

Afslutningsrapport

Totalt regulerbare promotorer i skræddersyede starterkulturer

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2001-39

Februar 2001



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport

Totalt regulérbare promotorer til skræddersyede starterkulturer

Mejeribrugets ForskningsFond – FØTEK

Februar 2001

Afslutningsrapport for FØTEK-samarbejdsprojektet :

Totalt regulérbare promotorer til skræddersyede starterkulturer.

Medarbejdere :

Professor, Lic. Scient. Karin Hammer (Projektleder), Sektion for Molekylær Mikrobiologi, BioCentrum-DTU. Bygning 301. Danmarks Tekniske Universitet (DTU), 2800 Lyngby. Tlf. 4525 2496. Fax. 4588 2660. Email : Karin.Hammer@BioCentrum.dtu.dk

Cand. Polyt. Ph.D. Peter Lynge Madsen, Sektion for Molekylær Mikrobiologi, BioCentrum-DTU. Bygning 301. Danmarks Tekniske Universitet (DTU), 2800 Lyngby. Ansat som forskningsadjunkt i perioden : 1 juni 1996 - 31 december 1996

Cand. Polyt. Ph.D. Annette H. Johansen, Sektion for Molekylær Mikrobiologi, BioCentrum-DTU. Bygning 301. Danmarks Tekniske Universitet (DTU), 2800 Lyngby. Email : Annette.Johansen@BioCentrum.dtu.dk. Ansat som Ph.D-studerende i perioden : 1 marts 1997 – 30 september 1999 samt 1 marts 2000 - 31 juli 2000. Ansat som forsknings-assistent i perioden : 1 oktober 1999 – 29 februar 2000 samt 1 august 2000 – 30 november 2000.

Forskningslektor, Cand. Polyt. Ph.D. Lone Brøndsted, Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet (MLI), Den Kgl. Veterinær og Landbohøjskole (KVL), Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C. Email : lobr@kvl.dk. Tilknyttet projektet som medvejleder for Ph.D. studerende Annette H. Johansen.

Laboratorietekniker Lena Justinussen, Sektion for Molekylær Mikrobiologi, BioCentrum-DTU. Bygning 301. Danmarks Tekniske Universitet (DTU), 2800 Lyngby. Ansat som laborant i perioden : 9 marts 1998 - 26 juni 1998

Laborant Jeannette Sparra de Lundin, Sektion for Molekylær Mikrobiologi, BioCentrum-DTU. Bygning 301. Danmarks Tekniske Universitet (DTU), 2800 Lyngby. Ansat som laborant i perioden : 1 september 1998 – 31 oktober 2000

Laborant Lise Sørensen, Sektion for Molekylær Mikrobiologi, BioCentrum-DTU. Bygning 301. Danmarks Tekniske Universitet (DTU), 2800 Lyngby.

Bachelorstuderende Dorte Friis, Sektion for Molekylær Mikrobiologi, BioCentrum-DTU. Bygning 301. Danmarks Tekniske Universitet (DTU), 2800 Lyngby. Tilknyttet projektet 1 februar – 31 juli 2000.

Bachelorstuderende Kenneth Fevre , Sektion for Molekylær Mikrobiologi, BioCentrum-DTU. Bygning 301. Danmarks Tekniske Universitet (DTU), 2800 Lyngby. Tilknyttet projektet 1 september 2000 – 29 februar 2001.

Forord :

Medarbejderne på projektet ønsker at takke Mejeribrugets ForskningsFond (MFF) og FØTEK programmet for økonomisk støtte til projektet. Vi vil også takke Styregruppen og Mejeriforeningen for den udmærkede opbakning og gode diskussioner under projektførelsen. Professor Peter Roepstorff og professor Poul Valentin-Hansen, begge Afdelingen for Molekylær Biologi ved Syddansk Universitet, takkes for henholdsvis masse spektroskopisk analyse af CI repressor proteinet og for hjælp vedr. DNA footprint med CI-repressoren. Herudover takkes Anne Blicher, Sektion for Biokemi og Ernæring, BioCentrum-DTU (DTU), for udførelse af aminosyre analyser på CI ekstrakter. Sidst, men ikke mindst takkes alle vore kolleger i laktokok gruppen på Sektionen for Molekylær Mikrobiologi, BioCentrum-DTU for mange gode faglige diskussioner og godt socialt netværk.

Resumé (dansk) :

Laktokok fagen TP901-1 er en temperat fag. Den har derfor et valg mellem to forskellige former for livscyklus (lysogen eller lytisk) efter infektion af en sensitiv vært. I den lysogene livscyklus eksisterer fagen i en passiv tilstand i værten, mens resultatet af en fag, der gennemløber den lytiske livscyklus er lysis og død af værten. En tænd-sluk mekanisme til stede i fagens genom kontrollerer valget af livscyklus ved at regulere ekspressionen af gener nødvendige for hhv. en lysogen eller en lytisk livscyklus. To fagkodede proteiner (CI og MOR) blev identificeret som regulatorer af tænd-sluk mekanismen i TP901-1. CI forhindrer ekspression fra både den lytiske og den lysogene promotor, hvorimod MOR virker som en inhibitor af CI-repressionen. Herudover viste det sig, at mængden og det relative forhold mellem CI og MOR regulerer konfigurationen af tænd-sluk mekanismen og fremmer herved enten en lysogen eller en lytisk livscyklus af TP901-1. CI blev overudtrykt og oprenset til næsten renhed. Biokemiske analyser viste, at CI hovedsagelig eksisterer som en dimer. De specifikke bindingsites for CI proteinet på fagens genom blev identificeret ved både biokemiske og genetiske analyser. Bindingsstudier og DNaseI footprinting forsøg viste kooperativ CI-binding til to DNA sites med dyade symmetri (O_R og O_L) i fagens genom. Tilstedeværelse af O_L viste sig at være tilstrækkelig for tæt repression af den lytiske promotor (P_R), hvorimod tæt repression af den lysogene promotor (P_R) krævede både O_L og O_R sitet. Et bibliotek af CI-mutanter blev konstrueret, og antistoffer fremstillet mod CI viste sig at være meget specifikke til påvisning af om der findes CI protein i CI-mutanter.

resumee (English) :

The lactococcal bacteriophage TP901-1 is a temperate phage. After infection of a sensitive host it therefore has a choice between two different life cycles (lysogenic or lytic). In the lysogenic life cycle the phage exists in a silent state, while the lytic life cycle results in lysis and death of the host. A genetic switch present in the phage genome of the temperate bacteriophage determines the decision of life cycle by regulating the expression of genes required for either a lysogenic or a lytic life cycle. Two phage encoded proteins (CI and MOR) was identified as the regulators of the

genetic switch of TP901-1. CI inhibits the expression from both the lytic and the lysogenic promoters, in contrast to MOR, which acts as an inhibitor of the repression mediated by CI. It was furthermore shown that the amount and the relative ratio of CI and MOR regulates the configuration of the genetic switch promoting either a lysogenic or a lytic life cycle of TP901-1. CI was overexpressed and purified to almost purity. Biochemical analysis revealed, that CI predominately existed as a dimer. The specific binding sites for CI on the phage genome were identified by biochemical and genetic studies. Binding studies and DNaseI footprinting experiments showed cooperatively binding of CI to two DNA sites (O_R and O_L) with dyad symmetry in the genome of TP901-1. The presence of O_L was sufficient for tight repression of the lytic promoter (P_L), in contrast to tight repression of the lysogenic promoter (P_R), which required both the O_L and O_R sites. A library of CI-mutants was constructed and antibodies against CI was shown to be very specific for verification of CI synthesis in CI mutants.

Formål :

TP901-1 er en temperat bakteriofag (virus), der er isoleret fra *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 901-1 (Braun *et al.*, 1989). En temperat bakteriofag er en fag, der kan vælge mellem en lytisk eller en lysogen livscyklus. Vælges den lytiske cyklus medfører det formering af fagen og drab af værtscellerne, i modsætning til den lysogene livsform, hvor værtscellen formerer sig videre, indeholdende fag DNA'et, men i en sovende tilstand, hvor stort set alle genudtryk er lukket ned. En temperat fag må derfor indeholde en tænd-sluk mekanisme for genudtryk (genekspression). Formålet med dette projekt har været at identificere denne tænd-sluk mekanisme, karakterisere elementerne i den og herefter ved hjælp af mutagenese at ændre regulatoren af mekanismen, således at den kan respondere på ændringer i temperatur, syrningsgrad og evt. saltindhold i vækstmediet. Til opfyldelse af projektets formål er genetiske, molekylære biologiske samt biokemiske teknikker blevet anvendt.

Baggrund :

Mælkesyrebakterier, specielt *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), anvendes ofte som starterkulturer ved produktion af fermenterede mælkeprodukter og forskellige former for ost. Hvis en bakteriekultur (starterkultur) bliver inficeret med bakteriofager (virus, der angriber bakterier) betyder det nedsættelse/ødelæggelse af produktionen og dermed store økonomiske tab. Det er derfor af stor vigtighed at opnå viden om bakteriofager og deres livscyklus for at kunne konstruere fagresistente starterkulturer. Bakteriofager er dog samtidig en enestående kilde til fremstilling af genetiske værktøjer, idet de er i stand til at ændre udtrykket af deres gener fra 0-100 %. Sådanne totalt regulerbare promotorer er yderst anvendelige ved konstruktion af f.eks. skræddersyede starterkulturer.

Resultater :

Tænd-sluk mekanismen i den temperate bakteriofag TP901-1 har vist sig at bestå af to fag promotorer, P_L og P_R (Madsen og Hammer, 1998) samt mindst to regulatoriske proteiner (Madsen *et al.*, 1999). P_L er den lytiske promoter ansvarlig for ekspresion af gener nødvendig for den lytiske livscyklus. P_R er den lysogene promoter, som transkriberer gener, der kræves for den lysogene livscyklus af fagen (fig. 1). Opretholdelse af lysogeny efter infektion af en sensitiv vært med TP901-1 kræver fuldstændig nedlukning (repression) af genekspresion fra den lytiske promoter (P_L).

Identifikation af den fagkodede regulator (repressor)

Forskellige fragmenter indeholdende DNA fra TP901-1 blev klonet som P_R - og P_L -fusioner til det promoterløse *lacLM* gen i promoterprobe vektoren pAK80. Herved kunne ekspresionen fra P_R og P_L promotererne måles. Disse fusioner viste, at *cI* genet (før kendt som *orf4*), som bliver transkriberet fra den lysogene P_R promoter, er nødvendigt og tilstrækkeligt for nedlukning af ekspresionen fra P_L og P_R promotererne (Fig. 1). Tilstedeværelse af *cI* giver ydermere immunitet overfor infektion med TP901-1. *CI* identificeres hermed som den fagkodede regulator – fag-repressoren. Repressoren (*CI*) lukker primært den lytiske promoter ned, og forhindrer at fagen går i den lytiske livscyklus. Det første gen (*mor* - modulator of repression før kendt som *orf5*) transkriberet fra den lytiske promoter (P_L) (Fig. 1) inhiberer *CI*-repressionen og dermed valget af den lytiske livscyklus. Tilstedeværelsen af både *cI* og *mor* på et plasmid gør, at en bakterie kan vælge én af to mulige forskellige, men stabile fænotyper. Enten lukkes der for P_L promotereren eller der åbnes for den – et fænomen, der kaldes ”klonal variation”. Konfigurationen af tænd-slukmekanismen viste sig, at være afhængig af mængden og det relative forhold imellem de to regulatoriske proteiner, *CI* og *Mor* (Madsen *et al.*, 1999).

Deletionsanalyse af P_R - P_L promoterregionen

Det mindste DNA fragment (*P3*), som indeholder funktionelle P_R og P_L promoter samt elementer nødvendig for *CI*-regulering (repression) af de to promotorer, blev ved en deletionsanalyse bestemt til at være 317 basepar. De to promotorer blev adskilt, og styrken af den ene promoter viste sig til en vis grad at være påvirket af, om den anden promoter var til stede. Dette var især udtalt for den lysogene P_R promoter, hvis aktivitet steg ca. seks gange ved deletion af den lytiske P_L promoter. Et DNA fragment (*P5*) på kun 185 basepar viste sig at indeholde en meget stærk P_L promoter, som tilmed var tæt represseret af *CI*-repressoren. Et DNA fragmentet (*P6*), der kun indeholder P_R promotereren (151 basepar) var derimod represseret til en mindre grad af *CI*-repressoren (Johansen, 2000).

Kloning, oprensning og biokemisk karakterisering af den fagkodede repressor (CI)

Genet, der koder for fag repressoren (*cI*), er blevet klonet i en *Escherichia coli* (*E. coli*) overekspressionsvektor. Repressor proteinet (CI) blev overudtrykt og oprenset til næsten renhed ved en simpel fældnings-vaske procedure. N-terminal sekventering, aminosyreanalyse og masse spec. analyse viste, at det overudtrykte protein var CI. Den native molekylvægt af CI blev ved en gelfiltrering bestemt til 46 kDa, hvilket tyder på, at CI hovedsagelig eksisterer som en dimer, da molekylvægten af én CI-subunit er ca. 21 kDa. Krydsbindingsforsøg viste ligeledes, at hovedparten af CI forefindes som en dimer i vandig opløsning. Det fremstillede CI protein blev brugt til fremstilling af polyklonale antistoffer imod CI. Disse antistoffer viste sig særdeles CI-specifikke imod CI syntetiseret i både *L. lactis* og *E. coli* (Johansen, 2000).

Identifikation og analyse af CI-bindingssites (operator sites)

Lokaliseringen af DNA-sites (operator sites), hvortil repressoren (CI) binder, blev bestemt *in vitro* ved to forskellige biokemiske metoder (DNaseI footprint og Gel Mobility Shift assay). Et DNaseI footprint giver den nøjagtige lokalisering af sites på DNA'et hvortil proteinet binder, hvorimod Gel mobility shift assays kun kan verificere om et protein er i stand til at binde til et givent DNA fragment eller ej. Udfra Gel mobility shift assays'ne kan bindingskonstanter for binding af f.eks. protein til DNA beregnes. I et DNaseI footprint eksperiment blev to DNA-regioner (O_R og O_L) i P_R - P_L regionen af TP901-1 identificeret som CI-bindingssites (Fig. 1 og bilag 1). Afstanden mellem de to bindingsites (O_R og O_L) er 63 basepar (6 helical turns), hvilket svarer til at de befinder sig på samme side af DNA-helixen.

Bindingen af CI til forskellige DNA fragmenter, indeholdende enten O_R , O_L , eller begge sites ($O_R + O_L$), blev analyseret ved Gel mobility shift assays (tabel 1). For hvert fragment blev bindingskonstanten (K_{dapp}) og Hill coefficienten bestemt (h). Jo tættere binding mellem DNA fragmentet og CI, jo lavere K_{dapp} . Hill coefficienten er et kvantitativt mål for graden af kooperativitet i binding. En høj grad af kooperativitet i binding giver en høj Hill coefficient.

DNA fragment	Operator sites	K_{dapp} (nM)	h
P2	$O_R + O_L^*$	70	1.5
P3	$O_R + O_L$	2	2.2
P5	O_L	28	1.1
P6	O_R	-	-
CF	-	-	-

Tabel 1 :

O_L^* : halvdelen af O_L sitet mangler

Gel mobility shift assays viste (tabel 1), at den bedste binding af CI til P_R - P_L regionen opnås ved tilstedeværelse af både O_L og O_R . CI kan binde til O_L sitet alene, dog tabes både affinitet og kooperativitet i bindingen ved deletion af O_R sitet. O_R sitet herimod

er ikke tilstrækkeligt for tæt binding af CI *in vitro*. Et konsensus CI-bindingssite på 19 basepar med dyadestruktur blev forudsagt på basis af sekvensen af O_L og O_R og CI-affiniteterne bestemt ved gel mobility shift assays (Fig. 2). Søgning med CI-konsensus bindingssitet i genomsekvensen af TP901-1 (Brøndsted *et al.*, 2001) gav endnu et muligt bindingssite (O_D) for CI. Dette ekstra bindingssite er lokaliseret i slutningen af genet efter *mor* (*orf6*) og i en afstand af ca. 250 basepar fra O_L sitet. Gel mobility shift assays med et DNA fragment indeholdende dette ekstra site (O_D) og CI proteinet viste, at CI binder til sitet *in vitro*. O_D sitet er derfor muligvis også involveret i reguleringen af tænd-sluk mekanismen (den genetiske switch) i TP901-1 (Johansen, 2000).

Promoterregionen af TP901-1 har stor identitet med tilsvarende regioner af de tre fager Ø31 (*L. lactis*, Dinsmore and Klaenhammer, 1997), ØPVL (*Staphylococcus aureus*, Kaneko *et al.*, 1998) og ØO1205 (*Streptococcus thermophilus*, Stanley *et al.*, 1997). Det topologiske CI protein fra disse tre fager har desuden høj homologi til CI fra TP901-1, hvilket kan indikere, at bindingssites for CI i disse fager måske ligner CI operatorsites identificeret i TP901-1. Der er således også mulighed for at CI proteinet fra TP901-1 ville kunne repressere den lytiske promoter fra en eller flere af disse fager. Dette vil være meget interessant, da fagerne tydeligt har taxonomisk forskellige værtsbakterier.

Bindingen af CI til P_R-P_L DNA regionen viste sig desuden at være både temperatur og ionstyrke afhængig, idet affiniteten af CI for DNA fragmenterne aftager med højere temperatur og ved øget ionstyrke (Johansen, 2000).

Isolering af operator site og repressor mutanter

Mutagenese af DNA fra TP901-1 resulterede i tre operator site mutanter og mere end 40 repressor mutanter. De tre operator site mutanter havde alle enkeltbase-substitutioner i O_L bindingssitet, og viste ændret CI-regulering *in vitro* og *in vitro*. For at øge antallet af operator site mutanter blev 4 syntetiske mutanter konstrueret. De syntetiske mutanter blev analyseret *in vitro* ved gel mobility shift assays. Analyserne viste, at især de yderste baser i dyadestrukturen på 19 basepar var vigtige for CI-binding.

De polyklonale antistoffer produceret imod CI viste sig at være meget anvendelig for påvisning af tilstedeværelsen af CI protein i CI-mutanter. En CI-mutant er analyseret og viste sig at syntetisere et trunke CI protein (122 aminosyrer istedet for 180 aminosyrer), som ikke kan give fuld repression af P_L promoteren. Det trunke protein ser endvidere ud til at være pH-sensitivt. En konstrueret deletionsmutant, hvor 18 aminosyrer er deleteret i C-terminalen af CI proteinet, havde ikke nogen umiddelbar effekt på repression af P_L promoteren.

Konklusion :

Projektet har ført til en forbedret molekylær forståelse af tænd-sluk mekanismen i den temperate laktokok bakteriofag TP901-1. De opnåede resultater vedrørende den genregulatoriske mekanisme for TP901-1 kan således danne basis for nye modeller for genregulering, også for andre fager.

Det blev vist, at tænd-sluk mekanismen i TP901-1 består af de to fag promotorer P_R og P_L , de to regulatoriske proteiner CI og MOR samt de to CI-bindingssites (O_R og O_L), dertil kommer muligvis yderligere O_D sitet. CI proteinet udtrykt fra den lysogene promoter viste sig at være nødvendig og tilstrækkelig for repression af den lytiske promoter og hermed for lysogeni. Tilstedeværelse af CI gav endvidere immunitet overfor infektion med TP901-1 og CI identificeres hermed som fagrepressoren. MOR proteinet, som transkriberet fra den lytiske promoter (P_L), var i stand til at inhibere CI repression af P_L , hvilket fremmer valget af en lytisk livscyklus. Endvidere blev det vist, at mængden af- og det relative forhold mellem CI og MOR kunne ændre konfigurationen af tænd-sluk mekanismen (P_L lukket vs. P_L åben, hvilket svarer til den lysogene vs. den lytiske livscyklus af TP901-1). CI blev overudtrykt i *E. coli* og oprenset til mere end 95% renhed. Biokemisk karakterisering viste, at CI repressoren eksisterer som en dimer i vandig opløsning.

To bindingssites (O_R og O_L) for CI blev identificeret ved DNaseI footprinting. Gel mobility shift assays viste, at CI binder med den højeste affinitet og højeste grad af kooperativitet til fragmenter indeholdende begge sites. O_L sitet er tilstrækkelig for binding, men affinitet og kooperativitet mistes, når O_R sitet deleteres. O_R alene er derimod ikke tilstrækkelig for tæt binding af CI *in vitro*. En 19 basepar DNA sekvens indeholdende et inverted repeat blev identificeret som CI bindingssite (operator site) ved DNaseI footprinting og yderligere verificeret vha. operatorsite mutanter. Lokaliseringen af de to operator sites, naturen af dem (dyade symmetri), kooperativiteten i bindingen samt, at CI eksisterer som en dimer i vandig opløsning, indikerer binding af et symmetrisk CI-molekyle (én dimer) til hvert operator site dvs. binding af CI til P_R - P_L regionen som en tetramer.

Et CI-mutant bibliotek er fremstillet. Metoderne er således på plads til både en nærmere struktur-funktions-analyse af CI repressoren og til screeninger for repressor mutanter med ændret respons til temperatur, pH eller salt. To CI-mutanter med deletioner i C-terminalen af CI er analyseret. Disse analyser indikerer, at dimeriseringsdomænet for CI er lokaliseret mellem aminosyre 120 og 160 i det 180 aminosyre store CI protein.

Projektet har ikke kun givet viden om den genregulatoriske mekanisme for TP901-1, men har også givet elementer som kan bruges til udvikling af total regulerbare promotorer til skræddersyede starterkulturer. Nogle af modulerne i tænd-sluk mekanismen (den genetiske switch) af TP901-1 udgør et tæt reguleret ekspressionssystem. P_L promotoren på det 185 basepar fragment (uden P_R promotoren) er meget aktiv og reguleres tæt ved binding af CI til O_L sitet til stede i dette fragment. Gener, som ønskes udtrykt, kunne placeres under kontrol af P_L promotren og O_L sitet. Ekspression fra den CI-represserede P_L promoter skulle så kunne blive induceret ved inaktivering af CI repressoren. CI-mutanter, som bliver inaktiveret ved miljømæssige faktorer (så som f.eks. temperatur, salt eller pH), er

brugbare til dette formål, da disse betingelser ofte ændres under produktionen af et fermenteret mælkeprodukt og let kan kontrolleres.

Referencer i teksten :

Braun, V., S. Hertwig, H. Neve, A. Geis and M. Teuber. 1989. Taxonomic differentiation of bacteriophages of *Lactococcus lactis* by electron microscopy, DNA-DNA hybridization, and protein profiles. *J. Gen. Microbiol.* Vol. 135: 2551-2560

Brøndsted, L., Østergård, S., Pedersen, M., Hammer, K., and Vogensen, F. K. 2001. Analysis of the complete DNA sequence of the temperate bacteriophage TP901-1 : Evolution, structure and genome organization of lactococcal bacteriophages. *Virology in press.*

Dinsmore, P.K. and Klaenhammer, T.R. 1997. Molecular characterization of a genomic region in a *Lactococcus* bacteriophage that is involved in its sensitivity to the phage defense mechanism AbiA. *J. Bacteriol.* Vol. 179: 2949-2957.

Johansen, A. H. 2000. Ph.D. thesis with the title : "The genetic switch of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1". Section of Molecular Microbiology, BioCentrum-DTU, Lyngby.

Kaneko, J. Kimura, T. Narita, S. Tomita, T and Y. Kamio. 1998. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene* Vol. 215: 57-67.

Madsen, P. L. and K. Hammer 1998. Temporal transcription of the lactococcal temperate phage TP901-1 and DNA sequence of the early promoter region. *Microbiology.* Vol. 144: 2203-2215.

Madsen, P. L., Johansen, A. H, Hammer, K. and L. Brøndsted 1999. The genetic switch regulating activity of the early promoter of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *Journal of Bacteriology.* Vol. 181(24): 7430-7438.

Stanley, E. Fitzgerald, G.F., Le Marrec, C., Fayard, B and D. van Sinderen. 1997. Sequence analysis and characterization of phiO1205, a temperate bacteriophage infecting *Streptococcus thermophilus* CNRZ1205. *Microbiology.* Vol. 143: 3417-3429.

Publikationer :

Madsen, P. L. and K. Hammer. 1998. Temporal transcription of the lactococcal temperate phage TP901-1 and DNA sequence of the early promoter region. *Microbiology.* Vol. 144: 2203-2215.

Madsen, P. L., Johansen, A. H, Hammer, K. and L. Brøndsted 1999. The genetic switch regulating activity of the early promoter of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *Journal of Bacteriology*. Vol. 181(24): 7430-7438.

Johansen, A. H. 2000. Ph.D. thesis with the title : "The genetic switch of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1". Section of Molecular Microbiology, BioCentrum-DTU, Lyngby.

Manuskripter under udarbejdelse til publikation :

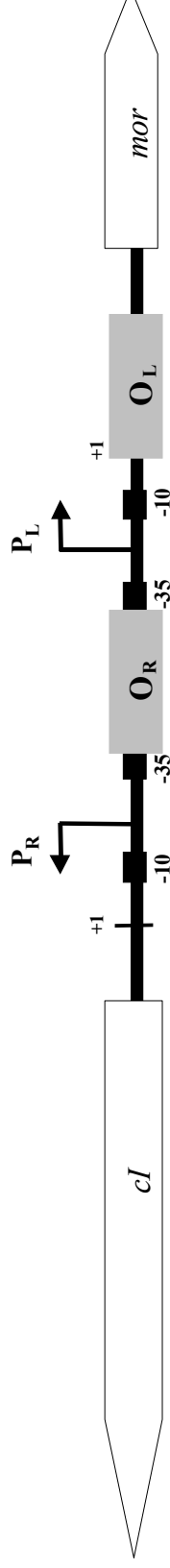
Johansen, A. H., Brøndsted, L. and K. Hammer. Purification af characterization of the repressor from the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1.

Johansen, A. H., Brøndsted, L. and K. Hammer. The CI repressor from TP901-1 binds with cooperativity to the early promoter region.

Johansen,A. Brøndsted, L and Hammer,K. : Totalt regulerbare promotorer til skræddersyede starterkulturer. Mælkeritidende

Fig. 1

Tænd-sluk mekanismen (den "genetiske switch") i TP901-1



- P_R og P_L : Den lysogene (P_R) og den lytiske (P_L) promotor defineret af -10 og -35 boxe. $+1$ indikerer transkriptions start punktet identificeret ved primer extension.
- O_R og O_L : Binding sites (operator sites) for CI identificeret ved DNaseI footprinting
- cI : CI repressoren, som lukker ned for transkription fra P_R og P_L
- mor : modulator of repression. MOR inhiberer CI-nedlukningen af P_L (og P_R)

Fig. 2

Konsensus CI-binding site



Bilag 1 :

DNaseI footprint med DNA fragment og CI protein fra TP901-1

