

A Protease-Based System to Release Protein from the Surface of *Escherichia coli*

Un système à base de protéase pour libérer les protéines de la surface d'*Escherichia coli*

Mars Wichmann-Young^{1*}, Kyle Tomaro¹, François-Xavier Campbell-Valois¹

1. University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada

*Corresponding author. Email: mwich016@uottawa.ca

Abstract | Résumé

We are developing a novel secretion system that uses two autotransporter constructs, which self-transport their passenger domain cargo across the outer membrane, to transport and cleave a protein of interest (POI). The tobacco etch virus protease (TEVp) is transported to the surface by the *E. coli* autotransporter protein YfaL. Here, it cleaves a POI from a second autotransporter construct, facilitating its secretion. Currently, premature cytosolic cleavage prevents efficient secretion. In previous work, the araBAD promoter system and theophylline riboswitch were added to allow the POI to reach the cell surface before induction of the TEVp construct. While this strategy yielded a tightly inducible system, it did not prevent premature cleavage. Therefore, we sought additional strategies to reduce cytosolic cleavage.

In this project, we implemented solutions to this challenge by controlling cytosolic expression, stability, and activity. First, the TEVp construct was expressed in a lower copy plasmid, pUdO4s. From this, we first added a C-terminus proteolysis tag to reduce the half-life of the protein. In *E. coli*, this tag is added to truncated proteins by the *ssrA* transcript, facilitating recognition and degradation by intracellular proteases. This reduces cytosolic stability and concentration, favouring surface-bound TEVp.

We expressed these constructs in *E. coli* and measured relative protein expression and presence of cleavage products in comparison to previous work. As expected, we observed a significant reduction in the expression of membrane-bound TEVp in the new constructs. While premature cleavage still occurred in the original construct, presence of cleavage products was minimal in the current strain, NEBExpress Iq, and little to none was present pre- or post-induction in either novel construct. This warrants further investigation into factors influencing the formerly observed premature cleavage, as well as the apparent lack of adequate cell surface-level protease activity.

Nous développons un nouveau système de sécrétion utilisant deux constructs d'autotransporteurs, qui transportent elles-mêmes leur domaine passager transporté à travers la membrane externe, afin de transporter et de cliver une protéine d'intérêt (PI). La protéase du virus de la gravure du tabac (TEVp) est transportée à la surface par la protéine autotransporteuse YfaL d'*Escherichia coli*. À cet endroit, elle clive une PI provenant d'une deuxième construction d'autotransporteur, facilitant ainsi sa sécrétion. Actuellement, un clivage cytosolique prématuré empêche une sécrétion efficace. Dans des travaux précédents, le système de promoteur araBAD et le riborégulateur à théophylline ont été ajoutés afin de permettre à la PI d'atteindre la surface cellulaire avant l'induction de la construction TEVp. Bien que cette stratégie ait permis d'obtenir un système à induction étroitement contrôlée, elle n'a pas empêché le clivage prématuré. Nous avons donc recherché des stratégies supplémentaires pour réduire le clivage cytosolique.

Dans ce projet, nous avons mis en œuvre des solutions à ce problème en contrôlant l'expression, la stabilité et l'activité cytosoliques. Premièrement, la construction TEVp a été exprimée dans un plasmide à faible nombre de copies, pUdO4s. À partir de celui-ci, nous avons d'abord ajouté une étiquette de dégradation en C-terminus afin de réduire la demi-vie de la protéine. Chez *Escherichia coli*, cette étiquette est ajoutée aux protéines tronquées par le transcrit *ssrA*, facilitant leur reconnaissance et leur dégradation par les protéases intracellulaires. Cela réduit la stabilité et la concentration cytosoliques, favorisant la TEVp liée à la surface.

Nous avons exprimé ces constructions chez *Escherichia coli* et mesuré l'expression protéique relative ainsi que la présence de produits de clivage en comparaison avec les travaux précédents. Comme prévu, nous avons observé une réduction significative de l'expression de la TEVp liée à la membrane dans les nouvelles constructions. Bien qu'un clivage prématuré se produisait encore dans la construction originale, la présence de produits de clivage était minimale dans la souche actuelle, NEBExpress Iq, et peu ou aucun produit n'était présent avant ou après l'induction dans les deux nouvelles constructions. Cela justifie des recherches supplémentaires sur les facteurs influençant le clivage prématuré précédemment observé, ainsi que sur le manque apparent d'une activité protéasique suffisante au niveau de la surface cellulaire.