التنسيل والتعبير البروتيني لمورثة بيبتيداز الإشارة (النمط I) من السلمونيلا التيفية

ميرنا برصوم[1] و ابتسام حمد[2] و بسام البلعة[3]

[1] قسم علم الحياة النباتية ــ كلية العلوم ــ جامعة دمشق ــ سورية
[2] قسم العلوم البيئية ــ كلية العلوم ــ جامعة دمشق ــ سورية
[3] قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية ــ هيئة الطاقة الذرية السورية ــ سورية

تاريخ الإيداع 2011/07/13
قبل للنشر في 2011/10/17

الملخّص

صُخّمت مورثة ***lepB*** المرمزة لأنزيم بيبتيداز الإشارة (النمط I) بوساطة التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR باستخدام جينوم السلمونيلا التيفية كقالب، صمّم زوج من المرئسات النوعية لهذه المورثة يحويان على موقعي التقييد لأنزيمي BamHI وNdeI، هضمت كل من المورثة ***lepB*** (974 bp) وبلاسميد التعبير البروتيني pET15b بأنزيمات التقييد السابقة. ثمّ أدخلت المورثة ضمن البلاسميد، ثمّ حصلنا على البلاسميد المؤشب pET15b/***lepB*** الذي أُدخل ضمن النظام التعبيري لجراثيم الإشيريشيا الكولونية ***E.coli*** BL21 (DE3). عُبّر عن هذه المورثة بوساطة التحريض بالـ IPTG. كما نُقّي هذا البروتين المؤشب باستخدام كروماتوكرافيا الألفة.

الكلمات المفتاحية: السلمونيلا التيفية، بيبتيداز الإشارة (النمط I)، PCR، تنسيل، تعبير بروتيني.

Cloning and expression of type I signal peptidase gene from *Salmonella typhi*

M. Barsoum[(1)]; I. Hamad[(2)] and B. Al Balaa[(3)]

[(1)] **Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria**
[(2)] **Department of Ecology , Faculty of Sciences, Damascus University, Syria**
[(3)] **Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Syria.**

Received 13/07/2011
Accepted 17/10/2011

ABSTRACT

The *lepB* gene encoding type I signal peptidase enzyme was amplified by PCR using extracted *Salmonella typhi* genomic DNA as a template, A primer pair were designed from this gene containing restriction sites of BamHI and NdeI. The gene and the expression vector pET15b were digested with the previous restriction enzymes, the gene was then inserted into the vector to construct the recombinant vector pET15b/*lepB* which was transformed into *E.coli* BL21 (DE3), this gene was expressed by IPTG induction. The recombinant protein was purified with chromatoghraphy affinity.

Key words: *Salmonella typhi*, Type I signal peptidase, PCR, cloning, Expression.

المقدمة

تُصنَّع البروتينات المفرزة إلى الطريق الإفرازي العام جميعها (سواء عند حقيقيات النوى eukaryotes أو طلائعيات النوى prokaryotes) مع سلسلة بيبتيدية إضافية في النهاية الأمينية هي بيبتيد الإشارة signal peptide (1)، وهي بحاجة لهذا البيبتيد لكي تتوجه إلى المكان الصحيح (2)، ولكن عندما تصل إلى مكانها ولكي تصبح البروتينات ناضجة يجب أن يُزال بيبتيد الإشارة، ويجري ذلك بوساطة أنزيمات بيبتيداز الإشارة. توجد ثلاثة أنماط من هذه الأنزيمات عند الجراثيم بشكل عام وهي:

أنزيم بيبتيداز الإشارة I (signal peptidase I) وهو مسؤول عن إزالة بيبتيد الإشارة (signal peptide) من معظم البروتينات غير الناضجة المفرزة الأساسية (باستثناء البروتينات الدهنية وبروتينات البيللين) (15). وتُفرز هذه البروتينات بوساطة الطريق الإفرازي العام General Secretion Pathway (GSP) أو الطريق الإفرازي توين أرجينين Twine Arginine Translocation (Tat) (3).

بيبتيداز الإشارة II (signal peptidase II) وهو مسؤول بشكل خاص عن إزالة بيبتيد الإشارة signal peptide من البروتينات الدهنية غير الناضجة (4).

بيبتيداز الإشارة III (signal peptidase III) وهو متخصص بشكل كبير في إزالة بيبتيد الإشارة من بروتينات البيللين غير الناضجة.

وقد أكدت الدراسات المعتمدة على إحداث طفرات في المورثات المرمزة لهذه الأنماط من أنزيمات بيبتيداز الإشارة أنّ أنزيم بيبتيداز الإشارة من النمط I مهم لحياة الخلية الجرثومية، بينما النمطان II وIII غير مهمين لحياة الجراثيم إذ يمكنها الاستمرار في الحياة عند إحداث الطفرة بهما (5).

أنزيم بيبتيداز الإشارة من النمط I هو أنزيم غشائي متكامل (14)، يتكون عند الجراثيم سالبة الغرام من قطعتين من النهايات الأمينية التي توجد ضمن الغشاء، وقسم سيتوبلازمي صغير، ويشكل عروة صغيرة في السيتوبلازم لم تعرف وظيفتها حتى الآن، هذا فضلاً عن النهاية الكربوكسيلية الضخمة التي تتضمن الموقع الفعّال (3). المداد الذي يعمل عليه أنزيم بيبتيداز الإشارة من النمط I هو البروتينات الحاوية على بيبتيد الإشارة الذي يسمى leader/signal peptide وهي بروتينات غير ناضجة (17)، يتكون بيبتيد الإشارة من 15 – 40 حمضاً أمينياً، وتقسم هذه السلسلة البيبتيدية إلى ثلاثة أقسام وهي: منطقة مشحونة إيجاباً N-region ويبلغ طولها 1– 5 أحماض أمينية، ومنطقة كارهة للماء H-region ويبلغ طولها 7 – 15 حمضاً أمينياً، هذا فضلاً عن منطقة قطبية معتدلة C-region يبلغ طولها 3 - 7 أحماض أمينية. إنّ كلاً من المناطق H وN ضرورية لنقل

صحيح وفعال للبروتين إلى المكان الموجه له في حين المنطقة C مخصصة لتحديد منطقة القطع بوساطة أنزيم بيبتيداز الإشارة signal peptidase (6).

هدف هذا البحث إلى تنسيل مورثة الـــ *lepB* مـــن جينـــوم الـــسلمونيلا التيفيـــة *Salmonella typhi* أول مرة، والتي يبين تسلسلها الافتراضي الموجود في بنك المعلومات أنّها ترمز أنزيم بيبتيداز الإشارة (النمط I)، ومن ثمّ الحصول على بروتين نقـــي ســـيكون هدفاً لدراسات مستقبلية عديدة. هذا فضلاً عن أنّ جراثيم الـــسلمونيلا التيفيـــة هـــي مـــن الجراثيم الممرضة التي تسبب للإنسان الحمى التيفية، ومن الممكن أيضاً الاستفادة من هذا البروتين في دراسات مستقبلية تتعلق بدراسة استجابته المناعية.

مواد البحث وطرائقه

السلالات الجرثومية والبلاسميدات:

استنبتت جراثيم السلمونيلا التيفية المعزولة مـــن الـــدجاج والمحفوظـــة فـــي دائـــرة الميكروبيولوجيا والمناعيات في قسم التقانة الحيوية (هيئة الطاقة الذرية الـــسورية). هـــذا فضلاً عن تهيئة كل من جـــراثيم *E.coli* DH10B (Gibco BRL) والـــــ *E.coli* BL21 (DE3) (Novagen) كيميائياً لاستخدامهما من أجل التنسيل والتعبير البروتينـــي لمورثـــة *lepB* على التتالي.

استُخدم بلاسميد pET15b (Novagen, Madison, WI) في التنسيل والتعبير.

عزل مورثة *lepB* المرمزة لأنزيم بيبتيداز الإشارة (النمط I):

إنّ تقانات البيولوجيا الجزيئية المتبعة تمت وفقاً لـــــ Sambrook *et al*., 1989 (18). حيث جرى استخلاص جينوم السلمونيلا التيفية وتنقيتـــه باســـتخدام Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) ومن ثمّ قيس تركيز الدنا الجينومي المنقى. عُزلـــت مورثة الـــ *lepB* المرمزة لأنزيم بيبتيداز الإشارة (النمط I) بوساطة التفاعـــل السلـــسلي للبوليميراز PCR باستخدام زوج من المرئسات النوعية صُمّمت بالاعتماد على التسلـــسل النكليوتيدي لمورثة *lepB* المأخوذ من البنك الجينومي للسلمونيلا التيفية (السلالة CT18)، وبعد إضافة تسلسل مواقع التقييد إلى الأنزيمات المستخدمة في طرف كل منها. تسلـــسل المرئسة الأماميـــة هـــو`5-TAATAT<u>CATATG</u>GCGAACATGTTTG-3`، وهـــذه المرئسة تحتوي على تسلسل موقع التقييد لأنزيم NdeI (أُشير إليه بخط تحته). وتسلـــسل المورثة العكـــسية هـــو `5-ATATAT<u>GGATCC</u>TTAGTGAATCGCC-3`، وهـــذه المرئسة تحتوي موقع التقييد لأنزيم BamHI (أُشير إليه بخط تحته). وقد اســـتُخدم أنـــزيم البوليميراز عالي الدقـــة(Phusion High-Fidelity DNA Polymerase kit (Finnzymes

لتجنب حدوث أي خطأ في تسلسل المورثة في أثناء عملية التضخيم. وقد احتوى أنبوب تفاعل التضخيم المكونات الآتية: 0.5 ميكرولتر من أنزيم High fidelity DNA polymerase (phusion)، 5 ميكرولترات HF Buffer 5x، 0.5 ميكرولتر dNTPs (0.2 mM)، 1 ميكرولتر من كل من المرئسة الأمامية والعكسية (25 P mol/ µl)، 1 ميكرولتر من الدنا الجينومي المستخلص من السلمونيلا التيفية (300 ng/ µl)، 16 ميكرولتراً من الماء H_2O وذلك لاتمام مزيج التفاعل إلى 25 ميكرولتراً. وأُخضع المزيج إلى المراحل الآتية: التمسخ الأوليInitial Denaturation في الدرجة 98 ْم مدة 30 ثانية، يتبع ذلك بتكرار دورة مؤلفة من ثلاث مراحل أساسية 35 مرة، وهذه المراحل هي: 1- التمسخ Denaturation في الدرجة 98 ْم مدة 10 ثوان. 2- الالتحام Annealing بالدرجة 55 ْم مدة 30 ثانية. 3- الاستطالة Extension بالدرجة 72 ْم مدة دقيقة، ينتهي التفاعل بدورة أخيرة في الدرجة 72 ْم مدة 10 دقائق. جرى بعدها ترحيل ناتج التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR على هلامة الأغاروز 0.8% فضلاً عن ترحيل واسم الدنا المعياري.

تنسيل المورثة:

عُوملت كل من مورثة الـ *lepB* والبلاسميد pET15b بوساطة أنزيمات التقييد BamHI وNdeI (Takara)، ثمّ جرى ترحيل كل منهما على هلامة الأغاروز (agarose gel) 0.8% وقصهما من الهلامة وتنقيتهماً باستخدام Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) وقياس تركيزهما. ومن ثمّ رُبطت المورثة مع البلاسميد باستخدام أنزيم الربط ligase T4 (Fermentas). أجري إدخال البلاسميد المؤشب pET15b/*lepB* إلى خلايا التنسيل *E.coli* DH10B التي تمّ تهيئتها كيميائياً لاستقبال البلاسميد بوساطة تقانة التحول الجرثومي الكيميائي. نُقّيت الخلايا الحاوية على البلاسميد المؤشب للحصول على كمية كبيرة منه، ومن ثمّ استُخلص البلاسميد باستخدام Plasmid midi kit (Qiagen) وقيسَ تركيزه. وسُلسلت مورثة الـ *lepB* المُنسلة ضمن بلاسميد الـ pET-15b باستخذام جهاز تحديد السمات(applied bio system ABI 310)، ثم قُورنَ ناتج سلسلة الـ DNA بالتسلسل الموجود في قاعدة بيانات جراثيم السلمونيلا التيفية (NC_003198.1).

التعبير عن البروتين المؤشب وتنقيته:

أُدخل البلاسميد الحاوي على مورثة الـ *lepB* ضمن الـ *E.coli* BL21 (DE3) بهدف التعبير عن البروتين المرغوب فيه. إذ نُمّيت في البداية المستعمرات الناتجة في 3 مل من وسط LB-Amp مدة 16 ساعة بالدرجة 37 ْم، ومن ثمّ أضيف 500 ميكرولتر من المزرعة إلى دورق يحتوي 50 مل من وسط LB-Amp وحضن بالدرجة 37 ْم حتى الوصول إلى الكثافة الضوئية Optic Density بين 0.5 و0.7 على طول الموجة 600

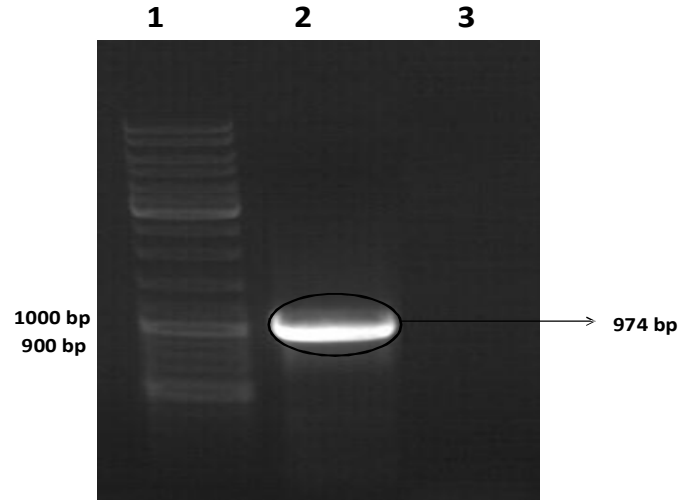
(OD_{600})، أُضيف عندها 25 µl من الإيزوبروبانول بيتا دي ثيوغالاكتوزيداز Isopropyl b-D-thiogalactoside (IPTG 100mM) وحُضِنَ بالدرجة 37 ْم مدة 4 ساعات.

جرى في البداية لاستخلاص البروتين تثفيل المزرعة الجرثومية التي عبرت عن البروتين المؤشب ومن ثمّ حُلَّ الراسب بالمحلول الواقي الفوسفاتي Phosphate Buffered Saline (PBS)، حُطّمت بعدها الخلايا بجهاز التحطيم ومن ثمّ ثُفلت بسرعة 12000 rpm مدة 20 دقيقة فحصلنا على الطافي الحاوي على البروتين المرغوب فيه، أضيف إلى الطافي الذي تمّ الحصول عليه محلول Imidazole 20 mM ومحلول 8X phosphate buffer. أصبح بعدها الطافي جاهزاً للتنقية باستخدام عمود كروماتوغرافيا الألفة للهيستيدين، فحُمّل 10 مل من هذا الطافي الذي يحتوي على مجموعة من البروتينات فضلاً عن البروتين المؤشب المرغوب فيه، الذي رُشِّحَ على عمود الألفة بمعدل تدفق 1.0ml/min. جرى بعد ذلك غسل العمود بوساطة محلول الـ binfing buffer (H_2O، Imidazole 20 mM، 8X phosphate buffer) الذي يحتوي على تركيز منخفض من الإيميدازول من أجل التخلص من البروتينات غير المرتبطة بالعمود. وفي النهاية فُصِلَ البروتين المؤشب المرتبط المرغوب فيه باستخدام محلول Elution buffer (H_2O، Imidazole 500 mM، 8X phosphate buffer).

النتـــائـــج

عزل مورثة الـــ *lepB*:

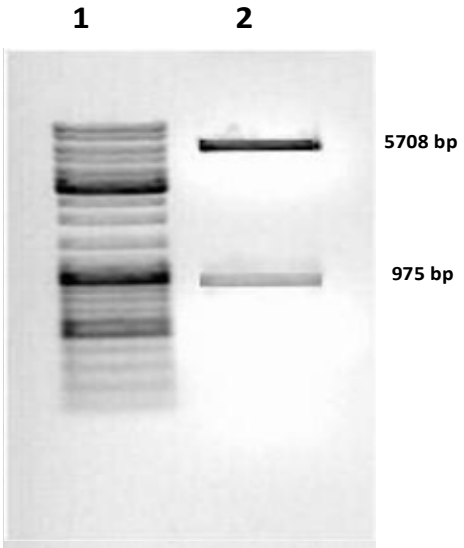
بعد استخلاص الدنا الجينومي من السلمونيلا التيفية، عزلت مورثة الـ *lepB* بوساطة التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR وباستخدام المرئسات النوعية التي صُمّمت لهذا الغرض في هذا العمل، وقد أظهر الرحلان الكهربائي لناتج التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR على هلامة الأغاروز 0.8% المصبوغة بالإيتيديوم بروميد ومن ثمّ أظهرت الهلامة بالأشعة فوق البنفسجية أنّ طول الشدفة الناتجة الممثلة للمورثة المرغوب فيها هو 974 زوجاً نكليوتيدياً ((974 base pair (bp)) (الشكل 1). نُقّيت المورثة من الهلامة باستخدام Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (promega). وبهذا فقد تمّ تضخيم هذه المورثة من جينوم السلمونيلا التيفية أول مرة، وكان ناتج التضخيم 974 زوجاً نكليوتيدياً ((974 base pair (bp)).



الشكل (1) صورة لهلامة الأغاروز 0.8% باستخدام الأشعة فوق البنفسجية لناتج تضخيم مورثة الـ *lepB* (974bp): واسم الدنا المعياري (المسار 1)، ناتج تضخيم المورثة (المسار 2)، الشاهد السلبي باستخدام الماء H_2O (المسار 3).

تنسيل مورثة الـ *lepB*:

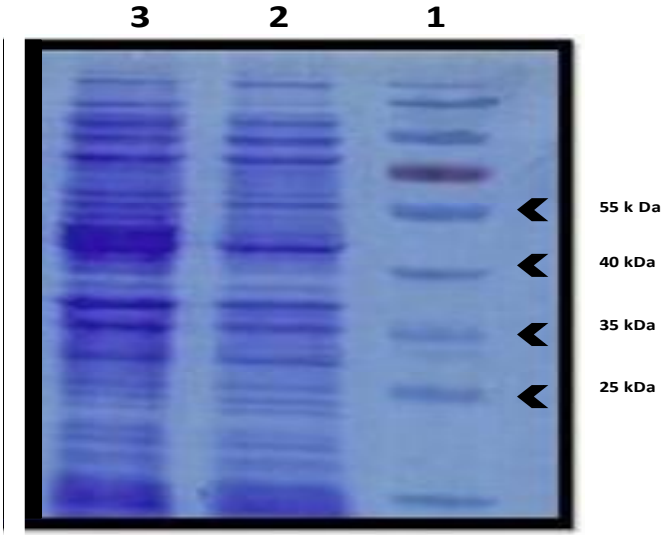
رُبطت مورثة الـ *lepB* إلى البلاسميد pET15b وذلك بعد معاملتهما بأنزيمات التقييد BamHI و NdeI ثمّ أُدخل البلاسميد الناتج pET15b/*lepB* إلى *E.coli* DH10B بهدف التنسيل، ومن ثمّ عزل البلاسميد من إحدى المستعمرات الجرثومية الناتجة وتمّ التأكد من احتوائه على مورثة الـ *lepB* من خلال تقطيعة بأنزيمات التقييد BamHI و NdeI، ومن ثمّ رُحّل ناتج القص على هلامة الأغاروز 0.8% حيث ظهرت عصابتان، العصابة الأولى بطول 5708 زوج نكليوتيدي ((5708 base pair (bp)) وهي مطابقة لطول البلاسميد pET15b، والعصابة الثانية بطول 974 زوجاً نكليوتيدياً ((974 base pair (bp)) وهي مطابقة لطول مورثة الـ *lepB* (الشكل 2). وهذا يؤكد نجاح عملية التنسيل. وقد تبيّن من خلال السلسلة وجود تشابه بنسبة 100% مُقارنةً بالتسلسل الموجود في قاعدة البيانات، الأمر الذي يدل على نجاح عملية تنسيل مورثة الـ *lepB* ضمن البلاسميد فضلاً عن إثبات خلوه من حدوث أي طفرة في أثناء التنسيل. كما دلَّ على وجود المورثة في مكانها الصحيح في البلاسميد.



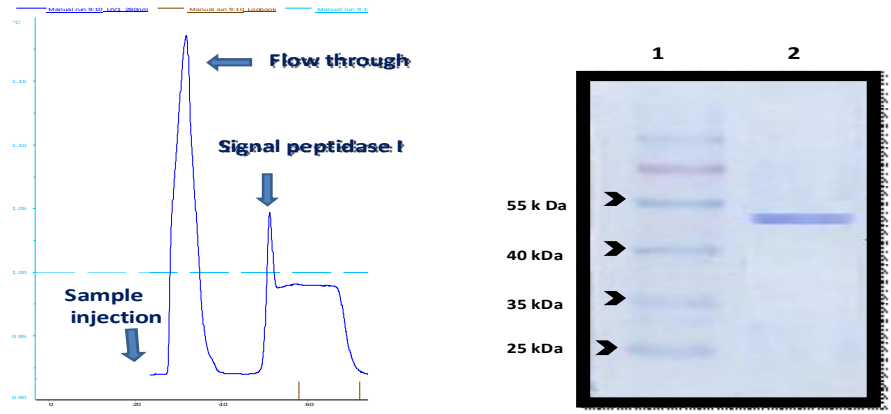
الشكل (2) صورة لهلامة الأغاروز 0.8% باستخدام الأشعة فوق البنفسجية لناتج تفاعل تقطيع البلاسميد pET 15b/*lepB* بأنزيمات التقييـد BamHI وNdeI: واسـم الـدنا المعياري (المسار 1)، ناتج تفاعل التقطيع (المسار 2).

التعبير البروتيني لمورثة الــ *lepB*:

بعد التأكد من دخول المورثة إلى البلاسميد أُدخل البلاسميد pET15b/*lepB* إلى خلايا التعبير *E.coli* BL21 (DE3) بوساطة تقنية التحول الكيميـائي، ثـمّ جـرى التحـريض البروتيني باستخدام الإيزوبروبانول بيتا دي ثيوغالاكتوزيداز ((IPTG) (Isopropyl b-D- thiogalactoside وبتركيز 0.5 mM فلوحظ أنّ البروتين تمّ إنتاجه بعد 4 سـاعات مـن التحريض والحضن بالدرجة 37 ْم (الشكل 3). استخلص البـروتين المؤشـب ثـمّ نُقّـيَ بوساطة كروماتوغرافيا الألفة للهيستيدين ورُحّلَ على هلامـة عديـد الأكريلاميـد 12% (poly acryl amide)، حيث حُدّد الوزن الجزيئي للبـروتين مقارنـة بواسـمة العـصابة المعيارية للأوزان الجزيئية، وقد كان قرابة 48 كيلو دالتـون ((48 Kilo Dalton (KDa) (الشكل 4).



الشكل (3) صورة لهلامة عديد الأكريلاميد (SDS-PAGE) 12% لناتج التعبير البروتيني: واسم البروتين العياري للأوزان الجزيئية (المسار 1)، مستعمرة *E.coli BL21* (DE3) حاوية على البلاسميد pET15b/*lepB* قبل التحريض باستخدام الـ IPTG (المسار 2)، مستعمرة *E.coli BL21* (DE3) حاوية على البلاسميد pET15b/*lepB* بعد 4 ساعات من التحريض باستخدام الـ IPTG (المسار 3).



الشكل (4) على اليمين: صورة لهلامة SDS-PAGE 12% لناتج تنقية بروتين الـ *lepB* بوساطة كروماتوغرافيا الألفة: واسم البروتين المعياري (المسار 1)، البروتين النقي وقد كان وزنه الجزيئي قرابة 48 KDa. على اليسار: مخطط يوضح عملية فصل البروتين عن باقي بروتينات الخلية الجرثومية بوساطة كروماتوغرافيا الألفة.

المناقشة

تتوافق النتائج التي تمّ الحصول عليها مع دراسات سابقة فقد كان ناتج تضخيم مورثة الـ *lepB* وهو 974 زوجاً نكليوتيدياً ((974 base pair (bp)) يماثل طول مورثة الـ *lepB* عند بعض الجراثيم سالبة الغرام، كالـ *E.coli* التي ضُخّمت مورثة الـ *lepB* عندها من قبل Wolfe وزملائه 1983 (10). كما يماثل طول المورثة عند النمط المصلي *typhimurium* من جنس السلمونيلا الذي أكد Van Dijl وزملاؤه سنة 1990 أنّه بطول 974 زوجاً نكليوتيدياً ((974 base pair (bp)) أيضاً (11).

يتوافق ناتج التعبير البروتيني لمورثة الـ *lepB* الذي تمّ الحصول عليه مع ناتج التعبير في متعضيات أخرى، وقد قام Wolfe وزملاؤه 1983 بالتعبير البروتيني لهذه المورثة المعزولة من الـ *E.coli* الذي كان وزنه الجزيئي النظري 36 كيلو دالتون ((36Kilo Dalton (KDa)) (16)، وأيضاً قام Van Dijl وزملاؤه سنة 1990 (11) بالتعبير البروتيني عن هذه المورثة ولكن دون تنقية المنتج البروتيني، وقد كان الوزن الجزيئي النظري للبروتين 36 كيلو دالتون ((36 Kilo Dalton (KDa)) أيضاً مع وجود اختلاف بين الوزن المحسوب نظرياً والوزن العملي. فأيضاً عند جراثيم السلمونيلا التيفية كان الوزن النظري 36KDa كيلو دالتون ((36 Kilo Dalton (KDa)) ولكن أظهر الترحيل على هلامة عديد الأكريلاميد أنّ وزنه العملي هو قرابة 48 كيلو دالتون ((48 Kilo Dalton (KDa)) .

الاستنتاجات

1- نُسّلت في هذا العمل مورثة الـ *lepB* التي عزلت من جينوم السلمونيلا التيفية أول مرة، والتي يبلغ طولها 974 زوجاً نكليوتيدياً ((974 base pair (bp)) وترمز بروتين مكون من 342 حمضاً أمينياً.

2- جرى التأكد من أنّ تسلسل هذه المورثة مطابق لتسلسل مورثة الـ *lepB* عند السلمونيلا التيفية المأخوذ من البنك الجينومي.

3- جرى التعبير البروتيني لمورثة الـ *lepB* بنجاح داخل خلايا التعبير *E.coli*. BL21 وذلك تحت سيطرة المحضض PT7.

4- استُخلص البروتين المؤشب ونُقّيَ بوساطة عمود كروماتوغرافيا الألفة وحُصل عليه بشكل نقي، وقد كان وزنه العملي هو قرابة 48 كيلو دالتون ((48 Kilo Dalton (KDa)) .

التوصيات

1- دراسة مستقبلية تتعلق بدراسة فعالية هذا الأنزيم، ومن ثمّ دراسة أثر المثبطات عليه، فهذا الأنزيم يعدُّ هدفاً لإنتاج صادات حيوية جديدة، وذلك بدراسة أثر المثبطات عليه (8)، إذ يمكن استخدام مثبطات ضده عند الجراثيم ولكنها لا تثبطه عند حقيقيات النوى ولاسيّما الإنسان (9)، ومن ثم يمكن استخدامها كصادات حيوية تثبط هذا الأنزيم الذي هو ضروري لحياة الجراثيم مما يؤدي إلى موتها (7)، ولا يكون لها آثار سلبية على الإنسان (13، 14).

2- دراسة الاستجابة المناعية لهذا البروتين الذي من الممكن أن يكون له تطبيقات كبيرة (12).

REFERENCES المراجع

1- **Gierasch LM: 1989. Signal sequences. Biochemistry. 28:923-930.**
2- **Wickner, W., Driessen, A., and Hartl, F. 1991. The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane, Rev. Biochem, 60:101–124.**
3- **Date, T., 1983. Demonstration by a novel genetic technique that leader peptidase in an essential enzyme of *Escherichia coli*, J. Bacteriol, 154: 76-83**
4- **Hoang, v., and Hofemeister, J. 1995. B. amyloliquefaciens possesses a second type I signal peptidase with extensive sequence similarity to other *Bacillus* SPases, Biochim. Biophys. Acta 1269: 64-68.**
5- **Dalbey, R., and Wickner, W. 1985. Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of *Escherichia coli* plasma membrane, J. Biol. Chem., 260: 15925-15931.**
6- **von Heijne G: 1985. Signal sequences. The limits of variation. J Mol Biol. 184:99-105.**
7- **Klug, G., Jager, A., Heck, C., and Rauhut, R. 1997. Identification, sequence analysis, and expression of the lepB gene for a leader peptidase in Rhodobacter capsulatus, Mol Gen Genet 253: 666–673.**
8- **San Millan, J. L., Boyd, D., Dalbey, R., Wickner, W., and Beckwith, J. 1989. Use of phoA fusions to study the topology of the *Escherichia coli* inner membrane protein leader peptidase, J Bacteriol 171: 5536– 5541.**
9- **von Heijne, G. 1990. The signal peptide, J Membr Biol 115: 195–201.**
10- **Wolfe, B., Wickner, W., and Goodman, M., 1983. Sequence of the leader peptidase gene of *Escherichia coli* and the orientation of leader peptidase in the bacterial envelope, J. Biol.Chem., 258:12073-12080.**
11- **Van Dijil *et al.*, 1990. Moleculer cloning of the salmonella typhimurium lepB gene in *Escherichia coli*, Mol Gen Genet., 223: 233-240.**
12- **Bonnemain, C., Raynaud, C., Re´ glier-Poupet, H., Dubail, I., Frehel, C., Lety, M. A., Berche, P. and Charbit, A. 2004. Differential roles of multiple signal peptidases in the virulence of *Listeria monocytogenes*, Mol Microbiol 51: 1251–1266.**
13- **Paetzel, M., Dalbey, R. E., and Strynadka, N. C. 2000. The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases, A novel antibiotic target. Pharmacol Ther 87: 27–49.**
14- **Craust, C., Froeyen, M., Anne, J., and Herdewijn, P. 2011. Asymmetric Synthesis of New β-Lactam Lipopeptides as Bacterial Signal Peptidase I Inhibitors, European Journal of Organic Chemistry, 19: 3437-3449.**
15- **Carlos J. L., Paetzel, M., Klenotic, P. A., Strynadka, N. C. J. and Dalbey, R. E. 2001. Bacterial type I signal peptidase, The Enzymes 3rd EditionVol. 22: 27-55.**
16- **Dogan Ekici, O., Karla, A., Paetzel, M., Lively, M.O., Pei, D., & Dalbey, R. E. 2007. Altered -3 substrate specificity of E. coli signal peptidase 1 mutants as revealed by screening a combinatorial peptide library, J. Biol. Chem, 282: 417-425.**
17- **Kim, A. C., Oliver, D. C., & Paetzel, M. 2008. Crystal structure of a bacterial signal peptidase, J. Mol. Biol, 376: 352-366.**
18- **Sambrook, J., Fritschi, EF., and Maniatis, T. 1989. a laboratory manual 2nd ed. N. Y. Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN, 0-87969-309-6.**