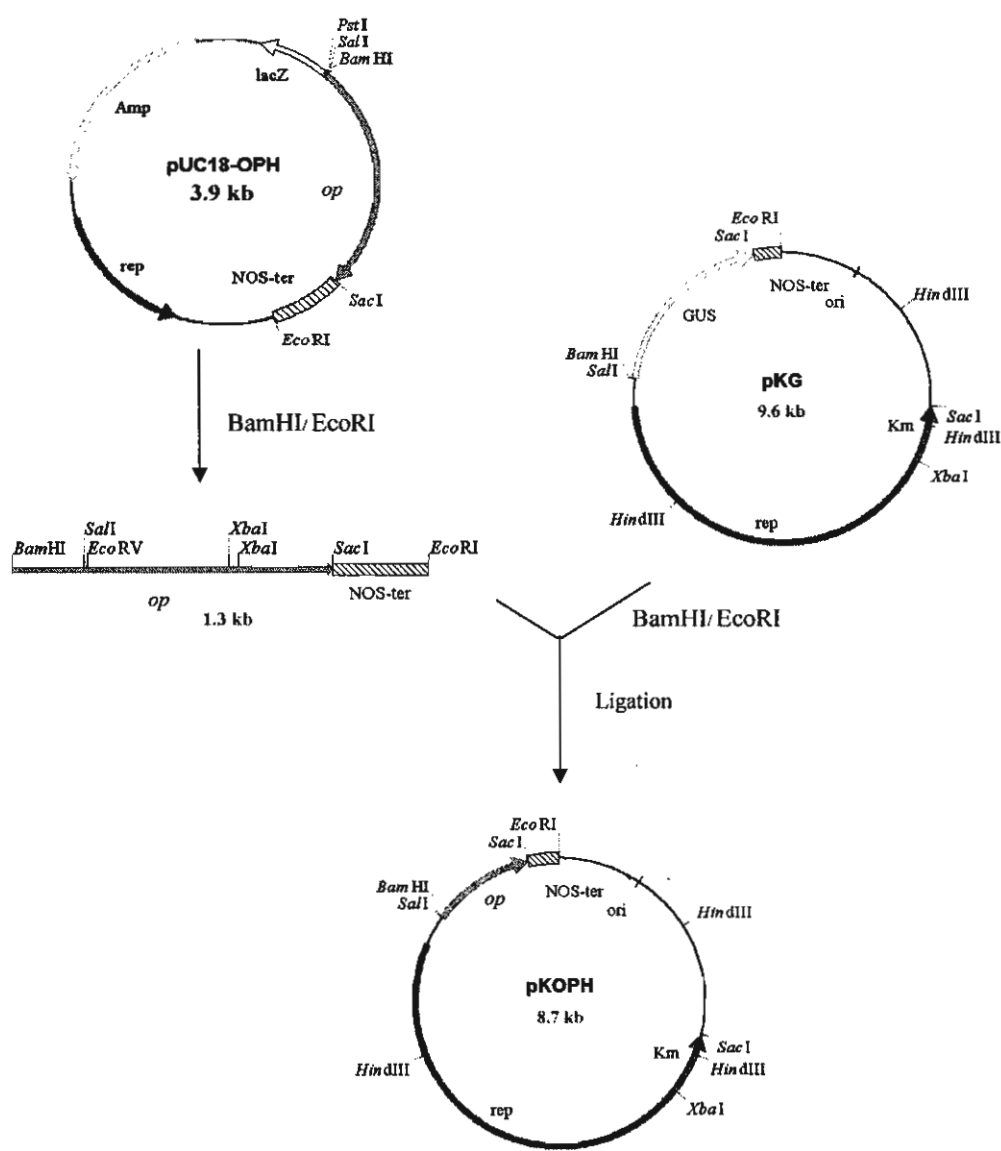


Figure 2. Flowchart of procedure used to construct plasmid pKOPH
The pKOPH harbors *opd* gene and Nos-ter in pKG shuttle vector.
The figure is not drawn to scale.

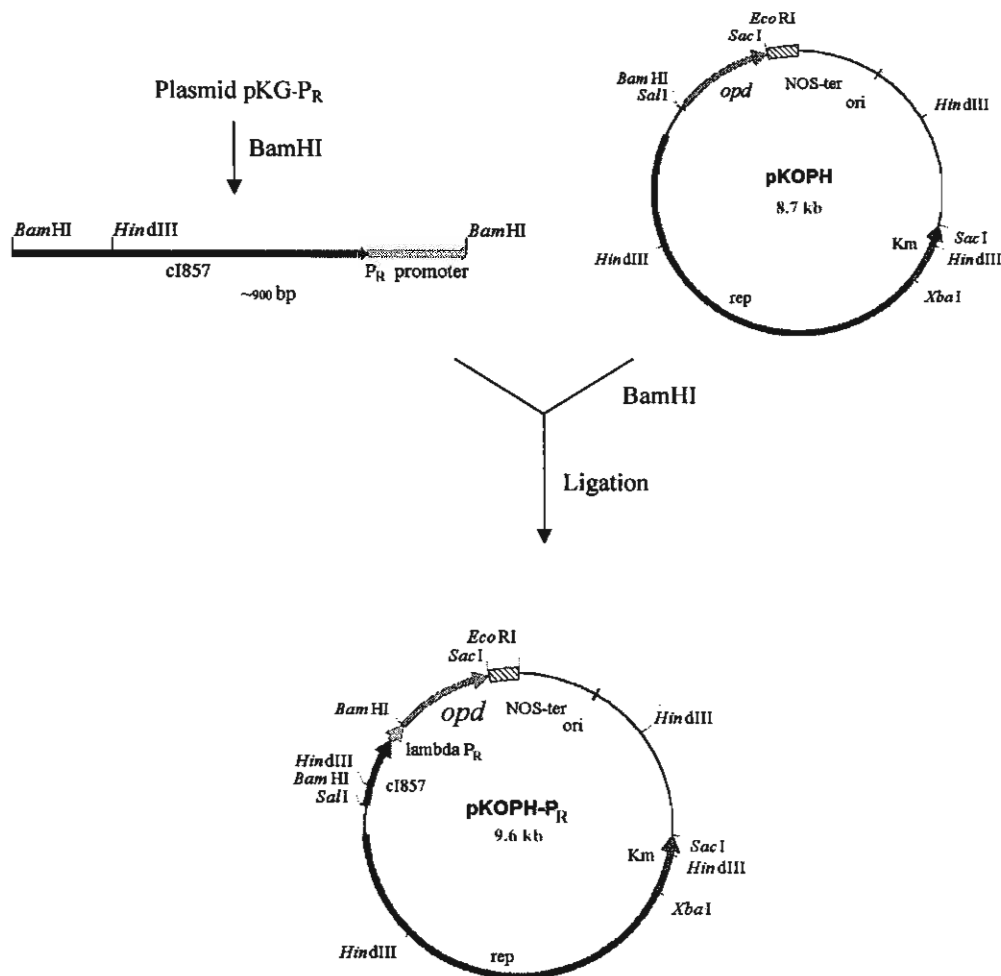


Figure 3. Flowchart of procedure used to construct plasmid pKOPH-P_R
 The pKOPH-P_R harbors *opd* gene, under the control of lambda P_R promoter, and Nos-ter in pKG shuttle vector. The figure is not drawn to scale.

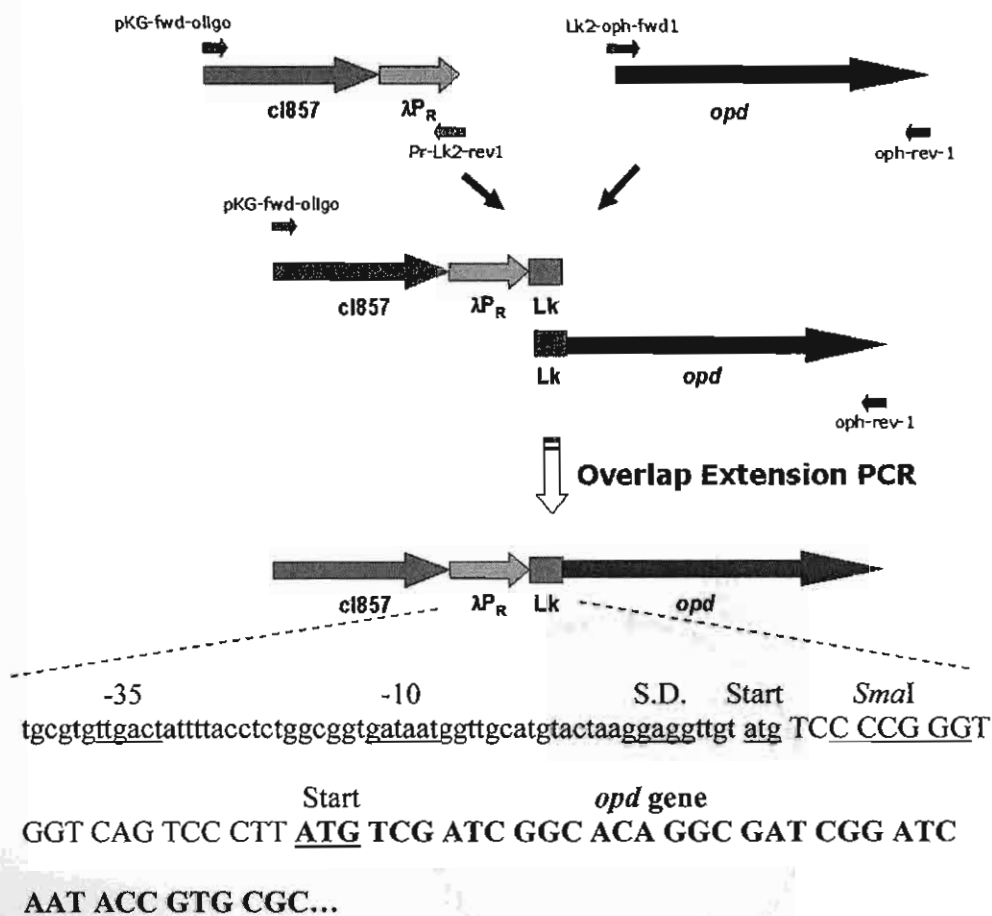


Figure 6. Flowchart of procedure for overlap extension PCR of λP_R -*opd* in plasmids pUC-POP and pK-POP

The 0.9 kb λP_R promoter was fused with the 1.0 kb *opd* gene using overlap extension PCR. The λP_R , linker sequence and *opd* gene were shown in small letters, capital letters and bold letters, respectively.

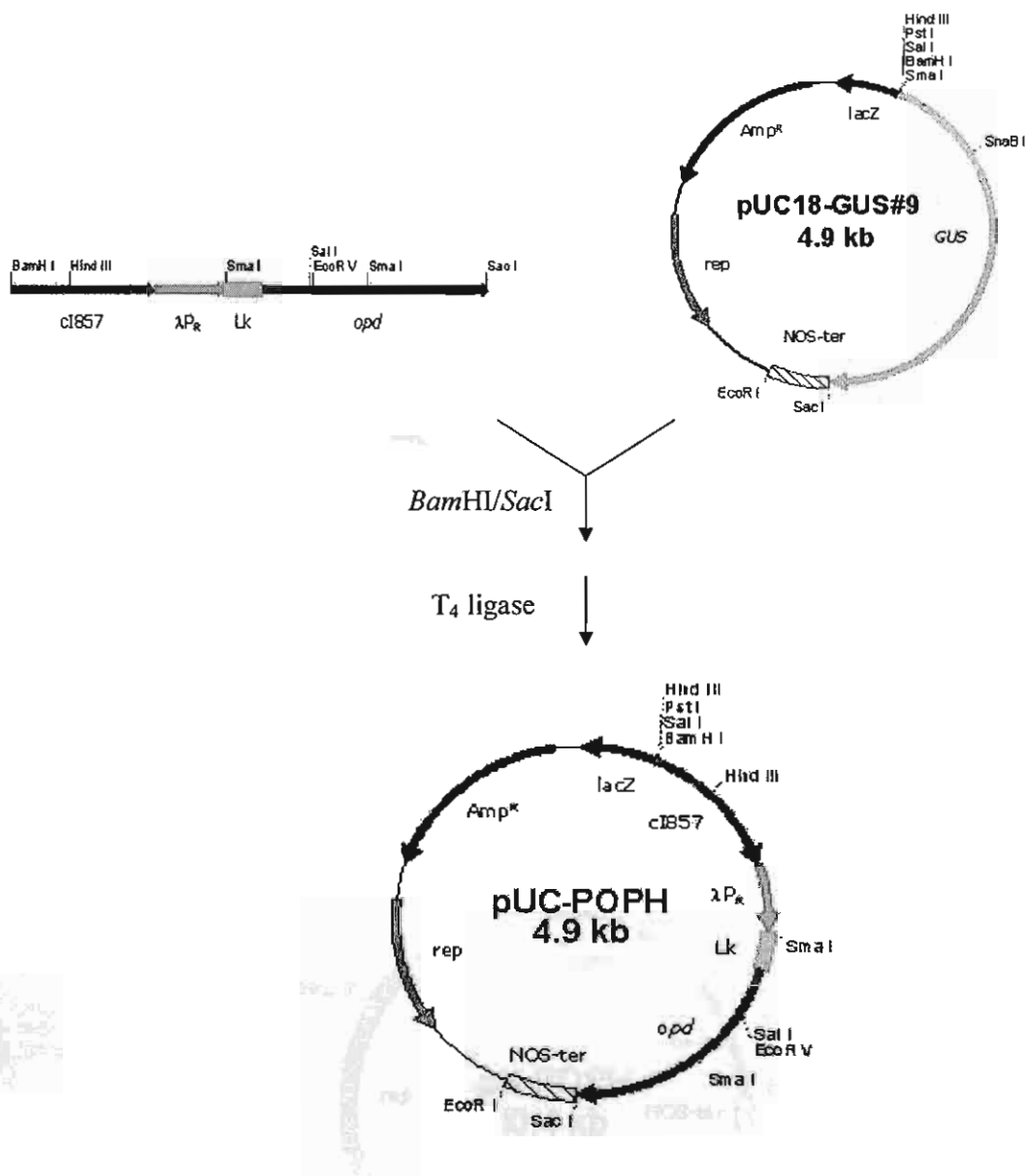


Figure 7. Flowchart of procedure used to construct plasmid pUC-POPH

The 1.9 kb *Bam*HI/*Sac*I fragment of overlap extension PCR product was inserted into the *Bam*HI/*Sac*I site of pUC18-GUS#9 to replace the *GUS* gene. The resulting 4.9 kb pUC-POPH resulting plasmid contains *c1857*- λP_R -*opd*-(*NOS-ter*) cassette.

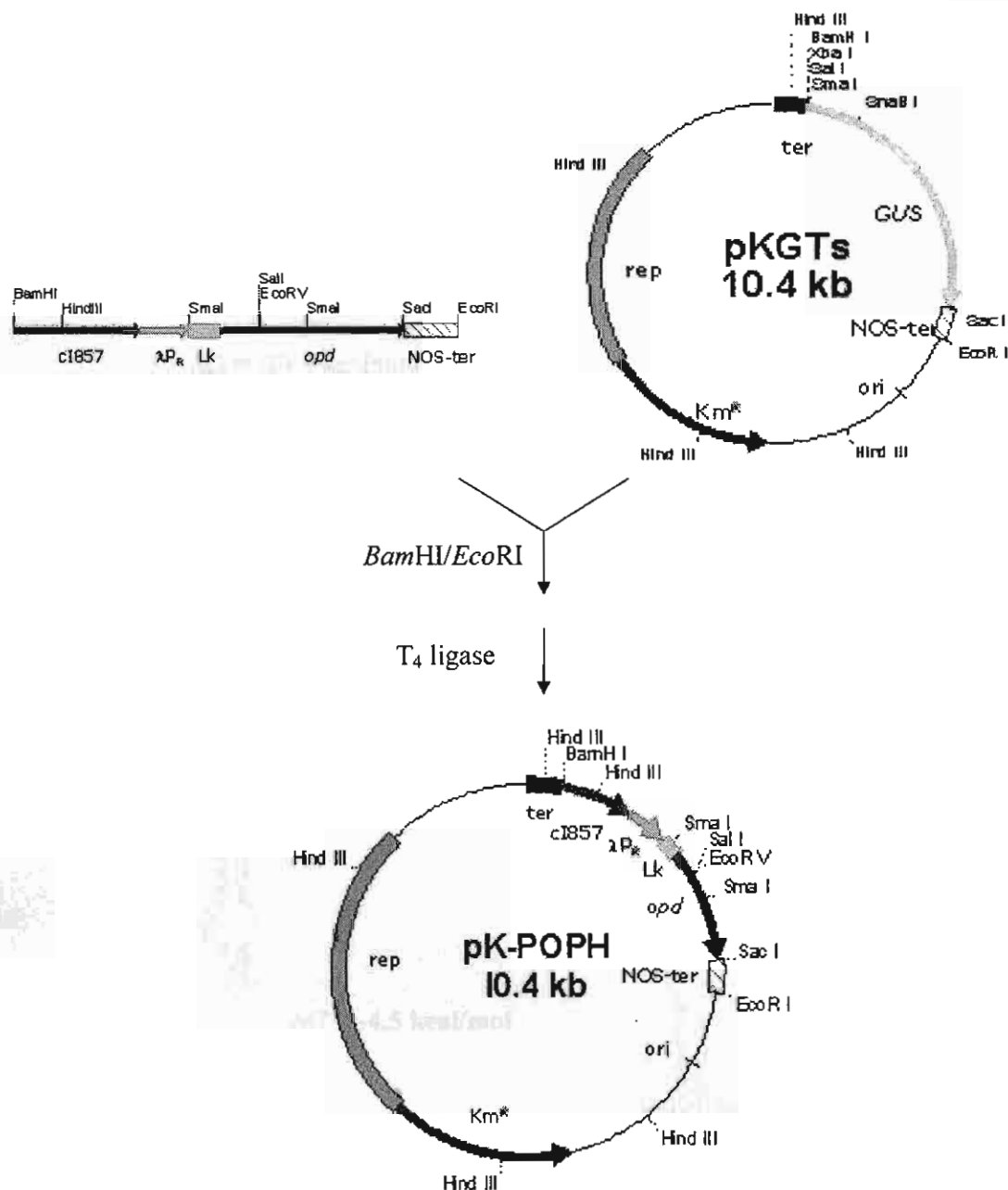


Figure 8. Flowchart of procedure used to construct plasmid pK-POPH

The 2.2 kb *Bam*HI/*Eco*RI fragment containing *c1857-λP_R-opd-(NOS-ter)* cassette from pUC-POPH was inserted into the *Bam*HI/*Eco*RI site of pKGTs to replace the *GUS* gene. The resulting 10.4 kb pK-POPH plasmid contains *c1857-λP_R-opd-NOS-ter* in the shuttle vector.

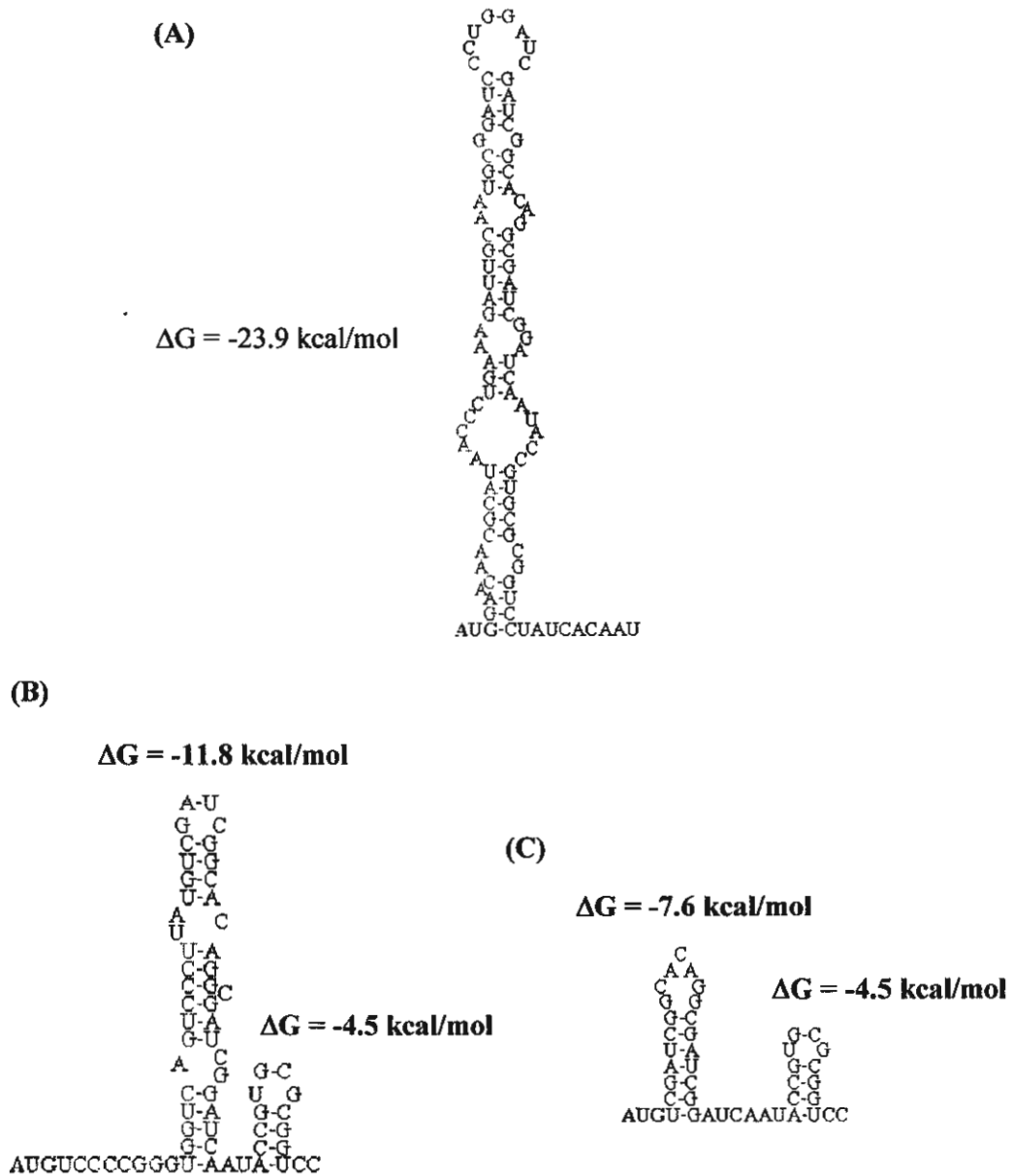
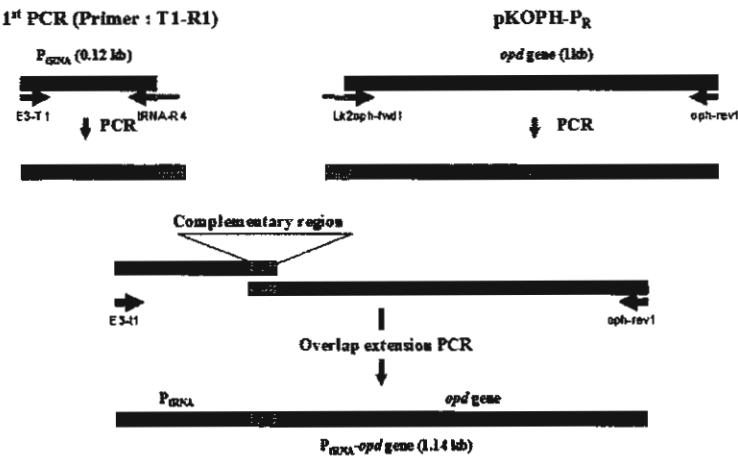


Figure 9. Predicted secondary structure of λP_R -*opd* mRNA from plasmid pKOPH- P_R and pK-POPH

Computer predicted secondary structures of λP_R -*opd* mRNA downstream of the start codon in plasmids pKOPH- P_R (A) and pK-POPH (B, C).

(A)



(B)

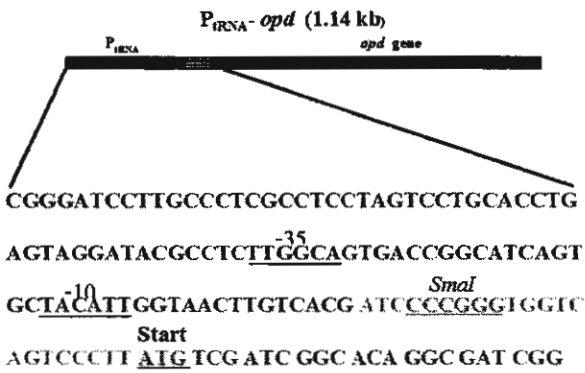


Figure 10. Overlap extension PCR product of $P_{IRNA}-opd$ gene
(A). Flowchart of overlap extension PCR procedure.
(B). $P_{IRNA}-opd$ fusion region.

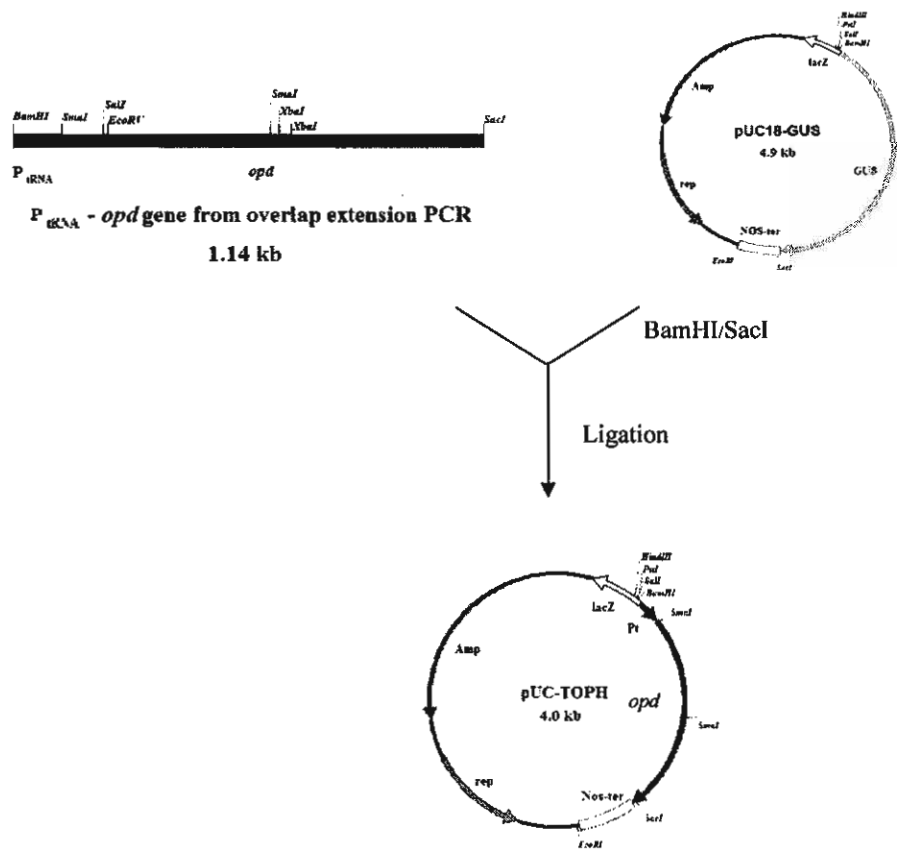


Figure 11. Flowchart of procedure used to construct plasmid pUC-TOPH
The pUC-TOPH harbors *opd* gene, under the control of tRNA^(pro) promoter, and Nos-ter in pUC18 vector. The figure is not drawn to scale.

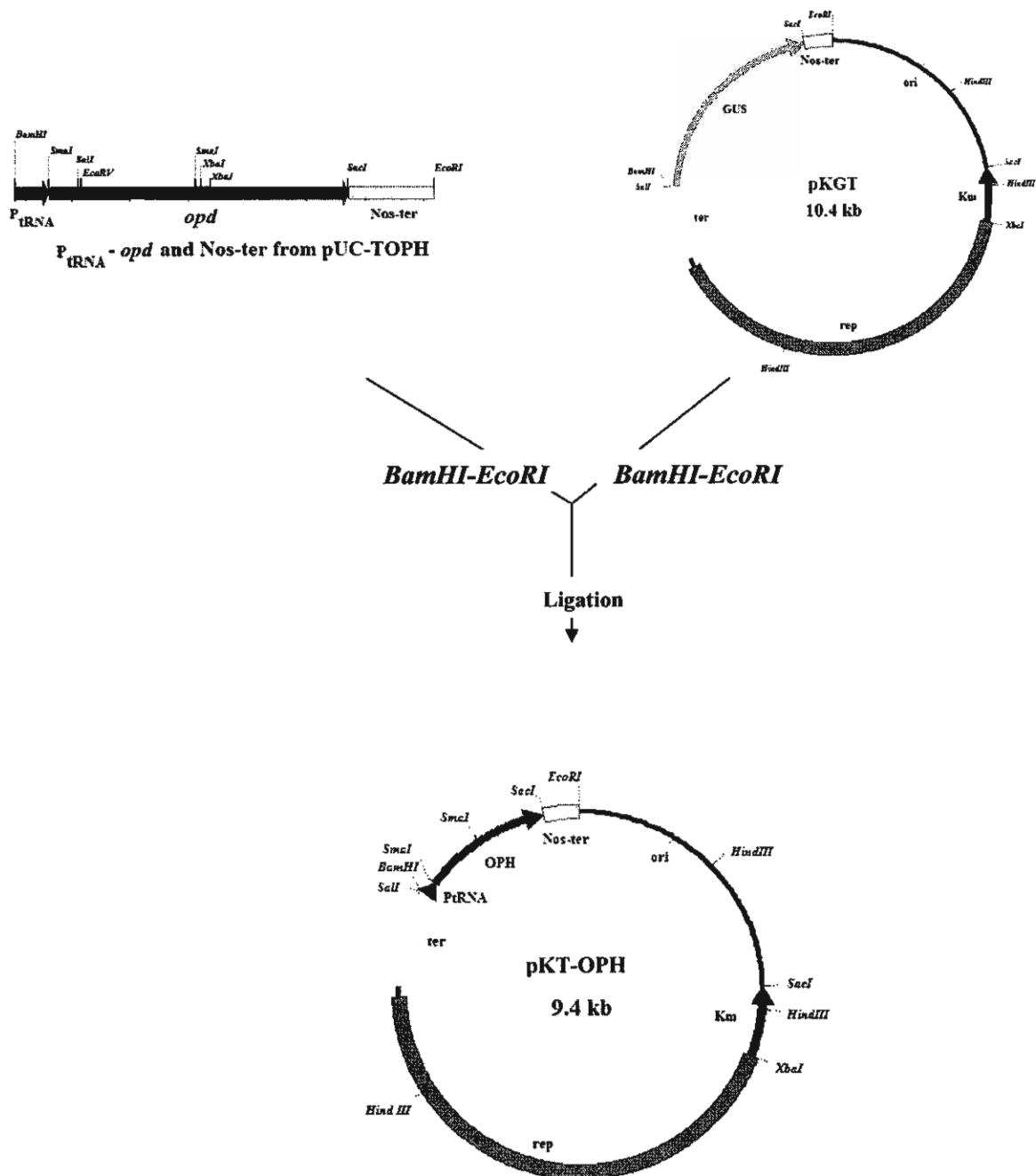


Figure 12. Flowchart of procedure used to construct plasmid pKT-OPH

The P_{trnA} -*opd* gene and Nos-ter from pUC-TOPH was cloned into the *Bam*HI-*Eco*RI of pKGT shuttle plasmid to generate pTOPH shuttle plasmid. The 9.4 kb pKT-OPH contains P_{trnA} -*opd* gene and Nos-ter in the shuttle plasmid.

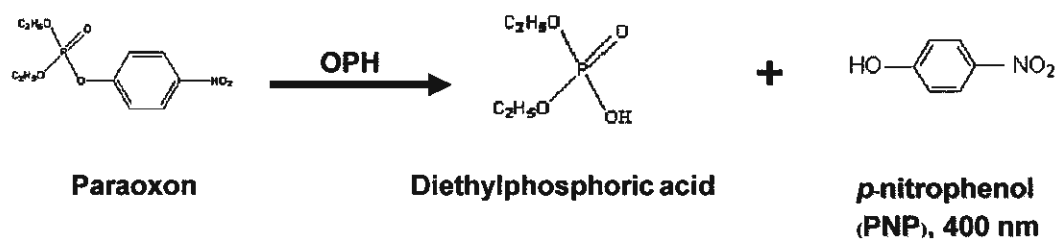


Figure 13. OPH activity determination

The OPH activity was measured by following the increase in absorbance of *p*-nitrophenol from the hydrolysis of paraoxon at 400 nm ($\epsilon_{400} = 17,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for *p*-nitrophenol). Activities are expressed as μmol of paraoxon hydrolyzed per min (U) per mg protein of cell lysate or per OD_{730} whole cells.

Table 1. The OPH activities of *E. coli* harboring the *opd* gene.

Plasmid	OPH activity (Unit/L/mg protein) ^a	
	28°C ^b	42°C ^c
MC 1061 (-ve)	8.67 (±0.39)	75.70 (±7.02)
pKOPH-P _R	74.18 (±4.22)	406.01 (±15.71)
pK-POPH	76.97 (±7.09)	406.00 (±23.85)

^a The specific activities of cell lysate are the means of three independent experiments, with standard deviation indicated in parentheses.

^{b, c} *E. coli* was grown in LB broth at 28°C (non-induction) and 42°C (heat induction) for 6 hr.

Table 2. The OPH activities of *Synechococcus* harboring the *opd* gene.

Plasmid	OPH activity (Unit/L/mg protein) ^a	
	28°C ^b	39°C ^c
R2-SPc (-ve)	0.00 (±0.00)	0.10 (±0.01)
pKOPH-P _R	0.21 (±0.01)	7.81 (±0.25)
pK-POPH	0.82 (±0.04)	29.08 (±1.02)
pKT-OPH	95.02 (±7.6) ^d	ND

^a The specific activities of cell lysate are the means of three independent experiments, with standard deviation indicated in parentheses.

^{b, c} Cyanobacteria was grown on BG-11 agar at 28°C (non-induction) and 39°C (heat induction) for 24 hr.

^d Results to be confirmed

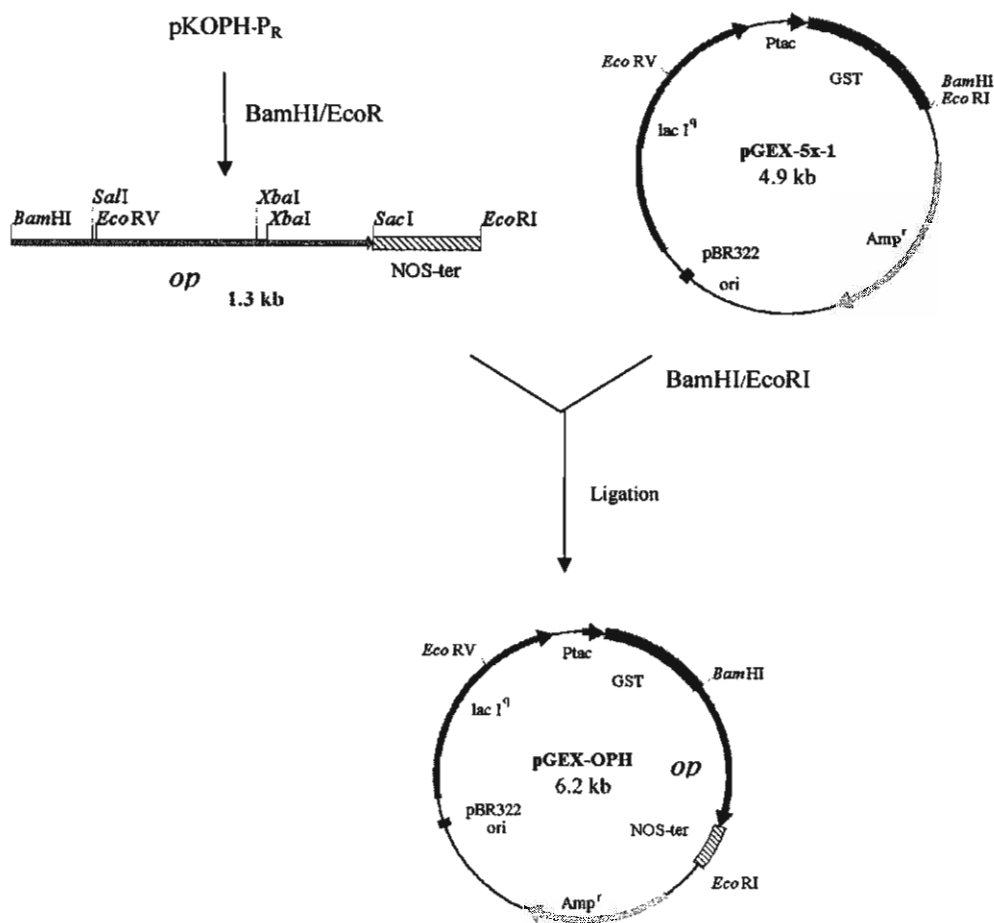


Figure 14. Flowchart of procedure used to construct plasmid pGEX-OPH
 The pGEX-OPH harbors *opd* gene fused in frame GST gene. The figure is not drawn to scale.

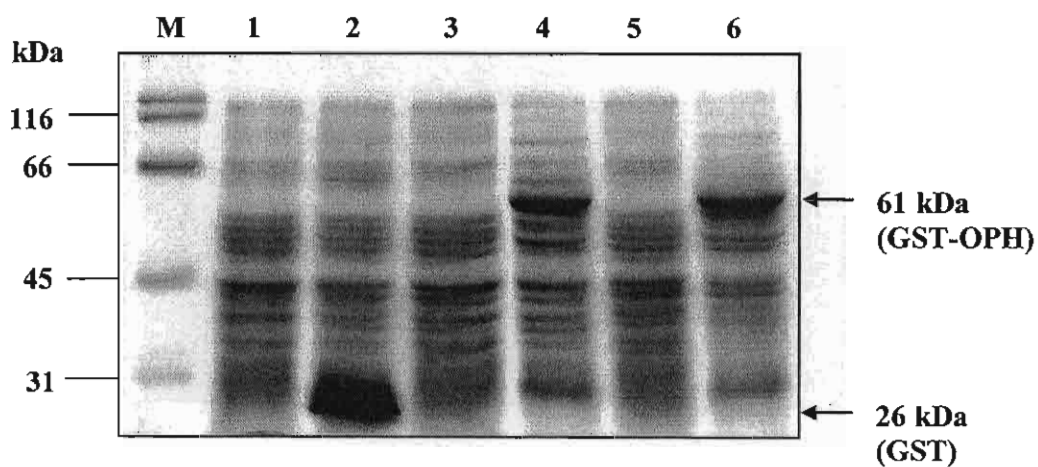


Figure 15. Expression of GST-OPH fusion protein in *E. coli* harboring pGEX-OPH

12% SDS-PAGE staining with Coomassie brilliant blue R-250. Lane M is standard molecular mass marker. Total cell lysate of *E. coli* harboring vector pGEX-5x-1 (lanes 1 and 2) and pGEX-OPH (lanes 3-6). Lanes 1, 3 and 5 are from without induction. Lanes 2, 4 and 6 are from IPTG induction.

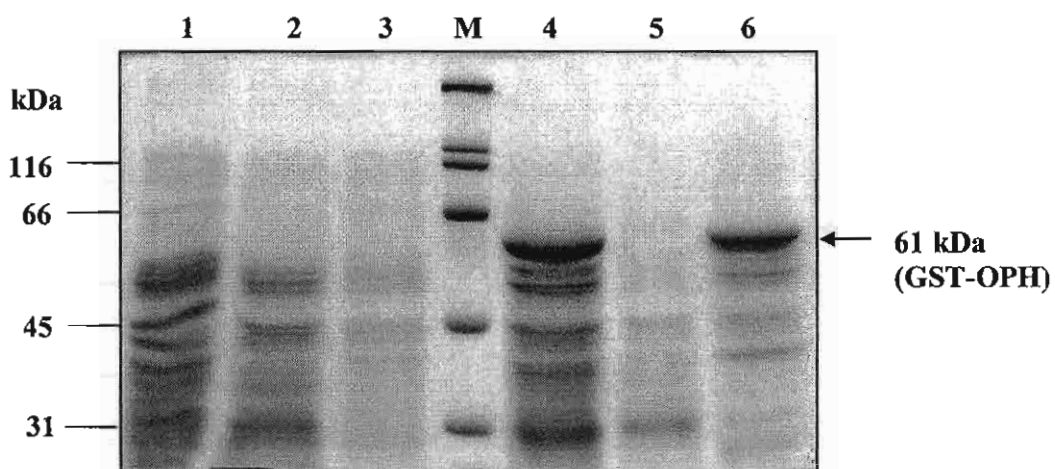


Figure 16. Expression of GST-OPH fusion protein in fractions of *E. coli* harboring pGEX-OPH.

12% SDS-PAGE staining with Coomassie brilliant blue R-250. Lane M is standard molecular mass marker. Lanes 1, 2 and 3 are total cell lysate, supernatant and pellet fraction of non-induced cells, respectively. Lanes 4, 5 and 6 are total cell lysate, supernatant and pellet fraction of IPTG induced cells, respectively.

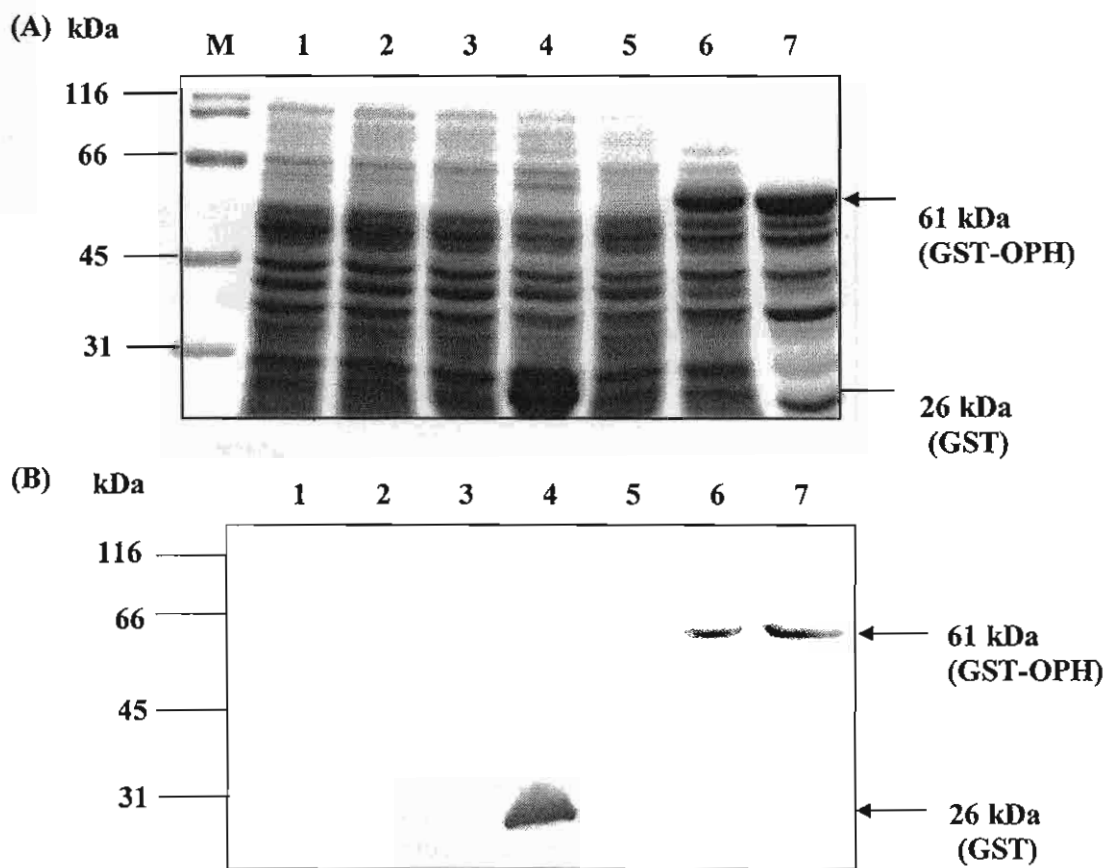


Figure 17. Western blot analysis of GST-OPH fusion protein in *E. coli* using antisera against GST

(A). 12% SDS-PAGE staining with Coomassie brilliant blue R-250. (B). Western blot analysis using antisera against GST. Lane M is standard molecular mass marker.

Lanes 1 and 2 are cell lysate of *E. coli* DH5α without and with IPTG induction, respectively. Lanes 3 and 4 are lysate of cell harboring pGEX-5x-1 without and with IPTG induction, respectively. Lanes 5 and 6 are lysate of cell harboring pGEX-OPH without and with IPTG induction, respectively. Lane 7 is inclusion of cells harboring pGEX-OPH with IPTG induction.

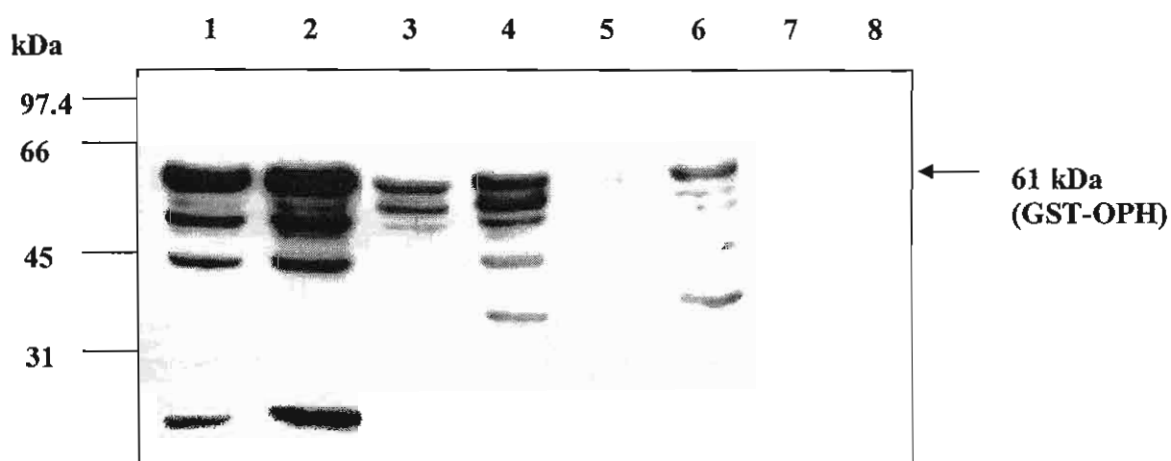


Figure 18. Western blot analysis of GST-OPH fusion protein in *E. coli* using antisera from mice.

The samples are the partial purified inclusion bodies of the GST-OPH fusion protein. Lanes 1, 3 and 5 are 1:1,000 dilution of antisera from mouse no. 1, 2 and 3, respectively. Lanes 2, 4 and 6 are 1:300 dilution of antisera from mouse no. 1, 2 and 3, respectively. Lane 7 is 1:300 dilution of pooled normal mouse serum that was used as primary antibody control. Lane 8 is 1:300 dilution of horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG that was used as secondary antibody control.

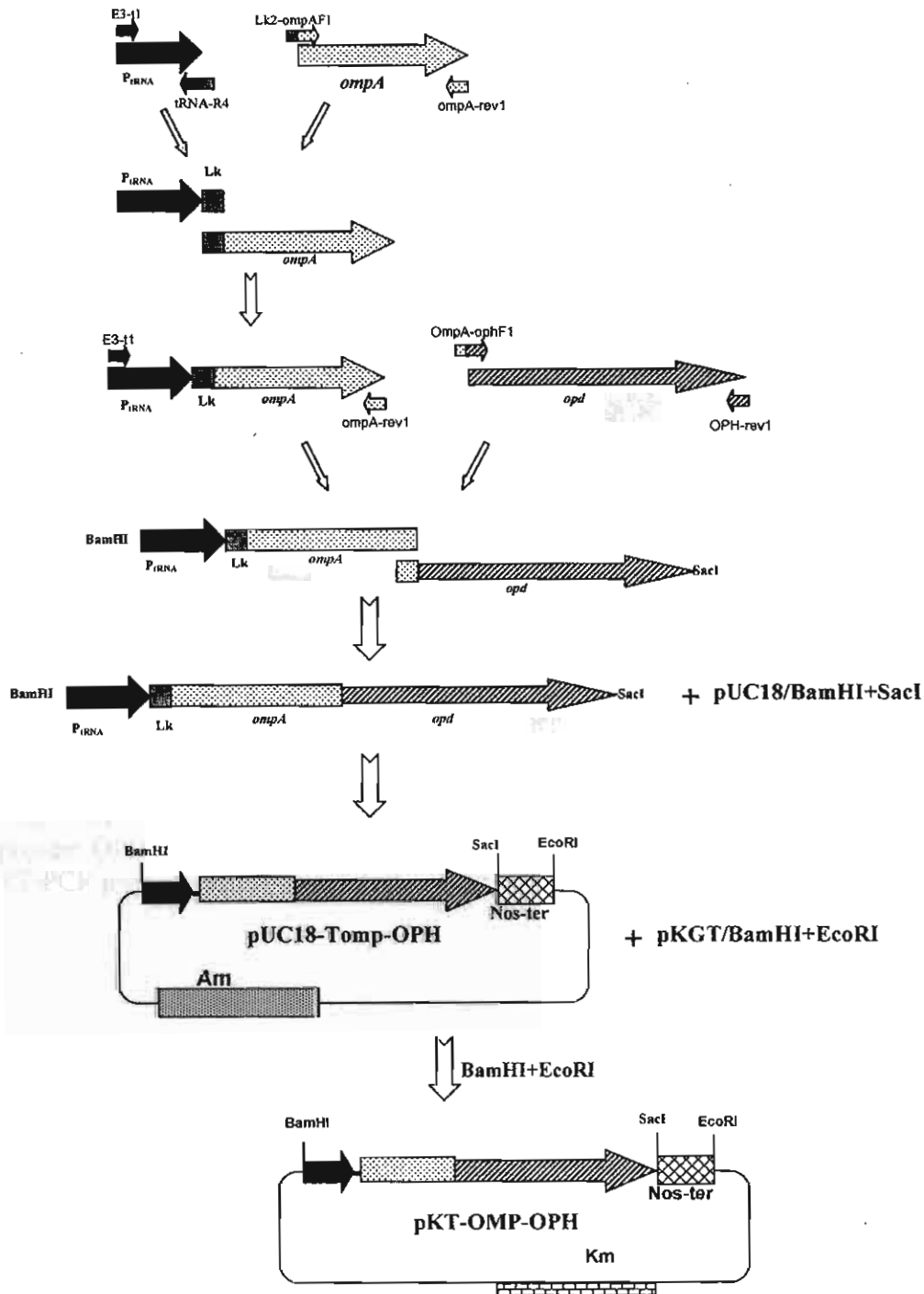


Figure 19. Flowchart of procedure used to construct plasmid pKT-OMP-OPH
 The pKT-OMP-OPH harbors *ompA-opd* gene, under the control of tRNA^(pro) promoter, and Nos-ter in pKGT vector. The figure is not drawn to scale.

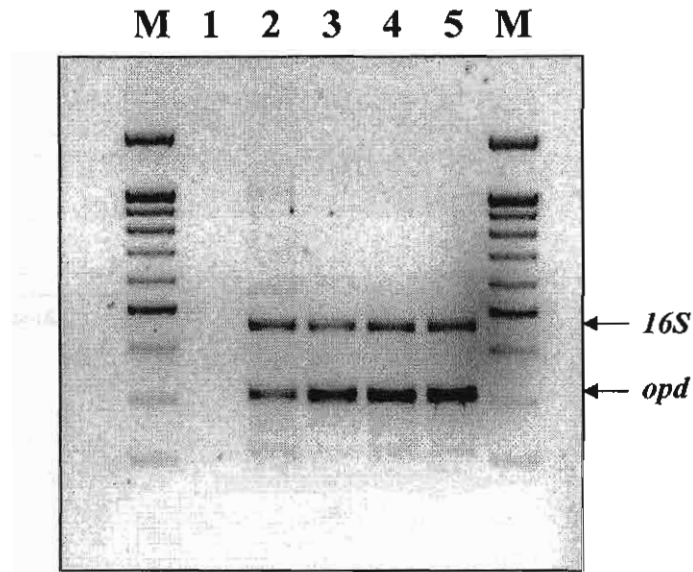


Figure 20. Comparison of steady-state *opd* mRNA level using relative RT-PCR

Lanes M are 100 bp ladder markers. Lane 1 is negative control. Lanes 2-5 are RT-PCR of *Synechococcus* harboring pKT-OPH, pKT-INP-OPH, pKT-OMP-OPH #2 and pKT-OMP-OPH #9. First strand cDNA synthesis was performed using primer OPH-rev1 and total RNA extracted from *Synechococcus*. The PCR products were co-amplified using primers OPH-rev1 and OPH-fwd3: 16S rRNA for 10 cycles; *opd* for 25 cycles. The RT-PCR products of 16S rRNA and *opd* are 458 and 304 bp, respectively.

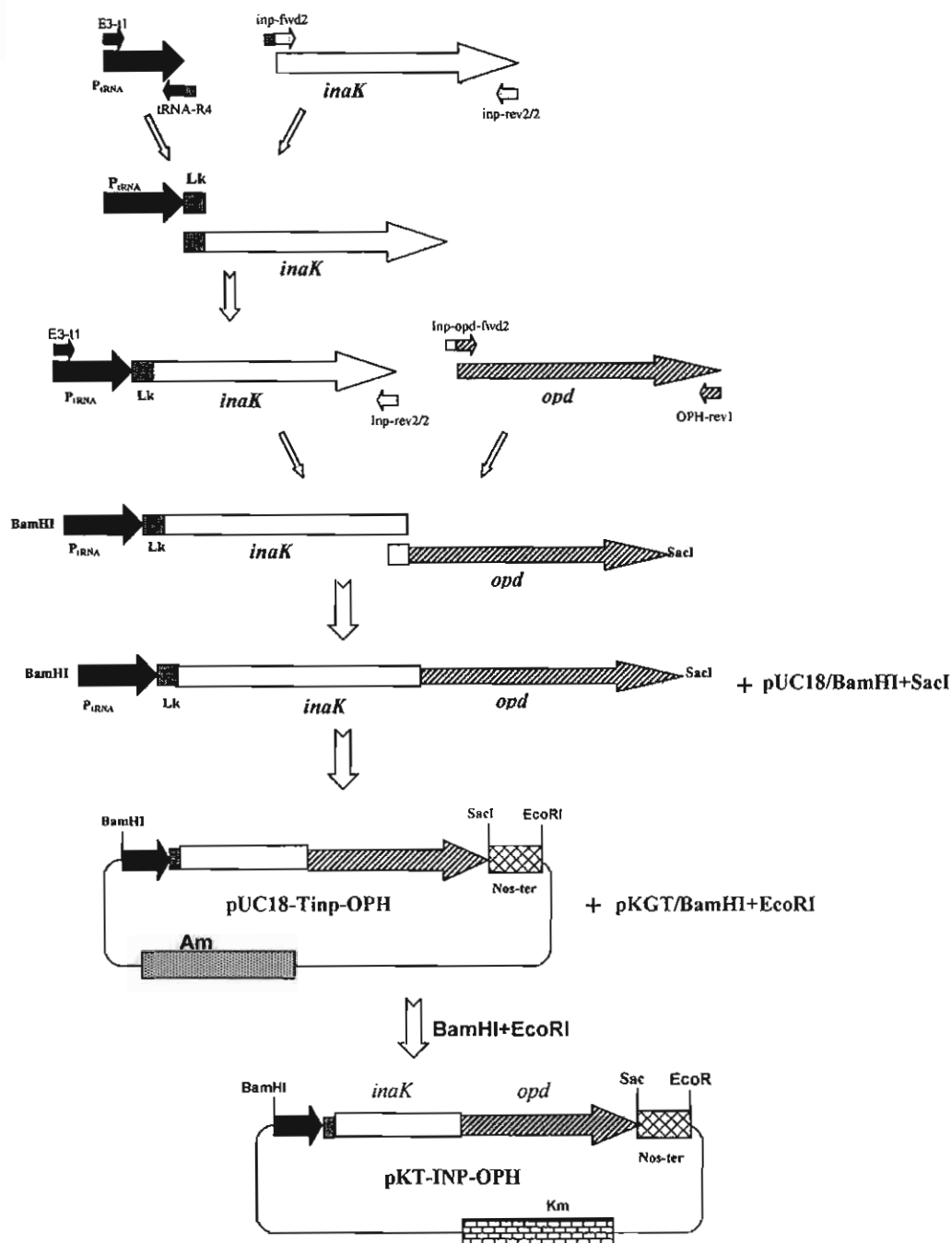


Figure 21. Flowchart of procedure used to construct plasmid pKT-INP-OPH
 The pKT-INP-OPH harbors *inaK-opd* gene, under the control of tRNA^(pro) promoter, and Nos-ter in pKGT vector. The figure is not drawn to scale.

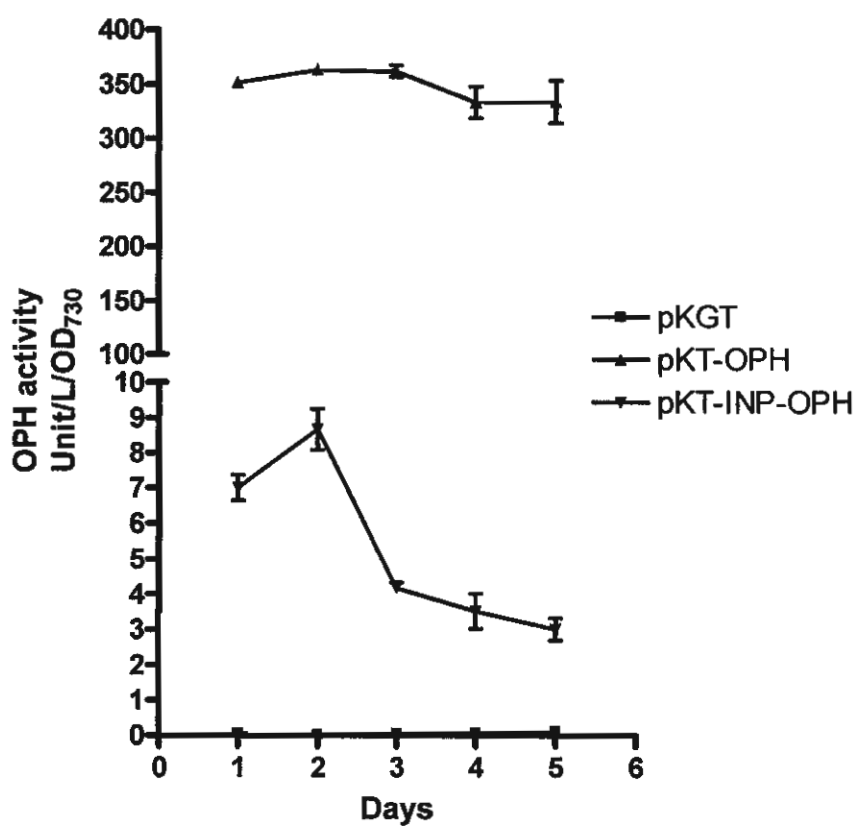


Figure 22. OPH activity of *Synechococcus* cultures

Synechococcus harboring pKT-INP-OPH, pKT-OPH and pKGT were grown on BG-11 agar and taken each day and kept at -80°C. Whole cell suspension (1.0 OD₇₃₀) was assayed for OPH activity in 1 ml of 2 mM paraoxon.

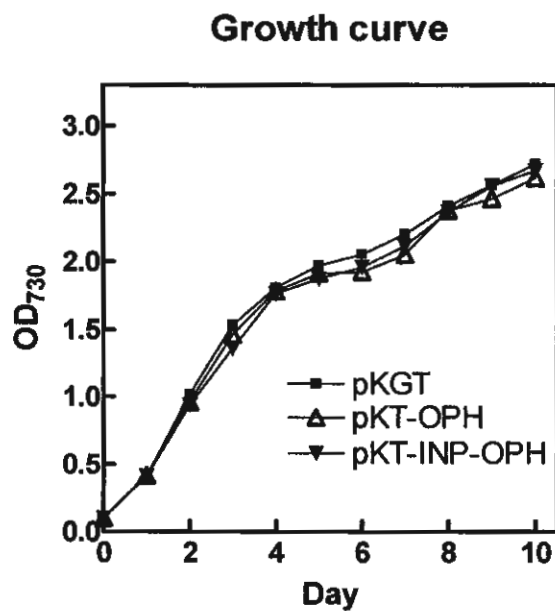


Figure 23. Growth of *Synechococcus* expressing OPH

Synechococcus harboring pKGT, pKT-OPH or pKT-INP-OPH were grown in BG-11 broth. Cell growth was measured as OD₇₃₀. The data are the means of three independent experiments. The maximum standard deviation was 0.27.

Table 3. Kinetic parameters of paraoxon-bioconversion reaction using the intracellular (pKT-OPH) and surface display OPH (pKT-INP-OPH) activity. The values for kinetic parameters, V_{\max} and K_m , were determined by analyzing Lineweaver-Burk plot. All data were based on cells grown for two days at $OD_{730}=1$.

	pKT-OPH Whole cells		pKT-INP-OPH Whole cells	
	Fresh	Frozen/thawed	Fresh	Frozen/thawed
V_{\max} (Unit/L/ OD_{730})	141.67 (± 29.58)	477.50 (± 51.86)	2.78 (± 0.37)	11.04 (± 0.68)
K_m (mM)	1.03 (± 0.06)	1.05 (± 0.19)	0.96 (± 0.30)	0.35 (± 0.09)

Table 4. OPH activities of *Synechococcus* with OPH expressed on the surface (pKT-INP-OPH) and intracellularly (pKT-OPH)

Plasmid	OPH activity				
	Cell lysate Unit/L/mg protein	Whole cells Unit/L/ OD_{730}			
		Fresh cells		Frozen/thawed cells	
		Proteinase K		Proteinase K	
		(-)	(+)	(-)	(+)
pKGT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
pKT-OPH	688.13(± 66.29)	75.36(± 10.45)	302.55(± 19.44)	320.90(± 38.5)	322.20(± 31.4)
pKT-INP-OPH	0.0	1.63(± 0.22)	3.19(± 0.28)	9.20(± 0.90)	3.90(± 0.40)

Fresh cells: determine the OPH activity immediately after the two-day cells harvested.

Frozen/thawed cells: determine the OPH activity of the cells after kept at -80°C .

The specific activities are the means of three independent experiments, with standard deviation indicated in parentheses.

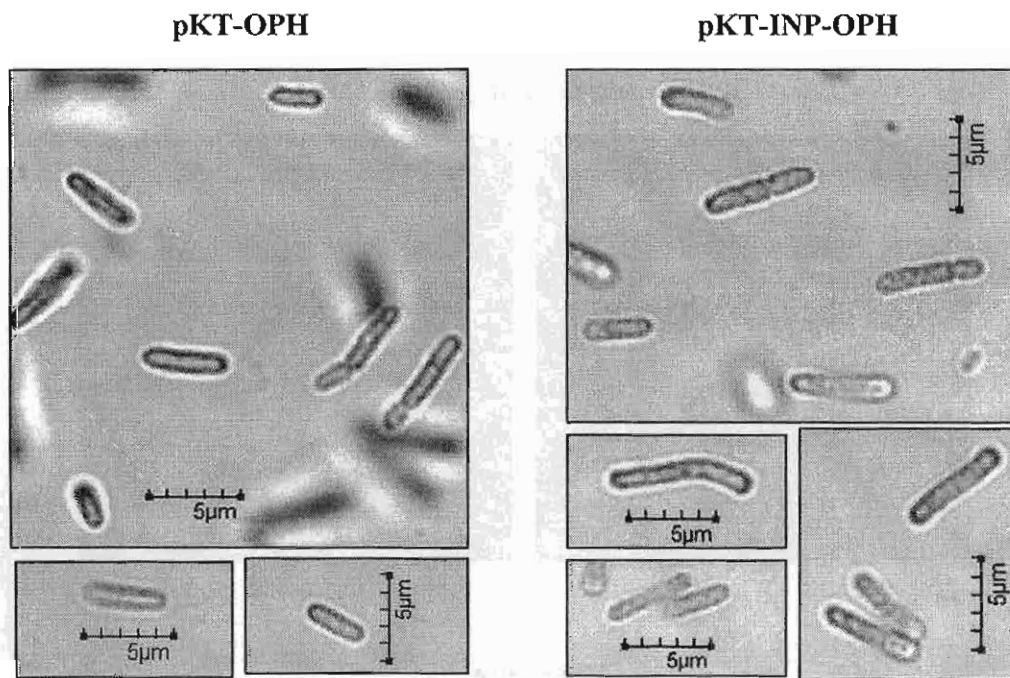
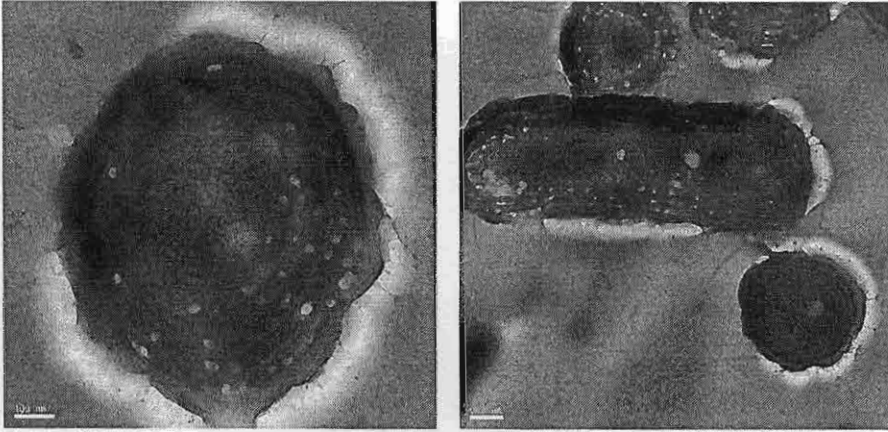


Figure 24. CLSM images of *Synechococcus* cells harboring pKT-OPH or pKT-INP-OPH.

Whole cells were treated with antiserum raised against OPH as first Ab and IgG conjugated with horseradish peroxidase as second Ab. The immune complexes were visualized using diaminobenzidine and amidazole.

Negative control



Anti- OPH

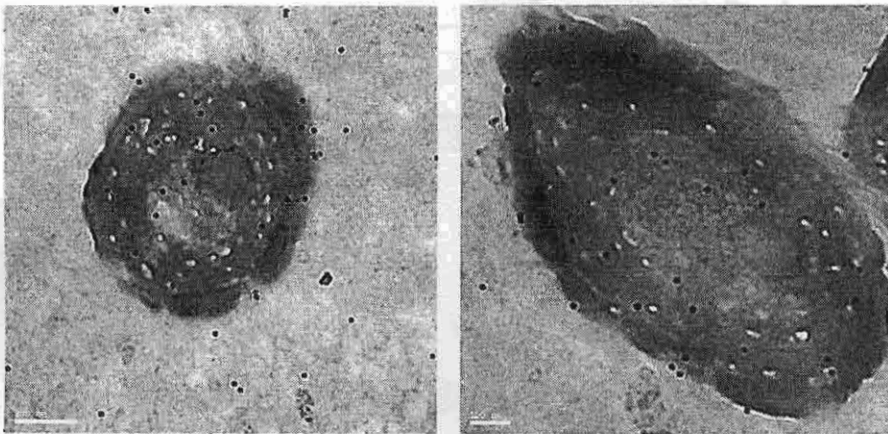


Figure 25. Immunogold transmission electron microscopy of *Synechococcus* cells harboring pKT-INP-OPH.

Synechococcus was treated with anti-OPH (dilution 1:400) followed by protein A- gold. *Synechococcus* treated with protein A- gold without treatment of anti-OPH was used as negative control.

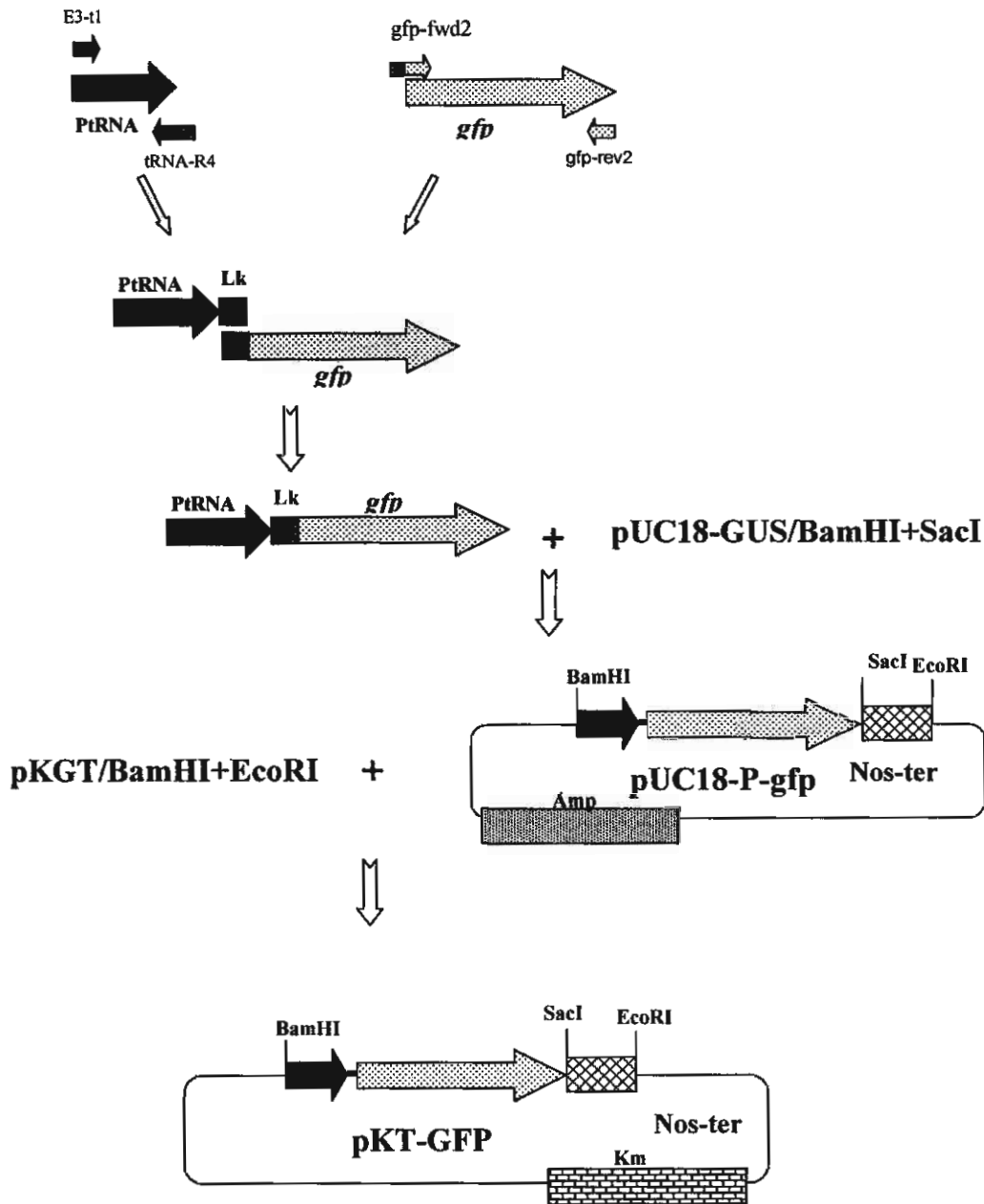


Figure 26. Flowchart of procedure used to construct plasmid pKT-GFP

The shuttle plasmids pKT-GFP harbor gene cassette $P_{tRNA-gfp}$. The figure is not drawn to scale.

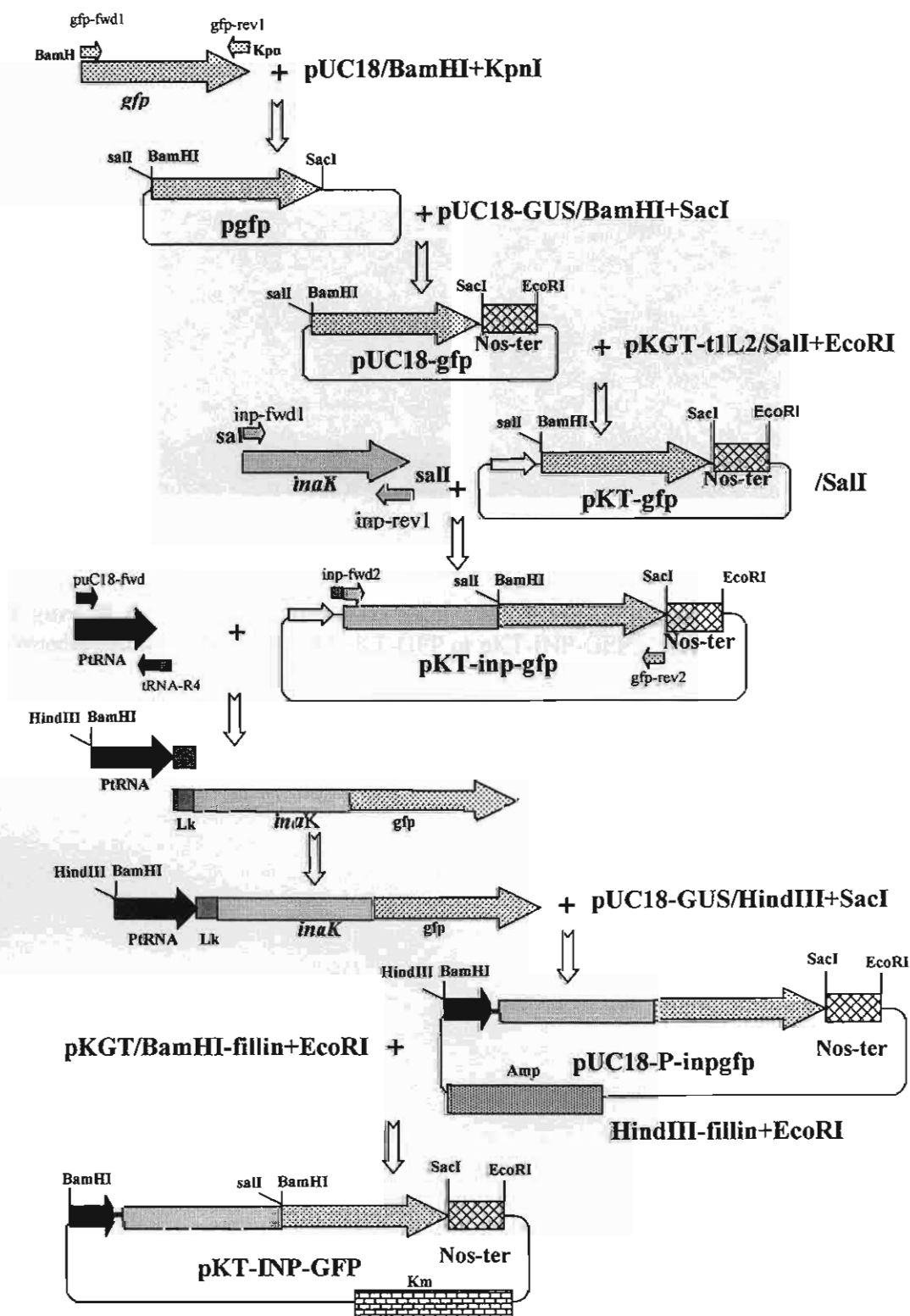


Figure 27. Flowchart of procedure used to construct plasmid pKT-INP-GFP
 The shuttle plasmids pKT-INP-GFP harbor gene cassette P_{iRNA} -*inaK*-*gfp*. The figure is not drawn to scale.

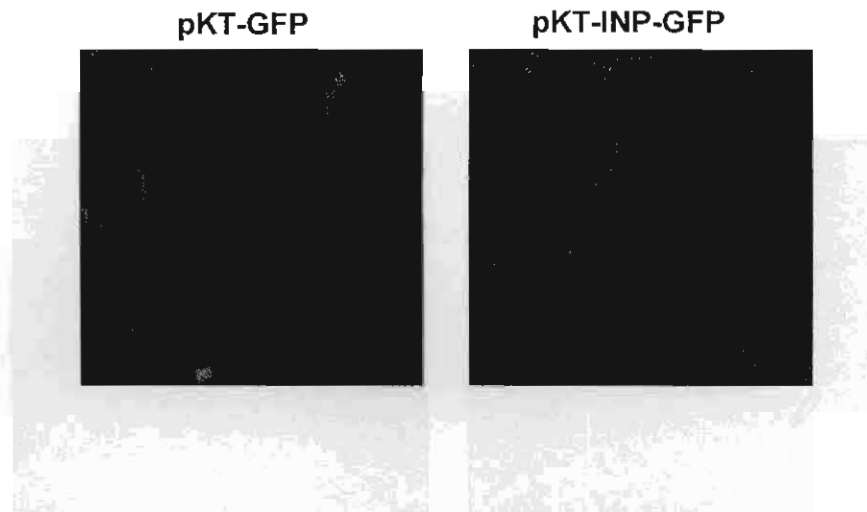


Figure 28. Cell surface observation using the GFP laser/ emission settings CLSM. *Synechococcus* harbors plasmid pKT-GFP or pKT-INP-GFP.

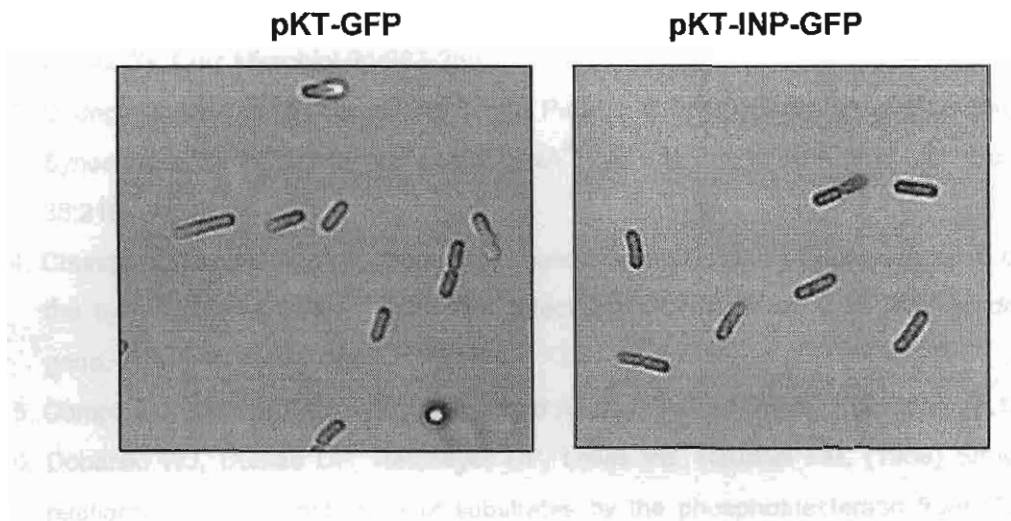


Figure 29. LSM images of *Synechococcus* cells harboring pKT-GFP or pKT-INP-GFP.

Whole cells were treated with monoclonal antiserum raised against GFP as first Ab and IgG conjugated with horseradish peroxidase as second Ab. The immune complexes were visualized using diaminobenzidine and amidazole.

4. เอกสารอ้างอิง

1. Boder ET and Wittrup KD (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* 15:553-557.
2. Chungjatupornchai W (1990) Expression of the mosquitocidal-protein genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and the herbicide-resistance gene *bar* in *Synechocystis* PCC6803. *Curr Microbiol* 21:283-288
3. Chungjatupornchai W, Senawong T and Panyim S (1999) Isolation and characterization of *Synechococcus* PCC7942 promoters: tRNA^{pro} gene functions as a promoter. *Curr. Microbiol.* 38:210-216.
4. Chungjatupornchai W, Fa- aroonsawat S and Panyim S (2002) Characterization of regions of the cyanobacterial tRNA^{pro} gene that affect the expression of a β -Glucuronidase reporter gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 211:57-64.
5. Compton JA, (1988) Military Chemical and Agents. Telford Press, New Jersey, p.135.
6. Donarski WJ, Dumas DP, Heitmeyer DP, Lewis VE, Raushel FM. (1989) Structure-activity relationships in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry* 28:4650-4655.
7. Francisco JA, Earhart CF and Georgiou G (1992) Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:2713-2717.
8. Fukuda H, Sakai M, Nagahama K, Fujii K, Matsuoka M, Inoue Y, Ogawa T (1994) Heterologous expression of the gene for the ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae* in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Biotech Lett* 16:1-6.
9. Jung HC, Lebeault JM and Pan JG (1998) Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat. Biotechnol.* 16:576-580.
10. Kang DG, Kim JYH and Cha HJ (2002) Enhanced detoxification of organophosphates using recombinant *Escherichia coli* with co-expression of organophosphorus hydrolase and bacterial hemoglobin. *Biotech. Lett.* 24:879-883.
11. Kawata Y, Yamano N, Kojima H, Itoh S (1991) Expression of salmon growth hormone in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Biotech Lett* 13:851-856
12. Lee JS, Shin KS, Pan JG and Kim CJ (2000) Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine. *Nat. Biotechnol.* 18:645-648.

13. Matthyse AG, Stretton S, Dandie C, McClure NC and Goodman AE (1996) Construction of GFP vectors for use in gram-negative bacteria other than *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 145:87-94.
14. Mulbry WW, Karns JS, Kearney PC, Nelson JO, McDaniel CS and Wild JR (1986) Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by Southern hybridization with *opd* from *Pseudomonas diminuta*. Appl. Environ. Microbiol. 51:926-930.
15. Mulbry WW and Karns JS (1989) Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene: relationship between the gene and protein. J. Bacteriol. 171:6740-6746.
16. Mulchandani A, Kaneva I and Chen W (1999) Detoxification of organophosphate nerve agents by immobilized *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorus hydrolase. Biotech. Bioengineering 63:216-223.
17. Richins RD, Kaneva I, Mulchandani A and Chen W (1997) Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. Nat. Biotechnol. 15:984-987.
18. Shibasaki S, Ueda M, Ye K, Shimizu K, Kamasawa N, Osumi M and Tanaka A (2001) Creation of cell surface-engineered yeast that display different fluorescent proteins in response to the glucose concentration. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:528-533.
19. Tandeau de Marsac N, de la Torre F, Szulmijster J (1987) Expression of the larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 1593M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. Mol Gen Genet 209:396-398.
20. Tsurimoto T, Hase T, Matsubara H, Matsubara K (1982) Bacteriophage lambda initiation preparation from a strain that overproduces the O and P protein. Mol Gen Genet 187:79-86.
21. Wang AA, Mulchandani A and Chen W (2002) Specific adhesion to cellulose and hydrolysis of organophosphate nerve agents by a genetically engineered *Escherichia coli* strain with a surface-expressed cellulose-binding domain and organophosphorus hydrolase. Appl. Environ. Microbiol. 68:1684-1689.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. เสนอผลงานวิชาการ

1.1 **Wipa Chungjatupornchai** and Sirirat Fa-aroonsawat. Cyanobacterial surface display of recombinant proteins using ice nucleation protein as an anchoring motif. Abstract In: The 6th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria. September 25-28, 2005, Gdansk, Poland.

1.2 **Wipa Chungjatupornchai** and Sirirat Fa-aroonsawat. Display of recombinant proteins on the cyanobacterial cell surface using ice nucleation protein as an anchoring motif. Abstract In: The 12th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes. August 27- September 1, 2006. Pau, France.

2. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

2.1. Fa-aroonsawat, S. and **Chungjatupornchai, W.** (2006) Biodegradation of organophosphorus insecticides by a genetically engineered cyanobacterium with surface-expressed organophosphorus hydrolase. (To be submitted)

2.2. Fa-aroonsawat, S. and **Chungjatupornchai, W.** (2006) Targeting expression of green fluorescent protein using ice nucleation protein in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. (In preparation)

2.3. (เป็นผลงานวิจัยที่ทุนวิจัยโครงการนี้มีส่วนสนับสนุน)

Monshupanee, T., Fa-aroonsawat, S. and **Chungjatupornchai, W.** (2006) A cyanobacterial strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: a single nucleotide mutation of 23S rRNA confers temperature-sensitive phenotype. *Microbiology* 152: 1417–1425.

2.4. (เป็นผลงานวิจัยเพิ่มเติมที่ได้รับการสนับสนุนจากทุนสกว.คราวก่อน)

Plansangkate, P., Fa-aroonsawat, S., Panyim, S., **Chungjatupornchai, W.** (2004) The light-responsive promoter of cyanobacterial *ORF76* gene overlaps with the *htpG* terminator. *FEMS Microbiology Letters* 235: 341–347.

ภาคผนวก

Cyanobacterial Surface Display of Recombinant Proteins Using Ice Nucleation Protein as an Anchoring Motif

Wipa Chungiatupornchai and Sirirat Fa-aroonsawat

Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus, Nakornpathom 73170, Thailand. E-mail: stwcj@mucc.mahidol.ac.th

Microbial cell surface display has a wide range of biotechnological and industrial applications, for examples: screening-displayed peptide libraries, immobilizing enzymes used as whole-cell biocatalysts and anchoring enzymes used as biosensor. So far, there is no report concerning surface display system in cyanobacteria. It has been shown that: (i), the activated cyanobacteria-reactor is an economical method for treating both domestic and industrial wastewater; (ii), organophosphorus hydrolase (OPH) isolated from soil microorganisms can effectively detoxify organophosphorus compounds which are highly toxic and used extensively as agricultural and domestic pesticides. Therefore, recombinant cyanobacteria with surface expressed OPH could be used as a novel method for biodegradation of pesticides. In this study, in order to develop a system to display recombinant proteins in cyanobacteria, *Synechococcus* PCC7942 was used as a model system to surface display the OPH of *Flavobacterium* sp. and the green fluorescent protein (GFP) of *Aequorea victoria* by using the ice nucleation protein (INP) of *Pseudomonas syringae* as anchoring motif. The *opd* gene encoding OPH or the *gfp* gene encoding GFP was fused in frame with the *ina* gene encoding INP and under the control of the tRNA(pro) promoter of *Synechococcus* PCC7942 in the shuttle plasmid. Analysis of the surface expressed OPH and GFP are undertaken and the preliminary results will be presented.

Abstract In: The 6th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria, September 25-28, 2005. Gdansk, Poland.

Display of Recombinant Proteins on the Cyanobacterial Cell Surface Using Ice Nucleation Protein as an Anchoring Motif

WIPA CHUNGJATUPORNCHAI and SIRIRAT FA-AROONSAWAT

Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus, Nakornpathom 73170, Thailand. E-mail: stwcj@mucc.mahidol.ac.th

Microbial cell surface display has a wide range of biotechnological applications, for examples: screening-displayed peptide libraries, whole-cell biocatalysts and biosensor. So far, there is no report concerning surface display system in cyanobacteria. It has been shown that: (i), the activated cyanobacteria-reactor is an economical method for treating both domestic and industrial wastewater; (ii), organophosphorus hydrolase (OPH) can effectively detoxify organophosphorus compounds which are highly toxic and used extensively as agricultural and domestic pesticides. Therefore, recombinant cyanobacteria with surface expressed OPH could be used as a novel method for biodegradation of pesticides. In this study, in order to develop a system to display recombinant proteins in cyanobacteria, *Synechococcus* PCC7942 was used as a model system to surface display the OPH of *Flavobacterium* sp. and the green fluorescent protein (GFP) of *Aequorea victoria* by using the ice nucleation protein of *Pseudomonas syringae* as anchoring motif. The *opd* gene encoding OPH was cloned. The plasmids containing gene cassettes *P_{IRNA}-ina-opd* or *P_{IRNA}-ina-gfp* were constructed and transformed into *Synechococcus*. The mouse anti OPH polyclonal antibody was used to react with surfaced expressed OPH; reactivity of immune complexes was visualized using diaminobenzidine under confocal laser scanning microscopy (CLSM). Results showed that OPH was expressed on *Synechococcus* cell surface. In addition, proteinase accessibility assay also confirmed the presence of surface expressed OPH. The OPH activity was detected in cells with intracellular or surface expressed OPH protein, indicating that the substrate (paraoxon) was able to transport across the cyanobacterial cell membrane. CLSM revealed GFP to be almost exclusively located in the periplasm, the reactivity of GFP immune complexes was barely detectable on *Synechococcus* cell surface. This might be due to the fact that OPH is membrane associated protein, but not GFP.

Abstract In: The 12th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes. August 27-September 1, 2006. Pau, France.

A cyanobacterial strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: a single nucleotide mutation of 23S rRNA confers temperature-sensitive phenotypes

Tanakarn Monshupanee, Sirirat Fa-aroonasawat
and Wipa Chungjatupornchai

Correspondence
Wipa Chungjatupornchai
stwcj@mucc.mahidol.ac.th

Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus, Nakompathom 73170, Thailand

The presence of a multicopy chromosome, with each copy containing two rRNA operons (*rrnA* and *rrnB*), has been an obstacle to analysing mutated rRNA in *Synechococcus* PCC 7942. To create a system for expressing homogeneous mutated rRNA, the chromosomal *rrn* operons were sequentially inactivated and a final strain was successfully obtained with all the chromosomal *rrn* operons inactivated but carrying a replaceable multicopy plasmid containing a single *rrn* operon. The lag time required for growth response on dark/light shift of mutant strains with chromosomal *rrnA* or *rrnB* inactivated was increased 50 % over that of the wild-type strain; however, the presence of the plasmid-borne *rrn* operon restored the lag time. The doubling time of mutant strains carrying only a functional *rrnB* operon, but not strains carrying only a functional *rrnA* operon, was significantly longer than that of the wild-type strain. A strain in which essentially all the cellular 23S rRNA contained the mutation C2588A was temperature sensitive at 16 °C and 45 °C. Position C2588 is equivalent to C2611 of the peptidyltransferase centre in domain V of *Escherichia coli* 23S rRNA.

Received 17 November 2005
Revised 25 January 2006
Accepted 31 January 2006

INTRODUCTION

Cyanobacteria are prokaryotic micro-organisms that carry a complete set of genes for higher-plant-like oxygenic photosynthesis (Nakamura *et al.*, 1998). *Synechococcus* PCC 7942 is a prime example of photoautotrophic cyanobacteria. *Synechococcus* PCC 7942 (NZ_AADZ00000000) and *Synechococcus* PCC 6301 (NC_006576) possess nearly identical genomic sequences and therefore are considered as the same species. Results obtained with *Synechococcus* PCC 7942 or PCC 6301 would most likely be applicable to both strains. *Synechococcus* PCC 7942 and PCC 6301 (hereafter referred to as *Synechococcus*) have approximately 10 copies of the chromosome (Binder & Chisholm, 1990; Mori *et al.*, 1996). Each chromosome contains two rRNA operons, *rrnA* and *rrnB* (Tomioka & Sugiura, 1984), which are separated by 600 kb and transcribed oppositely (Kaneko *et al.*, 1996). The *rrnA* and *rrnB* operons have 100 % identical coding sequences organized in the following order: tandem promoters (P1, P2 and P3) (Asato, 2003), 16S gene, tRNA^{Ile} gene, tRNA^{Ala} gene, 23S gene, 5S gene and terminator region. Many bacteria also possess multiple *rrn* operons; for example there are seven *rrn* operons in *Escherichia coli* (Kiss *et al.*, 1977), ten in *Bacillus subtilis* (LaFauci *et al.*, 1986) and six in *Lactococcus lactis* (Tulloch *et al.*, 1991).

rRNAs play an important role in protein synthesis. A growing number of regions in both 16S and 23S rRNA have

been identified as having specific functions (for a review, see Green & Noller, 1997). It has been shown that 23S rRNA is a ribozyme that catalyses the peptidyltransferase step of protein synthesis (Nissen *et al.*, 2000). In *Synechococcus*, rRNA synthesis is stimulated by a light-activated DNA-binding factor in the light but not in the dark (Asato, 1998). However, current knowledge concerning the structure–function relationship of rRNA in cyanobacteria is still limited, due to the lack of a genetic system for mutational analysis. The presence of a multicopy chromosome in cyanobacteria has restricted the mutational analysis of rRNA and the *in vivo* production of pure mutant ribosome populations. Genetic systems for expressing homogeneous mutated rRNA have been developed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Chernoff *et al.*, 1994) and in *E. coli* (Asai *et al.*, 1999).

In this work, we describe a strategy for developing a genetic system for expressing homogeneous mutated rRNA in cyanobacteria. We sequentially constructed and characterized *Synechococcus* mutant strains with chromosomal *rrnA* or *rrnB* inactivated and a final strain with all chromosomal *rrn* operons inactivated but carrying a replaceable multicopy plasmid containing a single *rrn* operon. Here we report an application of our system. We constructed and characterized a *Synechococcus* strain in which essentially all cellular 23S rRNA contained the mutation C2588A encoded by a

plasmid. Position C2588 is equivalent to C2611 of the peptidyltransferase centre in domain V of *E. coli* 23S rRNA.

METHODS

Strains, growth conditions and gene transfer procedures.

E. coli strains DH5 α (Hanahan, 1983) and RL443 (Elhai & Wolk, 1988b) were grown in LB broth or on agar (Sambrook & Russell, 2001). *Synechococcus* PCC 7942 strain R2-Spc (Kuhlemeier *et al.*, 1983) was grown in liquid or on solid (1.5% Difco Bacto Agar) BG-11 medium (Williams, 1988) under constant illumination of 3000 lx (i.e. 38 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). *Synechococcus* cell growth was monitored as OD₇₃₀. The OD₇₃₀ of cell suspensions was linearly related to cell density (determined by flow cytometry) over the range of values used in the experiments (OD₇₃₀ < 0.55). The doubling time of exponentially growing cultures at 30 °C was calculated from OD₇₃₀ data. *Synechococcus* was transformed as described by Kuhlemeier *et al.* (1983). Triparental conjugation, used to transfer plasmid into *Synechococcus*, was performed according to Elhai & Wolk (1988b). Antibiotics were added at the following concentrations when

required: 10 μg chloramphenicol (Cm) ml^{-1} , 20 μg erythromycin (Em) ml^{-1} , 10 μg kanamycin (Km) ml^{-1} and 50 μg spectinomycin (Spc) ml^{-1} .

Construction of chromosomal *rrn*-inactivated strains. In order to construct strains harbouring $\Delta rrnA::\text{Spc}^R$ (designated A1) and $\Delta rrnB::\text{Cm}^R$ (designated B1), pDA-Spc and pDB-Cm were linearized with *Nde*I and separately transformed into *Synechococcus* wild-type strain (WT). Since *Synechococcus* contains multiple copies of the chromosome, the transformants containing heterogeneous chromosomal *rrn* operons (i.e. wild-type and inactivated *rrn* operons) were segregated on BG-11 agar containing Spc at 50–150 $\mu\text{g ml}^{-1}$ or Cm at 10–30 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The resulting A1 and B1 strains harbouring homogeneous chromosomal *rrn* operons were transformed with pRN-A or pRN-B to obtain strains A2 ($\Delta rrnA::\text{Spc}^R/\text{pRN-A}$), A3 ($\Delta rrnA::\text{Spc}^R/\text{pRN-B}$) and B2 ($\Delta rrnB::\text{Cm}^R/\text{pRN-B}$). Strain A3 was transformed with *Nde*I-linearized pDB-Cm to obtain strain AB1 ($\Delta rrnA::\text{Spc}^R \Delta rrnB::\text{Cm}^R/\text{pRN-B}$). The resulting strains harbouring homogeneous inactivated *rrn* operon(s) with or without plasmid-borne *rrn* operon are shown in Table 1.

Southern blot analysis of chromosomal *rrn*-inactivated strains. Total DNA of *Synechococcus* was isolated as described by

Table 1. Plasmids and *Synechococcus* strains

Plasmid or strain	Description or genotype	Reference
Plasmids		
pHP45 Ω	Source of Spc^R cassette	Prentki & Krisch (1984)
pUC303	Source of Cm^R cassette	Kuhlemeier <i>et al.</i> (1983)
pDA-Spc	pUC18 containing a 2.0 kb Spc^R cassette flanked by 1.4 kb PCR product (primers AF1 and 16R1) of upstream <i>rrnA</i> and 1.8 kb PCR product (primers 23F2 and 5R1) of 5' end of 5S gene, $\text{Ap}^R \text{Spc}^R$, <i>rrnA::\text{Spc}^R</i>	This work
pDB-Cm	pUC18 containing a 1.0 kb Cm^R cassette flanked by 2.0 kb PCR product (primers BF1 and 16R1) of upstream <i>rrnB</i> and 1.8 kb PCR product (primers 23F2 and 5R1) of 5' end of 5S gene, $\text{Ap}^R \text{Cm}^R$, <i>rrnB::\text{Cm}^R</i>	This work
pKG	<i>E. coli</i> - <i>Synechococcus</i> shuttle vector, Km^R	Chungjatupornchai <i>et al.</i> (1999)
pRN-A	pKG containing a 6.5 kb PCR product (primers AF1 and AR1) of full-length <i>rrnA</i> replacing the β -glucuronidase gene, Km^R , <i>rrnA</i>	This work
pRN-B	pKG containing a 6.3 kb PCR product (primers BF2 and BR1) of full-length <i>rrnB</i> replacing the β -glucuronidase gene, Km^R , <i>rrnB</i>	This work
pKT210	RSF1010-derived broad-host-range plasmid, $\text{Cm}^R \text{Str}^R$ (kindly provided by C. P. Wolk, Michigan State University, USA)	Elhai & Wolk (1988a)
psbV/EmR	Source of Em^R gene (kindly provided by J. J. Eaton-Rye, University of Otago, New Zealand)	Morgan <i>et al.</i> (1998)
pKT-A	pKT210 containing a 6.5 kb PCR product (primers AF1-P and Nos-R) of full-length <i>rrnA</i> including Nos-ter, Cm^R gene replaced by an Em^R gene, $\text{Em}^R \text{Str}^R$, <i>rrnA</i>	This work
pKT-A ^{C2611A}	pKT-A containing C2611A mutation in 23S rRNA gene, $\text{Em}^R \text{Str}^R$, 23S ^{C2611A}	This work
Strains		
WT	Wild-type, <i>Synechococcus</i> PCC 7942 strain R2-Spc, <i>rrnA rrnB</i>	Kuhlemeier <i>et al.</i> (1983)
A1	WT $\Delta rrnA::\text{Spc}^R$	This work
A2	A1/pRN-A	This work
A3	A1/pRN-B	This work
B1	WT $\Delta rrnB::\text{Cm}^R$	This work
B2	B1/pRN-B	This work
AB1	WT $\Delta rrnA::\text{Spc}^R \Delta rrnB::\text{Cm}^R/\text{pRN-B}$	This work
AB2	WT $\Delta rrnA::\text{Spc}^R \Delta rrnB::\text{Cm}^R/\text{pKT-A}$	This work
AB3	WT $\Delta rrnA::\text{Spc}^R \Delta rrnB::\text{Cm}^R/\text{pKT-A}^{\text{C2611A}}$	This work

Draper & Scott (1988). Three micrograms of total DNA was digested with *Pst*I, electrophoresed on agarose gel and transferred to a nylon membrane (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences). Probe I (485 bp) and probe II (490 bp) were amplified using primer sets 16F1 and 16R2; 23F1 and 23R1, respectively (Table 2, Fig. 1), and labelled with digoxigenin using the PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science). The hybridized membrane was treated with antidigoxigenin-alkaline phosphatase Fab fragments and luminescent substrate CSPD as recommended by the manufacturer (Roche Applied Science). The treated membrane was exposed to X-ray film.

Plasmid replacement in the strain with all chromosomal *rrn* operons inactivated. To generate plasmids containing site-directed mutation at nucleotide position C2588, equivalent to C2611 in *E. coli* numbering (hereafter referred to as nt 2611), the procedure was carried out as described in the QuickChange Mutagenesis Kit (Stratagene), using pKT-A as template and appropriate primer sets including CAF and CAR. The mutated C2611A/G/T in the resulting plasmids was confirmed by DNA sequencing. The cargo plasmids pKT-A, pKT-A^{C2611A}, pKT-A^{C2611G} and pKT-A^{C2611T} were separately transferred into strain AB1 by triparental conjugation. Em^R-Km^R conjugants harbouring both cargo plasmid and pRN-B were obtained. Replacement was enforced by segregating the conjugants on BG-11 containing Em to obtain Em^R-Km^S clones harbouring only cargo plasmid but not pRN-B. The resulting clones harbouring pKT-A and pKT-A^{C2611A} were designated AB2 and AB3, respectively. The presence of pKT-A and pKT-A^{C2611A} was confirmed by PCR and RT-PCR. The PCR was carried out using total DNA, with primers 23F3 and 23R3. The RT-PCR was performed essentially as described previously (Chungiatupornchai *et al.*, 2002; Plansangkate *et al.*, 2004). The cDNA of the 23S rRNA gene, synthesized from total RNA with primer 23R3, was used as template for amplification of PCR product using primers 23F3 and 23R3. The resulting PCR and RT-PCR products of 1.6 kb were digested with *Acl*I to generate fragments of 630 and 1002 bp. The 1002 bp fragment was further analysed by *Sau*96I digestion (see Results). The digested DNA was resolved in a 4.5% agarose gel containing ethidium bromide. An

image of the gel was captured with UVP (Life Science). The mutated C2611A of PCR and RT-PCR products was confirmed by automated sequence analysis (Perkin-Elmer, ABI Prism 3100).

RESULTS

Inactivation of *Synechococcus* chromosomal *rrn* operons

We previously identified the upstream and downstream chromosomal flanking sequences of the *rrnA* and *rrnB* operons using the genome walking method. The resulting sequences, identical to parts of currently reported *Synechococcus* genome sequences (AADZ00000000 and NC_006576) (data not shown), were used to design primers for PCR to clone the full-length *rrnA* and *rrnB* operons. The two operons have identical coding sequences containing three rRNA genes (16S, 23S and 5S) and two tRNA genes (for Ile and Ala) (see Fig. 1). *Synechococcus* strains with the chromosomal *rrn* operons inactivated were sequentially constructed (see Methods). The chromosomal *rrnA* and *rrnB* operons were inactivated by deletion-insertion mutagenesis using cassettes encoding *Spc* and *Cm* resistance, respectively (Fig. 1). The resulting *Synechococcus* strains harbouring homogeneous inactivated *rrn* operon(s) with or without plasmid-borne *rrn* operon are shown in Table 1. Southern blot analysis using probes specific to regions of the 16S and 23S genes confirmed that strains with expected genotypes were obtained (Fig. 2). The intensity of hybridized bands was determined by densitometry. The results indicated that the ratio of a chromosomal *rrn* operon (either *rrnA* or *rrnB*) to a plasmid-borne *rrn* operon (either pRN-A or pRN-B)

Table 2. Primers

Locations of *rrn* primers are indicated in Fig. 1. The restriction sites *Eco*RI, *Bam*HI, *Pst*I and *Sal*I are underlined.

Primer	Sequence (5'-3')	Target sequence
16F1	GGTAGGGGTAGCGGGAATTC	16S
16R1	CGGGATCCTGTAGGCAGATTCTACGC	16S
16R2	GTGGGTGCGCTCGTTGCG	16S
23F1	GAGGATTTCGGAATGGGGC	23S
23F2	CGGGATCCTGCGCCGAAATGAACG	23S
23F3	AGGAGGTGGGAGTGCATAGACAACGAG	23S
23R1	CGGCTCATTCTTCAACAGGC	23S
23R3	TTCTCTCCGGTCTCTCGTACTAGGGAG	23S
5R1	CGGAATTCAGAGTGGTTCATACCGCC	5S
AF1	ACGCGTCGACTCAAGATTGCGCGGAC	Upstream of <i>rrnA</i>
AF1-P	AAAACCTGCAGACTCAAGATTGCGCGGAC	Upstream of <i>rrnA</i>
AR1	CGGGATCCGCGAGAGGATTGGCTATTGG	Downstream of <i>rrnA</i>
BF1	AAAACCTGCAGCTGCATTGCTCGGTGCG	Upstream of <i>rrnB</i>
BF2	ACGCGTCGACCGCACAGAGCTGTTTGAC	Upstream of <i>rrnB</i>
BR1	CGGGATCCGGGATAGTAACGCCTTTCCC	Downstream of <i>rrnB</i>
Nos-R	AAAACCTGCAGATCTAGTAACATAGATGAC	Nos-ter in pKG
CAF	CGTGAGACAGTTCGGTCAATATCCGGTGACGG	C2611A mutation
CAR	CCTGCACCGGATATTGACCGAACTGTCTCAGC	C2611A mutation

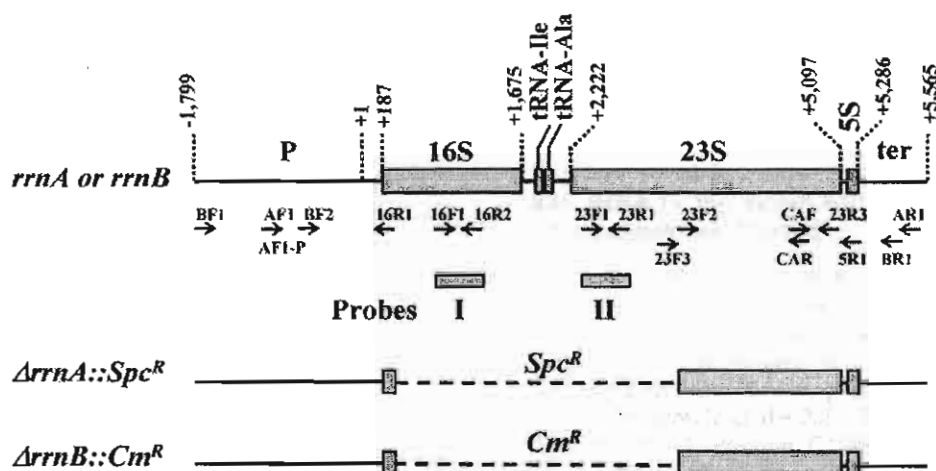


Fig. 1. Deletion mutations introduced into the *Synechococcus* chromosomes. The physical maps of chromosomal *rrn* operons including the promoters (P) and terminator (ter) are shown. The numbers of nucleotides are with respect to the +1 transcription start site of the *rrn* operon. Locations of primers and probes used in this study are indicated. Deletion regions of *rrnA* and *rrnB* operons were replaced with spectinomycin (Spc^R) and chloramphenicol (Cm^R) resistance gene cassettes, respectively.

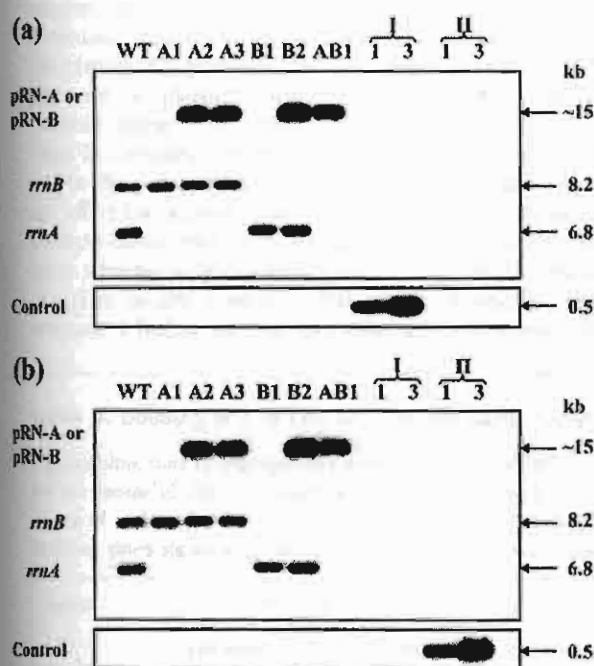


Fig. 2. Southern blot analysis of chromosomal *rrn*-inactivated strains. The total DNA of *Synechococcus* (3 µg) digested to completion with *Pst*I was hybridized with DIG-labelled probes (see Fig. 1). The unlabelled probes at 1 and 3 ng (lanes 1 and 3, respectively) were used as control. (a) Inactivation of the 16S rRNA gene. The DNA was hybridized with probe I. (b) Inactivation of the 23S rRNA gene. Probe I was removed from the membrane shown in (a), and the DNA was rehybridized with probe II.

was 1 : 3 in strains A2, A3 and B2 (Fig. 2). The band intensity ratio of 1 and 3 ng of unlabelled probes used as control was also 1 : 3. We obtained the final strain AB1 with all chromosomal *rrn* operons inactivated but carrying the replaceable multicopy plasmid pRN-B containing a single *rrnB* operon (Fig. 2).

Growth response of *rrn*-inactivated strains on dark/light shift

Strains A1 and B1, harbouring an inactivated *rrnA* or *rrnB* operon respectively, were viable, indicating that the remaining one chromosomal *rrn* operon was enough for cell survival. To investigate the growth response on dark/light shift, exponential cultures were incubated in the dark and then re-exposed to the light. It has been shown that a shift from light to darkness will cause all *Synechococcus* cells to arrive at a common rest point and that upon returning to light, the cells start to grow from the common rest point (Asato, 2003). The lag time that was required to initiate cell growth upon returning to light was determined. The lag time of strains A1 and B1 was 3 h as compared to 2 h for the WT, representing a 50 % increase; however, the presence of plasmid-borne *rrn* operon in strains A2 and B2 restored the lag time to 2 h (Fig. 3). The results indicated that the two chromosomal *rrn* operons were necessary for *Synechococcus* to adapt rapidly for initiating cell growth on dark/light shift.

Effect of *rrn* inactivation on doubling time of cell growth

The *Synechococcus* mutant strains used in this study (Table 1) survived with no apparent deleterious effects. In order to investigate the effect of *rrn* inactivation on cell

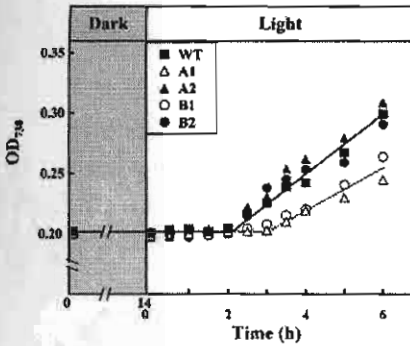


Fig. 3. Growth of chromosomal *rrn*-inactivated strains on dark/light shift. Exponential cultures of strains WT (wild-type), A1 ($\Delta rrnA::Spc^R$), A2 ($\Delta rrnA::Spc^R/pRN-A$), B1 ($\Delta rrnB::Cm^R$) and B2 ($\Delta rrnB::Cm^R/pRN-B$) were incubated in the dark for 14 h and then re-exposed to the light. Cell growth was measured as OD₇₃₀. The data are the means of three independent experiments. The maximum standard deviation was 0.02. At least two strains of each type were tested in each growth condition and found to behave similarly.

growth, the doubling time of the mutant strains was measured. This revealed that inactivation of chromosomal *rrnA* (strain A1) prolonged the doubling time (Table 3). The presence of plasmid-borne *rrnA* (strain A2), but not plasmid-borne *rrnB* (strain A3), restored the doubling time. In contrast, inactivation of chromosomal *rrnB* (strain B1) in the presence of plasmid-borne *rrnB* (strain B2) did not affect the doubling time. Similarly, the presence of only plasmid-borne *rrnB* in strain AB1 prolonged the doubling time, whereas only plasmid-borne *rrnA* in strain AB2 did not. The results suggested that the *rrnA* operon might produce a higher amount of rRNA and tRNA molecules

than the *rrnB* operon. In addition, the doubling time of strain AB3 producing C2611A-mutated 23S rRNA was significantly longer than those of the AB2 and WT strains (Table 3).

Expression of homogeneous C2611A-mutated 23S rRNA in the strain with all chromosomal *rrn* operons inactivated

We have successfully constructed the AB1 strain with all chromosomal *rrn* operons inactivated but carrying a replaceable plasmid pRN-B (Fig. 2). To apply our system for experimental analysis of mutated rRNA, we constructed plasmids containing the mutation at position 2588 with respect to the first nucleotide of the 23S rRNA transcript (Douglas & Doolittle, 1984). Position C2588, equivalent to C2611 of the peptidyltransferase centre in domain V of *E. coli* 23S rRNA, is shown in Fig. 4(a). Plasmids containing wild-type C2611 (pKT-A) or mutated C2611 of the 23S rRNA gene (pKT-A^{C2611A}, pKT-A^{C2611G} and pKT-A^{C2611T}) were transferred separately into strain AB1 by conjugation to replace pRN-B. The resulting *Em*^R-*Km*^S strains are AB2 and AB3, harbouring pKT-A and pKT-A^{C2611A}, respectively. Strains AB2 and AB3 accounted for 35 % of the conjugants. However, attempts to select for an *Em*^R-*Km*^S strain harbouring pKT-A^{C2611G} or pKT-A^{C2611T}, but not pRN-B, were unsuccessful. The presence of wild-type C2611 and C2611A-mutated 23S rRNA was confirmed by PCR, RT-PCR (Fig. 4b, c) and DNA sequencing (data not shown). The results indicated that strains AB2 and AB3 expressed homogeneous wild-type and C2611A-mutated 23S rRNA, respectively.

Growth response of C2611A-mutated 23S rRNA strain on temperature shifts

In order to study the effect of *Synechococcus* C2611A-mutated 23S rRNA on temperature shifts, cell growth of

Table 3. Doubling time of chromosomal *rrn*-inactivated strains

The doubling time of exponentially growing cultures at 30 °C was calculated from OD₇₃₀ data. The data are the means of three independent experiments with standard deviations in parentheses. At least two strains of each type were tested and found to behave similarly. Data marked with an asterisk represent doubling times significantly different from that of the WT strain ($P < 0.01$, two-tailed paired *t* test).

Strain	Chromosomal <i>rrn</i> operon		Plasmid-borne <i>rrn</i> operon	Doubling time (h)
	Inactivated	Functional		
WT	None	<i>rrnA</i> , <i>rrnB</i>	None	13.62 (0.58)
A1	<i>rrnA</i>	<i>rrnB</i>	None	15.61 (0.77)*
A2	<i>rrnA</i>	<i>rrnB</i>	<i>rrnA</i>	13.13 (0.56)
A3	<i>rrnA</i>	<i>rrnB</i>	<i>rrnB</i>	15.06 (0.79)*
B1	<i>rrnB</i>	<i>rrnA</i>	None	14.58 (0.82)
B2	<i>rrnB</i>	<i>rrnA</i>	<i>rrnB</i>	14.18 (0.56)
AB1	<i>rrnA</i> , <i>rrnB</i>	None	<i>rrnB</i>	16.00 (1.31)*
AB2	<i>rrnA</i> , <i>rrnB</i>	None	<i>rrnA</i>	14.62 (0.65)
AB3	<i>rrnA</i> , <i>rrnB</i>	None	<i>rrnA</i> ^{C2611A}	17.36 (1.47)*

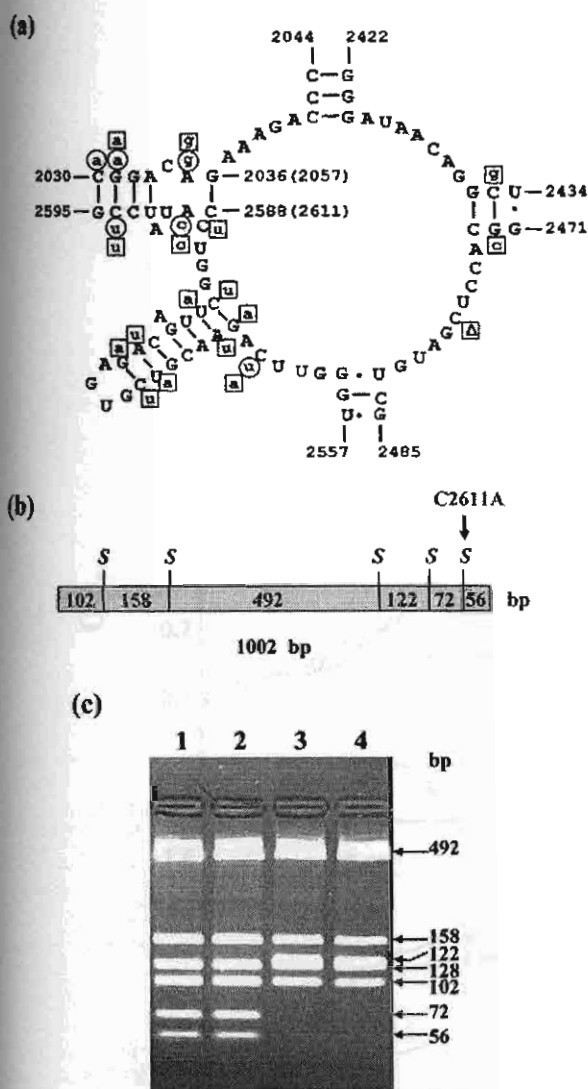


Fig. 4. Analysis of C2611A-mutated 23S rRNA expressed in strain AB3. (a) Secondary structure of the peptidyltransferase centre in domain V of *Synechococcus* 23S rRNA (Douglas & Doolittle, 1984). Positions C2611 and G2057 of the *E. coli* numbering are indicated in parentheses. The circled and boxed nucleotides indicate the sequence polymorphisms of *E. coli* 23S rRNA and *Sacch. cerevisiae* mitochondrial 21S rRNA, respectively. The deletion polymorphism is indicated by a triangle. (b) The *Sau96I* restriction map of the region containing *Synechococcus* C2611. The presence of the C2611A mutation abolishes the *Sau96I* site as indicated by an arrow. (c) Image of a 4.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Lanes 1 and 3 are *Sau96I*-digested PCR products of strains AB2 and AB3, respectively. The PCR products were amplified using total DNA including plasmids as template. Lanes 2 and 4 are *Sau96I*-digested RT-PCR products of strains AB2 and AB3, respectively. First-strand cDNA synthesis was performed using total RNA.

strains AB2 and AB3 was determined. The results revealed that the growth of strain AB3 producing C2611A-mutated 23S rRNA was significantly slower than that of the WT at 30 °C and almost ceased at 16 °C and 45 °C, whereas the growth of strain AB2 producing wild-type 23S rRNA was not significantly different from that of the WT (Fig. 5). The results indicated that C2611A-mutated 23S rRNA confers temperature-sensitive phenotypes in *Synechococcus*.

DISCUSSION

We constructed several strains with the chromosomal *rrn* operons inactivated and harbouring a multicopy plasmid containing a single *rrn* operon. Southern blot analysis revealed that the ratio of a chromosomal *rrn* operon (either *rrnA* or *rrnB*) to a plasmid-borne *rrn* operon (either pRN-A or pRN-B) was 1:3 in strains A2, A3 and B2 (Fig. 2). *Synechococcus* has approximately 10 copies of the chromosome (Binder & Chisholm, 1990; Mori *et al.*, 1996). Thus, the data suggested that there were approximately 30 copies of pRN-A or pRN-B in the cells. It has been shown that there were approximately 30 copies of RSF1010-derived plasmid in cyanobacterial cells (Ng *et al.*, 2000). Therefore, there were approximately 30 copies of the RSF1010-derived plasmids pKT and pKT-A^{C2611A} in strains AB2 and AB3, respectively. The data suggested that there were approximately 20 copies of the *rrn* operons in WT; 10 copies in strains A1 and B1; 40 copies in strains A2, A3 and B2; and 30 copies in strains AB1, AB2 and AB3.

Strains A1 and B1, harbouring an inactivated *rrnA* and *rrnB* operon respectively, survive with no apparent deleterious effects, similar to the findings of Golden *et al.* (1989). Analysis of the growth response on dark/light shift (Fig. 3) revealed that decreased *rrn* copy number (10 copies in strains A1 and B1) increased the lag time required for initiating cell growth upon returning to light, whereas increased *rrn* copy number (40 copies in A2 and B2) restored the lag time but did not achieve faster adaptation than the 20 copies in the WT. The results agree well with the feedback inhibition model in *E. coli*, in which increased *rrn* copy number does not lead to increased rRNA transcription; rRNA synthesis from individual operons is reduced to keep the total rRNA production unchanged (Jinks-Robertson *et al.*, 1983) and depletion of functional *rrn* operons causes increased expression of the remaining intact copies (Condon *et al.*, 1993).

The presence of 10 copies of the *rrnA* operon (strain B1) did not affect the doubling time, whereas the same copy number of the *rrnB* operon (strain A1) increased the doubling time. However, 40 copies of the *rrnB* operon (strain A3) did not restore the doubling time (Table 3). These results suggested that the *rrnA* operon might produce a higher amount of rRNA and tRNA molecules than the *rrnB* operon. The sequences downstream of nt -60, including the core promoter regions of the *rrnA* and *rrnB* operons, are 100% identical (NZ_AADZ00000000 and NC_006576). However, we observed that the upstream sequence of the *rrnA* operon,

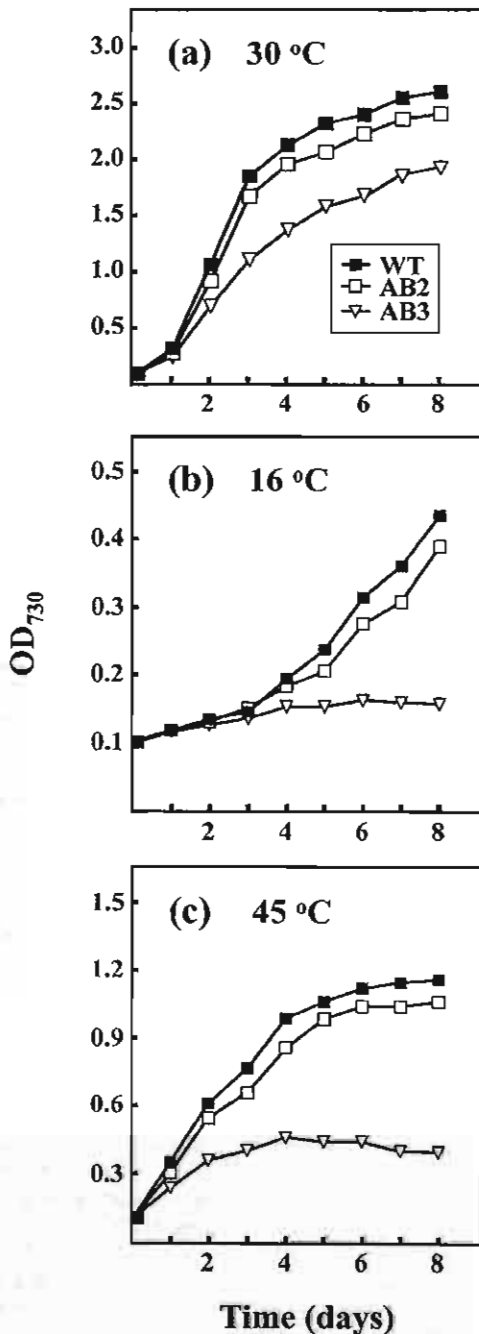


Fig. 5. Effect of C2611A-mutated 23S rRNA on growth following temperature shifts. Exponential cultures of strains WT (wild-type), AB2 ($\Delta rrmA::Spc^R \Delta rrmB::Cm^R/pKT-A$) and AB3 ($\Delta rrmA::Spc^R \Delta rrmB::Cm^R/pKT-A^{C2611A}$) grown at optimal temperature (30 °C) were diluted with BG-11 medium. The diluted cultures were then incubated at 30 °C as control (a), 16 °C (b) and 45 °C (c). Cell growth was measured as OD₇₃₀. The data are the means of three independent experiments. The maximum standard deviations in (a), (b) and (c) were 0.31, 0.06 and 0.14, respectively. At least two strains of each type were tested in each growth condition and found to behave similarly.

but not the *rrnB* operon, includes the sequence 5'-TGCA-TCTCC-AGCA-3' (nt -123 to -111), which is highly homologous to the binding site for the LysR-type transcriptional activator of *Synechococcus* TGCA-N₅-TGCA (Maeda *et al.*, 1998). Whether the presence of this putative binding site for a LysR-type transcriptional activator leads to higher expression of the *rrnA* operon remains to be investigated. *rrn* operons with different promoter strengths have been found in *E. coli* (Condon *et al.*, 1992).

We have successfully constructed the AB1 strain with all chromosomal *rrn* operons inactivated but carrying the replaceable plasmid pRN-B. Using this system, we obtained strains AB2 and AB3 carrying only pKT-A and pKT-A^{C2611A}, respectively. However, attempts to obtain a strain harbouring only pKT-A^{C2611G} or pKT-A^{C2611T}, but not pRN-B, were unsuccessful. Thus, the mutation C2611G/U in the absence of wild-type 23S rRNA may be lethal to cells. The C2611A-mutated 23S rRNA in strain AB3 prolongs doubling time (Table 3) and confers temperature-sensitive phenotypes at 16 °C and 45 °C (Fig. 5). It has been reported that in *Sacch. cerevisiae*, a single C3993A mutation in the peptidyltransferase region of mitochondrial 21S rRNA confers a cold-sensitive phenotype and blocks the assembly of the 54S ribosomal subunit at 20 °C but not at 32 °C, suggesting that the nucleotide at position 3993 or base pairing between positions 3993 and 1950 may influence the interaction between the rRNA and a ribosome protein (Cui & Mason 1989). Positions C3993 and G1950 are equivalent to C2611 and G2057 of *E. coli* 23S rRNA, respectively. Positions 2611 and 2057 of the peptidyltransferase centre in domain V of *E. coli* 23S rRNA, *Synechococcus* 23S rRNA and *Sacch. cerevisiae* 21S rRNA are shown in Fig. 4(a). Disruption of the 2611–2057 base pair, resulting in disruption of the rRNA structure at the end of the stem preceding the single-stranded portion of the peptidyltransferase region, was found to confer resistance to macrolide antibiotics including Em (Vester & Douthwaite, 2001). However, the mutation C2611A/G/U has little effect on ErmE methylation (Villsen *et al.*, 1999). Mutation at nt 2611 is associated with disparate phenotypes. Our results indicated that C2611G/U-mutated 23S rRNA seems to be lethal to *Synechococcus*, whereas the mutations C2611A/G/U in *Sacch. cerevisiae* mitochondria, C2611G/U in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast, C2611A/G/U in *Streptococcus pneumoniae* and C2611U in *E. coli* cause a different pattern of resistance to macrolide antibiotics (Vester & Douthwaite, 2001; Franceschi *et al.*, 2004). We are not able to determine whether the C2611A-mutated 23S rRNA in AB3 strain confers resistance to Em, since pKT-A^{C2611A} contains an Em^R gene (*ermC*) as a selectable marker.

We have successfully constructed a *Synechococcus* strain for expression of homogeneous engineered rRNA in cyanobacteria; this strain has all chromosomal *rrn* operons inactivated but carries a replaceable multicopy plasmid containing a single *rrn* operon. This system provides potential for the study of the structure and function of rRNA in photoautotrophs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by the Thailand Research Fund (TRF). T. Monshupanee is supported by The Royal Golden Jubilee PhD Scholarship from the TRF. W. Chungjatupornchai is a recipient of the TRF.

REFERENCES

- Asai, T., Zaporozets, D., Squires, C. & Squires, C. L. (1999). An *Escherichia coli* strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: complete exchange of rRNA genes between bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1971–1976.
- Asato, Y. (1998). A light-activated DNA-binding factor stimulates transcription of the *rnaA* operon in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC6301. *Mol Gen Genet* 260, 67–74.
- Asato, Y. (2003). Toward an understanding of cell growth and the cell division cycle of unicellular photoautotrophic cyanobacteria. *Cell Mol Life Sci* 60, 663–687.
- Binder, B. & Chisholm, S. W. (1990). Relationship between DNA cycle and growth rate in *Synechococcus* sp. strain PCC6301. *J Bacteriol* 172, 2313–2319.
- Chernoff, Y. O., Vincent, A. & Liebman, S. W. (1994). Mutations in eukaryotic 18S ribosomal RNA affect translational fidelity and resistance to aminoglycoside antibiotics. *EMBO J* 13, 906–913.
- Chungjatupornchai, W., Senawong, T. & Panyim, S. (1999). Isolation and characterization of *Synechococcus* PCC7942 promoters: tRNA^{pro} gene functions as a promoter. *Curr Microbiol* 38, 210–216.
- Chungjatupornchai, W., Fa-aroonsawat, S. & Panyim, S. (2002). Characterization of regions of the cyanobacterial tRNA^{pro} gene that affect the expression of a beta-glucuronidase reporter gene. *FEMS Microbiol Lett* 211, 57–64.
- Condon, C., Phillips, J., Fu, Z. Y., Squires, C. & Squires, C. L. (1992). Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. *EMBO J* 11, 4175–4185.
- Condon, C., French, S., Squires, C. & Squires, C. L. (1993). Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies. *EMBO J* 12, 4305–4315.
- Cui, Z. & Mason, T. L. (1989). A single nucleotide substitution at the *rib2* locus of the yeast mitochondrial gene for 21S rRNA confers resistance to erythromycin and cold-sensitive ribosome assembly. *Curr Genet* 16, 273–279.
- Douglas, S. E. & Doolittle, W. F. (1984). Complete nucleotide sequence of the 23S rRNA gene of the cyanobacterium, *Anacystis nidulans*. *Nucleic Acids Res* 12, 3373–3386.
- Draper, J. & Scott, R. (1988). The isolation of plants nucleic acids. In *Plant Genetics Transformation and Gene Expression: a Laboratory Manual*, pp. 199–236. Edited by J. Draper, R. Scott, P. Armitage & R. Walden. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Elhai, J. & Wolk, C. P. (1988a). A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* 68, 119–138.
- Elhai, J. & Wolk, C. P. (1988b). Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol* 167, 747–754.
- Franceschi, F., Kanyo, Z., Sherer, E. C. & Sutcliffe, J. (2004). Macrolide resistance from the ribosome perspective. *Curr Drug Targets* 4, 177–191.
- Golden, S. S., Nalty, M. S. & Cho, D. S. (1989). Genetic relationship of two highly studied *Synechococcus* strains designated *Anacystis nidulans*. *J Bacteriol* 171, 24–29.
- Green, R. & Noller, H. F. (1997). Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* 66, 679–716.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580.
- Jinks-Robertson, S., Gourse, R. L. & Nomura, M. (1983). Expression of rRNA and tRNA genes in *Escherichia coli*: evidence for feedback regulation by products of rRNA operons. *Cell* 33, 865–876.
- Kaneko, T., Matsubayashi, T., Sugita, M. & Sugiura, M. (1996). Physical and gene maps of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC6301 genome. *Plant Mol Biol* 31, 193–201.
- Kiss, A., Sain, B. & Venetianer, P. (1977). The number of rRNA genes in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 79, 77–79.
- Kuhlemeler, C. J., Thomas, A. A., van den Ende, A., van Leen, R. W., Borrias, W. E., van den Hondel, C. A. & van Arkel, G. A. (1983). A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plasmid* 10, 156–163.
- LaFauci, G., Widom, R. L., Eisner, R. L., Jarvis, E. D. & Rudner, R. (1986). Mapping of rRNA genes with integrable plasmids in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 165, 204–214.
- Maeda, S., Kawaguchi, Y., Ohe, T. A. & Omata, T. (1998). *cis*-acting sequences required for NtcB-dependent, nitrite-responsive positive regulation of the nitrate assimilation operon in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 180, 4080–4088.
- Morgan, T. R., Shand, J. A., Clarke, S. M. & Eaton-Rye, J. J. (1998). Specific requirements for cytochrome c-550 and the manganese-stabilizing protein in photoautotrophic strains of *Synechocystis* sp. PCC 6803 with mutations in the domain Gly-351 to Thr-436 of the chlorophyll-binding protein CP47. *Biochemistry* 37, 14437–14449.
- Mori, T., Binder, B. & Johnson, C. H. (1996). Circadian gating of cell division in cyanobacteria growing with average doubling times of less than 24 hours. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10183–10188.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Hirose, M., Miyajima, N. & Tabata, S. (1998). CyanoBase, a WWW database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC6308. *Nucleic Acids Res* 26, 63–67.
- Ng, W. O., Zentella, R., Wang, Y., Taylor, J. A. & Pakrasi, H. B. (2000). *phrA*, the major photoreactivating factor in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 codes for a cyclobutane-pyrimidine-dimer-specific DNA photolyase. *Arch Microbiol* 173, 412–417.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920–930.
- Plansangkate, P., Fa-aroonsawat, S., Panyim, S. & Chungjatupornchai, W. (2004). The light-responsive promoter of cyanobacterial ORF76 gene overlaps with the *htpG* terminator. *FEMS Microbiol Lett* 235, 341–347.
- Prentki, P. & Krisch, H. M. (1984). In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29, 303–313.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Tomioka, N. & Sugiura, M. (1984). Nucleotide sequence of the 16S-23S spacer region in the *rnaA* operon from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *Mol Gen Genet* 193, 427–430.
- Tulloch, D. L., Finch, L. R., Hillier, A. J. & Davidson, B. E. (1991). Physical map of the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DL11 and localization of six putative rRNA operons. *J Bacteriol* 173, 2768–2775.
- Vester, B. & Douthwaite, S. (2001). Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1–12.

Villsen, I. D., Vester, B. & Douthwaite, S. (1999). ErmE methyltransferase recognizes features of the primary and secondary structure in a motif within domain V of 23S rRNA. *J Mol Biol* 286, 365–374.

Williams, J. K. (1988). Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol* 167, 766–778.

The light-responsive promoter of cyanobacterial *ORF76* gene overlaps with the *htpG* terminator

Prae Plansangkate, Sirirat Fa-aoonsawat, Sakol Panyim, Wipa Chungiatupornchai *

Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus, Nakornpathom 73170, Thailand

Received 19 April 2004; accepted 7 May 2004

First published online 19 May 2004

Abstract

A *Synechococcus* PCC7942 gene, encoding 76 amino acids of an unknown protein (designated ORF76), is located at the same orientation and downstream of the *htpG* gene. The processed site of ORF76 transcripts is located at position +39 with respect to the true transcription initiation site. The non-*E. coli*⁷⁰-like basal promoter of ORF76 (–51 to –9) is controlled by three *cis*-acting elements: positively acting element (–160 to –86), negative regulatory element (–86 to –51) and light-responsive element (–51 to +63) that, together, respond to high light induction at transcriptional level. The ORF76 gene is expressed as monocistronic transcript. The promoter elements of ORF76 gene overlap with the coding sequence and 3' end formation signal of *htpG* gene.

© 2004 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cyanobacteria; *Synechococcus*; Light-responsive promoter; Promoter–terminator overlap; *htpG* gene; β -glucuronidase

1. Introduction

Cyanobacteria are prokaryotic microorganisms that carry a complete set of genes for higher plant-like oxygenic photosynthesis [1]. More than 160 light-responsive genes have been identified in cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 [2]. However, current knowledge concerning light-responsive promoters of cyanobacteria is still limited. In *Synechocystis* PCC6803, the light-responsive regulators of the *psbAII* gene [3,4], *psbAIII* gene [4], *secA* gene [5], *fedI* gene [6] and random isolated promoter fragments [7] have been characterized. The light-responsive regulators of the *psbAI* [8], *psbAII* [9,10], *psbAIII* [9] and *psbDII* [11] genes of *Synechococcus* PCC7942 have been investigated intensively.

To identify cyanobacterial promoters, distinguishing between the 5' end of mRNAs generated from true transcription initiation sites and those generated by processing is critically important. The tobacco acid py-

rophosphatase treatment method for distinguishing 5' triphosphates (indicating true initiation sites) from 5' monophosphates (indicating processed products) has been used previously in *Enterococcus faecalis* [12] and *Synechococcus* PCC7942 [13].

The organization of 3' end formation signals is especially interesting in area of the genome in which two open reading frames (ORFs) are separated by a short intergenic region, implying compact arrangement of genes in genome. Overlapping of terminator and promoter of two adjacent genes have been reported in *E. coli* [14,15] and yeast [16], but no such report in cyanobacteria.

We previously isolated a strong promoter-active fragment (designated E10), which responds to light intensity in *Synechococcus* PCC7942 but does not function in *E. coli* [17]. Here we characterized the sequences required for basal promoter function and other *cis*-acting regulators of the light-responsive E10 promoter. We demonstrated that the E10 promoter is the regulatory sequence of a gene designated ORF76. The genuine initiated transcript and processed transcript of ORF76 were differentiated. The ORF76 promoter-*htpG* terminator combination was investigated.

* Corresponding author. Fax: +66-2-441-9906.

E-mail address: stwcj@mucc.mahidol.ac.th (W. Chungiatupornchai).

2. Materials and methods

2.1. Strains and growth conditions

Synechococcus PCC7942 strain R2-SPc (hereafter, referred to as *Synechococcus*) [18] was grown in liquid or on solid (1% Difco Bacto Agar) BG-11 medium [19] under low light (LL, 1500 lux, i.e. $19 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) or high light (HL, 5000 lux, i.e. $63 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). *E. coli* strain MC1061 [20] was grown in LB broth or on agar as previously described [21].

2.2. Oligonucleotide sequences

Locations of primers used in deletion analysis are indicated in Fig. 1. The following primers are shown 5' to 3' and the *Sall*, *Bam*HI and *Sma*I sites are underlined:

F2, ACGCGTCGACCCAAAAAGGGTTTGATG-CTG;
F3, CGGGATCCGTTCTAATGCGGTCTTGACG;
F4, ACGCGTCGACCAGTGAAGGGTTTAGGG-GAAC;
F5, CGGGATCCTAGCTATCTCGCCCTCAGACG;
R1, CGGGATCCGAGATAGCTAGGATGACGT-TCTG;
R2, CGGGATCCACCCACACACGAAATGG-ATC.

Primers based on *ORF76* sequence (Fig. 3) are as followed:

ORF76-fwd, TCGCGGCGTCGCATCCCAAGC;
ORF76-rev1, CGCTCTCAGCCCAAGCCCCTCGG;

ORF76-rev5, GGGGGGTATCGCGCAACCACACC;
ORF76-rev6, CAAGGCCATCCCCGCCCCGTAGG.

Primers: Link, GUS-fwd, GUS2, 16S-fwd and 16S-rev2 have been reported previously [13]. The 35-mer RNA oligos and primer ESK were generated as described [13].

2.3. Construction of *E10* fragment deletion plasmids and GUS assay

Plasmid pKG-E10 containing the *E10* promoter-active fragment upstream of the promoterless β -glucuronidase (*GUS*) reporter gene has been reported previously [17]. In order to construct the deletion plasmids, PCR was carried out using pKG-E10 or chromosomal DNA of *Synechococcus* as template with different sets of primers (Fig. 1). The endonuclease digested PCR products were cloned into the corresponding sites located between the transcription-translation terminator signal and upstream of the promoterless *GUS* gene in plasmid vector pKGT [13]. The resulting recombinant plasmids (Fig. 1) purified from *E. coli* MC1061 were transformed into *Synechococcus* as described [18]. *GUS* assay of the transformants was carried out as described previously [13].

2.4. Preparation of total RNA

Total RNA was extracted from *Synechococcus* with Trizol Reagent (Life Technologies, USA). The RNA

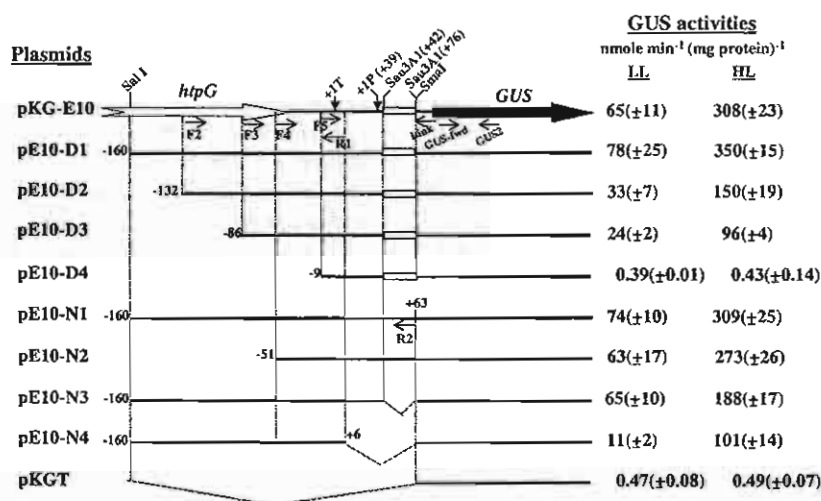


Fig. 1. Deletion analysis of the *E10* promoter-active fragment. The *E10* promoter-active fragment harboring the 3' end of *htpG* gene located upstream of the promoterless *GUS* gene is shown. Locations of primers used in this study are indicated. The PCR products performed with different sets of primers were cloned into pKGT plasmid. The true transcription initiation site and processed site are indicated by +1T and +1P, respectively. The numbers of nucleotide are with respect to +1T. Plasmids pKG-E10, pE10-D1, pE10-D2, pE10-D3 and pE10-D4 harbor the 35 bp (+42 to +76) artifact. In plasmids pE10-N1 and pE10-N2, the 35 bp was replaced with the 22 bp (+42 to +63) located downstream of the *htpG* gene on the *Synechococcus* chromosome (see Fig. 3). The *GUS* activities of *Synechococcus*, harboring the plasmids and grown on solid medium under LL or HL for six days, are the means of the three independent experiments, with standard deviations indicated in parentheses. The figure is not drawn to scale.

was treated with RNase-Free DNaseI (Life Technologies) to remove contaminating DNA.

2.5. Detection of GUS and ORF76 mRNAs using relative reverse transcription (RT)-PCR

The RT-PCR method was carried out essentially as described [13]. In brief, the cDNA of *GUS*, *ORF76* and 16S rRNA transcripts were co-synthesized from 5 µg of total RNA with primers GUS2, ORF76-rev1, 16S-rev2 and ImpromIITM reverse transcriptase (Promega, USA). The reverse transcription reaction mixture was used as a template for PCR. The PCR products were co-amplified using primers: GUS-fwd and GUS2, ORF76-fwd and ORF-rev1, for 25 cycles; primers 16S-fwd and 16S-rev2, for 10 cycles. After PCR amplification, the reaction mixture was resolved in a 3% agarose gel containing ethidium bromide. An image of the gel was captured with UVP (Life Sciences, UK).

2.6. Analysis of ORF76 transcription initiation sites

The procedure used to differentiate genuine initiated transcript from processed transcript of *ORF76* was carried out essentially as described [12,13]. In brief, 10 µg of total RNA from *Synechococcus* grown under standard light intensity (3500 lux, i.e. 43 µE m⁻² s⁻¹) was treated with tobacco acid pyrophosphatase (TAP) (Epicenter Technologies, USA) or incubated without TAP in the presence of RNasin (Promega). Then, the samples were ligated to the 35-mer RNA oligonucleotide using RNA ligase. The treated RNA was annealed with primer ORF76-rev1 and the cDNA was synthesized with SuperScriptII RNaseH-free Reverse Transcriptase (Life Technologies). First PCR was carried out with primers ORF76-rev5 and ESK. The first PCR product was then subjected to nested PCR with primers ORF76-rev6 and ESK. The nested PCR products were then cloned into pGEMT-easy vector (Promega) and the DNA sequences were determined by automated sequence analysis (Perkin-Elmer, ABI, Model 377).

3. Results

3.1. Sequences required for basal promoter function and other cis-acting regulators of the E10 fragment

The E10 strong promoter-active fragment in pKG-E10, isolated previously by transcriptional gene fusion to the promoterless *GUS* reporter gene, responds to light intensity in *Synechococcus* but does not function in *E. coli*. The *GUS* activity of *Synechococcus* harboring pKG-E10 increases about fourfold at HL induction [17].

In order to analyze the E10 promoter region, all promoter inserts were cloned in front of the promoterless *GUS* reporter gene of the pKGT plasmid. The resulting plasmids and their *GUS* activities in *Synechococcus* are shown in Fig. 1. The E10 fragment harbors the 3' end sequence of *htpG* gene (Fig. 1). Analysis of downstream sequence of *htpG* gene on the *Synechococcus* chromosomal DNA (Figs. 1 and 3) revealed that the 35-bp Sau3A1 fragment at position +42 to +76 with respect to the true transcription initiation site of transcript (+1T) is an artifact from cloning of the promoter using Sau3A1 chromosomal fragments [17]. Plasmids pKG-E10, pE10-D1 (insert from -160 to +76), pE10-D2 (-132 to +76), pE10-D3 (-86 to +76) and pE10-D4 (-9 to +76) harbor the 35 bp. In plasmids pE10-N1 (-160 to +63) and pE10-N2 (-51 to +63), the 35 bp was replaced with the 22 bp (+42 to +63) of downstream sequence of *htpG* gene on the chromosome (Figs. 1 and 3). The *GUS* activities of pKG-E10, pE10-D1 and pE10-N1 were not significantly different (Fig. 1). The results indicated that: (i) all of information necessary for transcription and for light responsive expression is located downstream of -160; and (ii) the presence of either the 35-bp fragment or the 22-bp sequence does not significantly affect the *GUS* activity. A smaller fragment required for basal expression of *GUS* gene was found to extend from -51 to -9 (pE10-D4 and pE10-N2, Fig. 1). The presence of region (-86 to -51) upstream from basal promoter decreased *GUS* activity about threefold (pE10-D3 and pE10-N2, Fig. 1). Thus, the region (-86 to -51) harbors a negative regulatory element. The region (-160 to -86) harboring a positively acting element overcome the downregulation of negative regulatory element that resulted in an increase of *GUS* activity about threefold (pE10-D1 and pE10-D3). The region required for HL response of *GUS* activity was found to locate downstream of -51 (pE10-N2). Deletion of 5'UTR (pE10-N3, lacking +42 to +63) did not affect the *GUS* activity at LL, but decreased *GUS* activity at HL to about twofold when compared with that of undeleted control (pE10-N1). The 22-bp (+42 to +63) and 35-bp (+42 to +76) sequences share no significant homology and the presence of either region does not significantly affect the *GUS* activity (pE10-N1 and pE10-D1). Thus, the effect of 5'UTR deletion on *GUS* activity is due to its short distance rather than lacking the specific nucleotide sequence. Further deletion of the 5'UTR region (pE10-N4, lacking +6 to +63) decreased *GUS* activities at both LL and HL, but remained responsive to HL. We observed that deletion of the 5'UTR changes ratio of *GUS* activities at LL to HL. The ratios of *GUS* activities at LL to HL of pE10-N3 (-160 to +42) and pE10-N4 (-160 to +6) were about 1:3 and 1:9, respectively, whereas, those of other constructs were about 1:4 with the exception of those of pE10-D4 and pKGT (Fig. 1).

3.2. Effect of regions of E10 promoter-active fragment on the level of steady-state GUS mRNA

The levels of steady-state *GUS* mRNA of the deletion plasmids were determined using relative RT-PCR, which were co-amplified with 16S rRNA as endogenous control. Since 16S transcript content significantly exceeded that of *GUS*, 16S primers were added in later cycles to achieve similar product yield for exponential phase amplification. Results in Fig. 2(a) showed that RT-PCR

products of all the plasmids increased about two to threefold at HL induction with the exception of those of pE10-D4 and pKGT. Thus, the E10 promoter-active fragment responded to HL at the level of transcription. The levels of steady-state *GUS* mRNA of the plasmids were corresponded to their *GUS* activities with the exception of that of pE10-N4 (Fig. 1). The steady-state *GUS* mRNA of pE10-N4 was not significantly different from that of pE10-N1, however, its *GUS* activity was about three times lower than that of pE10-N1 (Fig. 1).

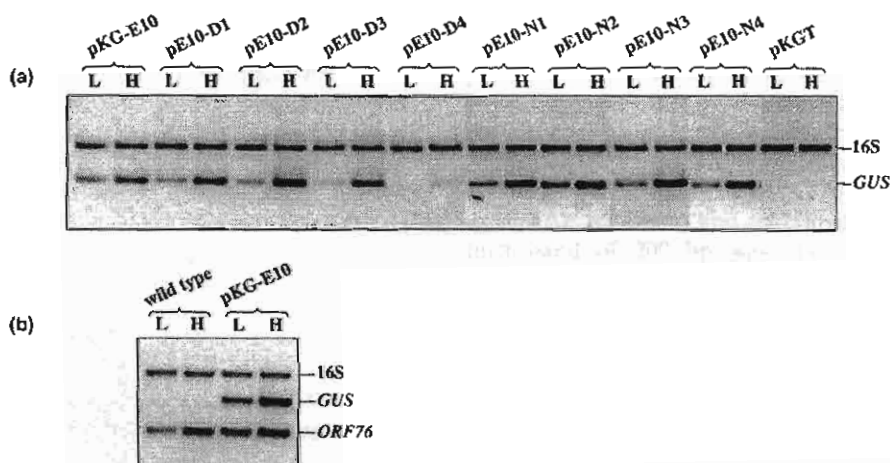


Fig. 2. Detection of *GUS* and *ORF76* mRNAs using RT-PCR. (a) Comparison of steady-state *GUS* mRNA level of deletion mutants. (b) Effects of light intensities on the *GUS* and *ORF76* transcripts. RT-PCR products of *Synechococcus* harboring plasmids are indicated. First strand cDNA synthesis was performed using total RNA extracted from *Synechococcus* grown under low light (L) or high light (H) for 2.5 days. The PCR products were co-amplified: 16S rRNA for 10 cycles; *GUS* and *ORF76* for 25 cycles. The RT-PCR products of 16S rRNA, *GUS* and *ORF76* are 458, 286 and 163 bp, respectively.

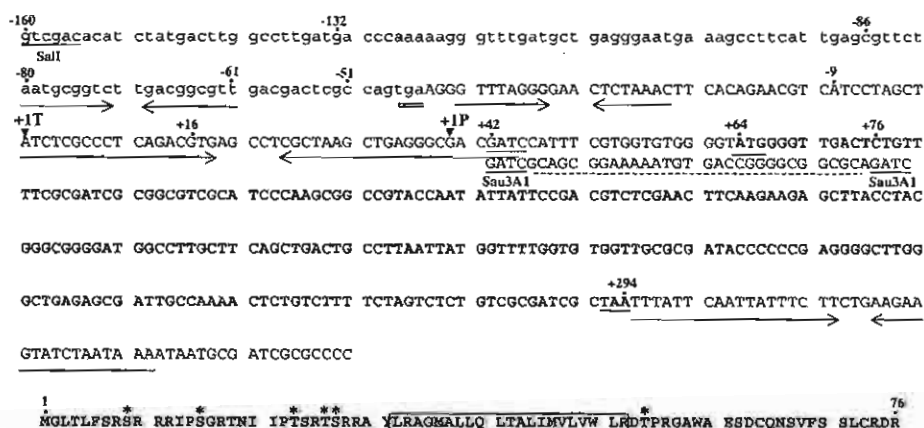


Fig. 3. Nucleotide sequences of the E10 promoter-active fragment and *ORF76*. Nucleotide sequences of the E10 promoter-active fragment and its downstream sequences are shown. The 3' end of *hipG* gene is written in lowercase letters. The stop codon of *hipG* gene is marked by double line. The *ORF76* is in bold. The start and stop codons of *ORF76* are underlined. The true transcription initiation site and processed site of the *ORF76* are indicated by +1T and +1P, respectively. The numbers of nucleotide are with respect to +1T. The inverted repeat sequences are marked by arrows. The 35-bp *Sau3A1* fragment (+42 to +76) below the sequences indicated by dashed lines represents an artifact from cloning. The deduced amino acid sequence of *ORF76* is also shown. The membrane-spanning α -helix region is boxed. The putative phosphorylation sites of protein kinase C are marked by asterisks.

3.3. The E10 light-responsive promoter identified as the promoter of ORF76 gene

In order to identify the gene regulated by the E10 promoter-active fragment, downstream sequence of the *htpG* gene was isolated using genomic walking method (data not shown). Analysis of the resulting nucleotide sequence revealed a possible ORF encoding 76 amino acids of an unknown protein (designated ORF76) located at the same orientation and downstream of the *htpG* gene (Fig. 3).

To investigate whether the *ORF76* gene was expressed and regulated by the E10 light-responsive promoter, the levels of steady-state *ORF76* and *GUS* mRNAs of *Synechococcus* harboring pKG-E10 were determined using relative RT-PCR (Fig. 2(b)). The *ORF76* mRNA was transcribed from chromosomal DNA and the *GUS* mRNA from plasmid pKG-E10. Results showed that the steady-state mRNAs of both

ORF76 and *GUS* genes increased about threefold at HL induction (Fig. 2(b)), suggesting that these two genes respond similarly to HL. Therefore, the E10 light-responsive promoter is the promoter of the *ORF76* gene. Hereafter, the E10 light-responsive promoter is referred to as *ORF76* promoter.

3.4. Differentiation of true transcription initiation site from processed site of ORF76 transcripts

The *ORF76* gene is located at the same orientation and downstream of the *hipG* gene with the intergenic distance of 107 bp (Fig. 3). In order to investigate whether the *ORF76* transcript is controlled by its own promoter or by *hipG* promoter resulting read-through transcripts, we performed experiments to differentiate the genuine initiated transcript from processed transcript of *ORF76*. Fig. 4 shows the PCR products generated by amplification of *ORF76* cDNA synthesized from TAP treatment and untreated total RNA. A distinct band of 200 bp was obtained in TAP-treated sample that was not detected in untreated sample (Fig. 4), indicating the presence of true transcripts. The band of 170 bp that appeared in both TAP-treated and untreated samples (Fig. 4) indicates the presence of processed transcripts. The two PCR products from TAP-treated sample were cloned and the DNA sequences were determined. Sequencing analysis of independent clones harboring the 200-bp PCR product revealed that the true transcription initiation site (designated +1T) is located upstream of *ORF76* coding sequence at A (all five clones), whereas the independent clones harboring the 170-bp PCR product revealed that the processed site (designated +1P) is located at G (+39) (all three clones) downstream of the +1T site (Fig. 3).

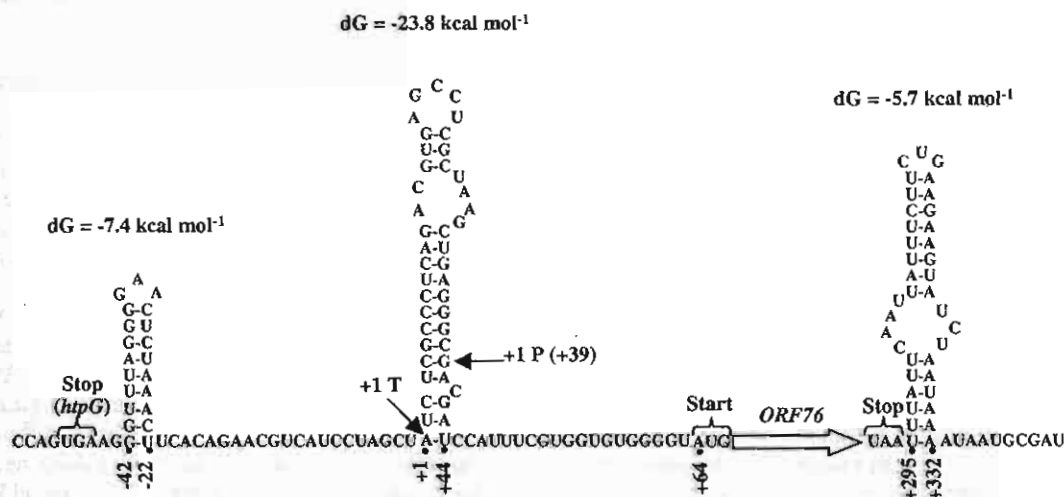
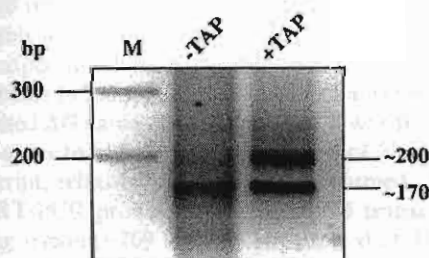


Fig. 5. Predicted secondary structure of the *ORF76* promoter-*hpg* terminator overlapping regions. The sequences of *hpg* and *ORF76* genes are written in the RNA form and their secondary structures are predicted. The ΔG value are indicated. Positions of the true transcription initiation site and processed site are indicated by +1 T and +1 P, respectively. The numbers of nucleotide are with respect to the +1T of *ORF76*.

Therefore, these results confirm that the *ORF76* transcripts are transcribed from its own promoter and not the read-through transcripts from *htpG* gene.

3.5. The *ORF76* promoter overlapping with the *htpG* terminator

Results in this study clearly indicate that the *ORF76* promoter overlaps with the *htpG* terminator (Figs. 1 and 3). To investigate how the two transcription machineries cope with the situation that the *ORF76* and *htpG* genes are packed in promoter–terminator combination, the secondary structure of *htpG/ORF76* mRNA was predicted using the computer program mfold [22,23]. Results (Fig. 5) revealed a putative stem-loop structure terminator (–42 to –22) of *htpG* transcripts with the predicted ΔG value of $-7.4 \text{ kcal mol}^{-1}$. The putative strong stem-loop structure with the predicted ΔG value of $-23.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ was found at region (+1 to +44) including the true transcription initiation site and processed site of *ORF76* transcripts. This strong stem-loop structure was probably a signal for processing of the 5'UTR of *ORF76* transcripts. In addition, the putative stem-loop structure terminator (+295 to +332) of *ORF76* transcripts with the predicted ΔG value of $-5.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ was found.

In order to investigate the location of 3' end of *htpG* transcript, relative RT-PCR was performed. We found that RT-PCR product of *htpG/ORF76* transcripts containing region (–269 to +6) was detected at 25 cycles of amplification, whereas RT-PCR product of region (–269 to +63) or (–51 to +250) was not detectable at 25 cycles but at 35 cycles of amplification (data not shown). Therefore, major amounts of *htpG* transcripts contain the 3' end at least until position +6 and a very small amount that read through the 5' UTR processing site (+39) of *ORF76* transcripts.

4. Discussion

The promoter of *ORF76* gene is composed of four elements: positively acting element (–160 to –86), negative regulatory element (–86 to –51), non-*E. coli* σ^{70} -like basal promoter (–51 to –9) and light-responsive element (–51 to +63) including the 5'UTR of the transcripts. The non-*E. coli* σ^{70} -like basal promoter of *ORF76* gene is in good agreement with the fact that the promoter does not function in *E. coli* [17]. The promoter of *ORF76* gene shares no significant homology to the previously reported promoters [7] that harbor non-*E. coli* σ^{70} -like basal promoters and respond to HL. It has been shown that the light-responsive elements of *psbAII* [9,10], *psbAIII* [9] and *psbDII* [11] genes are located at 5'UTR of the transcripts. We observed that the 5'UTR of *ORF76* transcript harbors sequence, 5'-ctCGcTAAGCTGaGg-3' (+22 to +36), which is highly

homologous to the light-responsive element of *psbDII*, 5'-AACGTTAAGCTGCGA-3' (+11 to +24) [11]. Deletion of the 5'UTR region (pE10-N4, lacking +6 to +63) did not affect the level of steady-state *GUS* mRNA (Fig. 2(a)), but decreased *GUS* activities at both LL and HL (Fig. 1) resulted in an increase of *GUS* activity ratio at LL to HL (1:9). Thus, the 5'UTR homologous region (+22 to +36) is not the light-responsive element of *ORF76* promoter. However, the length of 5'UTR is essential for the HL response of the *ORF76* promoter (pE10-N3 and pE10-N4, Fig. 1).

Downstream sequence of the *htpG* gene in this study is identical to part of the sequences in Accession No. AY157498 that contains a predicted ORF encoding 92 amino acids of an unknown protein (Accession No. AAN46192). This predicted ORF in the database is located at position +16 to +294 with respect to +1T in this study (Fig. 3). However, our results show that the transcripts are processed at 5'UTR and the resulting processed transcripts contain a possible ORF encoding 76 amino acids located at position +64 to +294 (Fig. 3).

The *ORF76* is probably a membrane protein with a single membrane-spanning α -helix as predicted by SOSUI program [24] and could be phosphorylated by protein kinase C family, which are Ser/Thr kinases, as predicted by the GCG program (Madison, WI) (Fig. 3). It is possible that *ORF76* protein is involved in signal transduction in cyanobacteria.

The transcription initiation sites of *GUS* transcripts from pKG-E10 at LL and HL, previously determined using 5' Rapid amplification of cDNA ends PCR (5'RACE-PCR) method, are identical [25] and differentiated as the processed site in this study. The true transcription initiation site of *GUS* transcripts is not detected with the 5'RACE-PCR method. The processing of 5'UTR of *ORF76* still occurred, although the sequence downstream of the stem-loop structure (+1 to +44) was replaced with the 35 bp and *GUS* gene (pKG-E10, Fig. 1) [25]. Thus, the processing of 5'UTR of *ORF76* transcripts is based on the stem-loop structure (+1 to +44), not its downstream sequence.

The elements specifying 3' end formation in the *htpG* gene and those needed for initiation of transcription of *ORF76* gene overlap. The stem-loop structure (+1 to +44) is probably a signal for processing of 5'UTR of *ORF76* and 3' end of *htpG* transcripts. The presence of both stem-loop structure terminator (–42 to –22) and the processing signal (+1 to +44) on the *htpG* transcripts probably ensures efficient transcription termination. However, the 3' end terminator of *htpG* transcripts is not absolutely effective, resulting in a very small amount of *htpG* read-through transcripts.

The stem-loop structures immediately downstream of *htpG* (–42 to –22) and *ORF76* (+295 to +332) coding regions, possibly involved in rho-independent transcription termination, are not followed by U-trails. In the

Synechococcus PCC6803 genome, only 22.3% of genes contain putative stem-loop structure terminator downstream of coding regions. Interestingly, 55.8% of these structures are not followed by a discernible U-trail [26].

In the genomes of *Synechococcus* PCC7942 [e.g. Accession No. AY157498 and U30252] and *Synechocystis* PCC6803 [1], we observed several predicted ORFs have short intergenic sequences (less than 100 bp) which may result in overlapping of terminators and promoters. In addition, overlapping terminators of upstream genes and coding sequence of downstream genes were observed. The sum of the sequences coding for potential protein genes occupies 87% of the genome length [27], implying compact arrangement of genes in *Synechocystis* PCC6803 genome. The observed compactness of *Synechococcus* PCC7942 and *Synechocystis* PCC6803 genomes suggests that overlapping between gene ends may be a common event for cyanobacteria.

Acknowledgements

This work was supported in part by The Thailand Research Fund (TRF). P. Plansangkate is supported by The PhD-MD Program of Mahidol University. S. Panyim was a TRF Senior Research Scholar. W. Chungjaturpornchai was a recipient of TRF.

References

- [1] Nakamura, Y., Kaneko, T., Hirose, M., Miyajima, N. and Tabata, S. (1998) CyanoBase, a www database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Nucl. Acids Res.* 26, 63–67.
- [2] Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A. and Ikeuchi, M. (2001) DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell* 13, 793–806.
- [3] Solih, G.F. and Jansson, C. (1997) Activation of the silent *psbAI* gene in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6803 produces a novel and functional D1 protein. *Plant Cell* 9, 869–878.
- [4] Mohamed, A., Eriksson, J., Osiewacz, H.D. and Jansson, C. (1993) Differential expression of the *psbA* genes in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Mol. Gen. Genet.* 238, 161–168.
- [5] Mazouni, K., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C. and Chauvat, F. (1998) Promoter element spacing controls basal expression and light inducibility of the cyanobacterial *secA* gene. *Mol. Microbiol.* 30, 1113–1122.
- [6] Mazouni, K., Domain, F., Chauvat, F. and Cassier-Chauvat, C. (2003) Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 49, 1019–1029.
- [7] Marraccini, P., Cassier-Chauvat, C., Bulteau, S., Chavez, S. and Chauvat, F. (1994) Light-regulated promoters from *Synechocystis* PCC6803 share a consensus motif involved in photoregulation. *Mol. Microbiol.* 12, 1005–1012.
- [8] Nair, U., Thomas, C. and Golden, S.S. (2001) Functional elements of the strong *psbAI* promoter of *Synechococcus elongatus* PCC7942. *J. Bacteriol.* 183, 1740–1747.
- [9] Li, R. and Golden, S.S. (1993) Enhancer activity of light-responsive regulatory elements in the untranslated leader regions of cyanobacterial *psbA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11678–11682.
- [10] Li, R., Dickerson, N.S., Mueller, U.W. and Golden, S.S. (1995) Specific binding of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 proteins to the enhancer element of *psbAI* required for high-light-induced expression. *J. Bacteriol.* 177, 508–516.
- [11] Anandan, S. and Golden, S.S. (1997) *cis*-Acting sequences required for light-responsive expression of the *psbDII* gene in *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *J. Bacteriol.* 179, 6865–6870.
- [12] Bensing, B.A., Meyer, B.J. and Dunny, G.M. (1996) Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7794–7799.
- [13] Chungjaturpornchai, W., Fa-aaronsawat, S. and Panyim, S. (2002) Characterization of regions of the cyanobacterial tRNA^{Pro} gene that affect the expression of a β -glucuronidase reporter gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 57–64.
- [14] Grundstrom, T. and Jaurin, B. (1982) Overlap between *ampC* and *frd* operons on the *Escherichia coli* chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1111–1115.
- [15] Bogner, A., Pyne, C., Yu, M. and Basi, G. (1989) Transcription of the *folC* gene encoding folylpolyglutamate synthetase-dihydrofolate synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 1854–1861.
- [16] Aranda, A., Perez-Ortin, J.E., Moore, C. and del Olmo, M. (1998) The yeast *FBPI* poly(A) signal functions in both orientations and overlaps with a gene promoter. *Nucl. Acids Res.* 26, 4588–4596.
- [17] Chungjaturpornchai, W., Senawong, T. and Panyim, S. (1999) Isolation and characterization of *Synechococcus* PCC7942 promoters: tRNA^{Pro} gene functions as a promoter. *Curr. Microbiol.* 38, 210–216.
- [18] Kuhlemeier, C.J., Thomas, A.A., van der Ende, A., van Leen, R.W., Borrias, W.E., van den Hondel, C.A. and Arkel, G.A. (1983) A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plasmid* 10, 156–163.
- [19] Williams, J.G.K. (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Meth. Enzymol.* 167, 766–778.
- [20] Casadaban, M.J. and Cohen, S.N. (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138, 179–207.
- [21] Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [22] Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.* 31, 3406–3415.
- [23] Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M. and Turner, D.H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 288, 911–940.
- [24] Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. and Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14, 378–379.
- [25] Wongsiriroj, N. (2001) Characterization of light-regulated promoter from *Synechococcus* PCC7942. M.Sc. thesis, Mahidol University, Thailand.
- [26] Unniraman, S., Prakash, R. and Nagaraja, V. (2002) Conserved economics of transcription termination in eubacteria. *Nucl. Acids Res.* 30, 675–684.
- [27] Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3, 109–136.