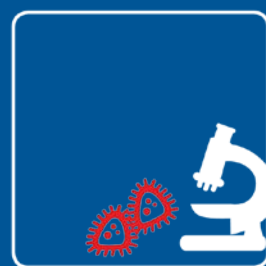


Starterkulturers fysiologiske og genetiske status som indikator for modningsforløb i ost





DATO: 18/10 2011

Slutrapport

for forsknings- og udviklingsprojekter med tilskud fra Innovationsloven

1. Projekttitle:

Starterkulturers fysiologiske og genetiske status som indikator for modningsforløb i ost

2. FødevareErhvervs j.nr.: 3414-05-01310

3. Ansøger (titel, navn, adresse, tlf., fax. og e-mail):

Chefkonsulent Kim Tram Sørensen
Mejeribrugets ForskningsFond
Agro Food Park 13
8200 Århus N
(+45) 3339 4479
e-mail: kts@lf.dk

4. Deltagende samarbejdsparter (navn, adresse, tlf., fax., og e-mail):

Lektor Henrik Siegumfeldt
Institut for Fødevarevidenskab, Fødevaremikrobiologi
Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer
Københavns Universitet, Frederiksberg Campus
Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C
(+ 45) 3528 3286
hsi@life.ku.dk

Docent Mogens Kilstrup
Center for System Mikrobiologi
DTU-Systembiologi, byg. 301, rum 210
Danmarks Tekniske Universitet
2800 Kgs. Lyngby
e-mail: mki@bio.dtu.dk

Søren Lillevang
Arla Foods amba
Sønderhøj 14

8260 Viby J
e-mail: sklv@arlafoods.com

5. Kontaktpersoner (titel, navn, adresse, tlf., fax. og e-mail. For hver deltagende institution er der er udpeget én kontaktperson):

Lektor Henrik Siegumfeldt
Institut for Fødevarevidenskab, Fødevaremikrobiologi
Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer
Københavns Universitet, Frederiksberg Campus
Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C
(+ 45) 3528 3286
hsi@life.ku.dk

Docent Mogens Kilstrup
Center for System Mikrobiologi
DTU-Systembiologi, byg. 301, rum 210
Danmarks Tekniske Universitet
2800 Kgs. Lyngby
e-mail: mki@bio.dtu.dk

Søren Lillevang
Arla Foods a.m.b.a.
Sønderhøj 14
8260 Viby J
e-mail: sklv@arlafoods.com

6. Øvrige projektmedarbejdere (titel, navn, adresse, tlf., fax., og e-mail):

Ph.d.-studerende Mia Ryssel
Institut for Fødevarevidenskab, Fødevaremikrobiologi
Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer
Københavns Universitet, Frederiksberg Campus
Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C
(+ 45) 3528 3286
mry@life.ku.dk

Post Doc. Christian Bille Jendresen
Center for System Mikrobiologi
DTU-Systembiologi, byg. 301
Danmarks Tekniske Universitet
2800 Kgs. Lyngby
e-mail: cbj@bio.dtu.dk

Lektor Peter Ruhdahl Jensen
Center for System Mikrobiologi
DTU-Systembiologi, byg. 301
Danmarks Tekniske Universitet
2800 Kgs. Lyngby
e-mail: prj@bio.dtu.dk

Post doc. Jakob Brandt Haaber
Center for System Mikrobiologi
DTU-Systembiologi, byg. 301
Danmarks Tekniske Universitet
2800 Kgs. Lyngby

e-mail: jha@bio.dtu.dk

7. Projektets start- og slutdato:

1. januar 2006 – 31. december 2010

8. Slutrapport: (maks. 4-6 sider)

A. Sammendrag af projektets formål og af projektets indhold i henhold til den godkendte projektansøgning:

Formålet med projektet var at belyse sammenhængen mellem forhistorien for *Lactococcus lactis* og dens funktion som modningskultur i ost for at optimere ostningen. Undersøgelser af de tidligere intracellulære begivenheder kobles med kulturens ostemodningsegenskaber for at forbedre denne. Der anvendes avanceret genteknologi og bioimaging til udvikling af nye kontrolmetoder.

Udgangspunktet var en analyse af *L. lactis* fra et tidligere MFF støttet projekt, hvor der blandt de tidlige intracellulære begivenheder blev fundet en opregulering af proteiner i GTP syntesen (PurA og GuaB). Projektet skulle undersøge om denne opregulering var af vigtighed for laktokokkernes senere nedsyning og ostemodning.

B. Projektets resultater og konklusion:

Kort sammendrag af projektets hovedresultater og konklusioner med henvisning til publikationer.

I projektet valgte vi at fokusere på GuaB enzymet og dets gen *guaB*, samt på G-nukleotid-stress som fremkommer ved for lav niveau af GuaB enzym.

Vi har undersøgt:

- Sammenhængen mellem mængden af GuaB enzymet og cellens purin-metabolitter, fysiologi, væksthastighed, nedsyningsevne (Mia Ryssel, PhD rapport) og resistens mod syrestress
- Sammenhængen mellem resistens overfor syrestress og G-nukleotid-stress
- *L. lactis* intracellulære respons overfor G-nukleotid-stress

Vi har vist at:

- GuaB genet og syntesevejen for GMP, GDP og GTP (G-nukleotider) er vigtig for cellens fysiologi og overlevelse under stressende omstændigheder (manuskript under udarbejdelse)
- Ændringer i GuaB niveauet indvirker kraftigt på om GTP eller ATP er cellens foretrukne energidonor (manuskript under udarbejdelse)
- Sult for G-nukleotider er nødvendig for syrestres-resistens (Mia Ryssel, PhD rapport, manuskript under udarbejdelse)
- Sult for G-nukleotider medfører op-regulering af syntesevejens gener samt af gener involveret i NAD⁺ dannelse (manuskript under revision)

- Sult for G-nukleotider medfører ned-regulering af gener i pyrimidinbiosyntesen og fosfat-metabolismen (manuskript under revision)
- En mutant i genet *llmg-0991* medfører nedregulering af gener i fosfat-metabolismen og kræver tilførsel af fosfat (manuskript under udarbejdelse)

Vi har ikke vist:

- Om induktion af syrestress-resistens er koblet til det reguleringssystem der kontrollerer G-nukleotid induceret op- og ned-regulering af gener.
- Om *llmg_0991* genet er involveret i syrestress-resistens

C. Projektets faglige forløb:

Gennemgang af projektets forløb og opnåede resultater samt en vurdering af resultaterne i forhold til de oprindeligt opstillede projektplan og milepæle. Der bør tillige være en vurdering af opfyldelse af budget.

Ifølge godkendte reviderede projektplan blev der defineret følgende faser (*status er angivet i kursiv*):

- **Standardisering af podedkultur**
Ikke udført
- **Konstruktion af mutantbiblioteker med fastlagte niveauer af GuaA og GuaB**
Gennemført som planlagt for GuaB. Det har vist sig umuligt at gennemføre for GuaA
- **Propageringens betydning for syrningshastigheden i ostemælk**
Syrningsforsøg med stammer fra GuaB mutantbibliotek med henholdsvis 41% og 14% aktivitet
- **Betydning af propagering og syring for autolyse og ostemodning**
 - **Viabilitets- og homogenitetsstudier**
Analyser af stammer fra GuaB mutantbibliotek med henholdsvis 41% og 14% aktivitet
 - **Celledød og autolyse**
 - **Proteolytisk aktivitet**
- **Industrielle applikationer**
Ikke udført på grund af manglende facilitet til osteproduktion med gensplejsede organismer

Budgettet er løbende blevet revideret på grund af sen igangsættelse af projektet og skift af medarbejdere. Midlerne er blevet anvendt som budgetteret, men ofte forskudt i forhold til den oprindelige plan.

D. For samarbejdsprojekter med flere projektparter redegøres yderligere for:

- samarbejdsrelationer mellem projektpartnere nationalt og eventuelt internationalt, herunder koordinering til andre projekter.
Udmærkede samarbejdsrelationer mellem projektpartnerne, hvor blandt andet PhD studerende Mia Ryssel fra KU Life tilbragte et halvt år på DTU
- om alle parter har opfyldt deres økonomiske tilsagn. Eventuelt underforbrug hos en eller flere projektparter forklares.
Ingen anormalitet

E. Vurdering af projektets erhvervs- og samfundsmæssige betydning:

Herunder kan følgende forhold indgå i vurderingen:

- Omsætnings- og investeringseffekt,

- Ingen*
- Konkurrencefremmende effekt,
Ingen
- Antal af ansøgte og opnåede patenter eller anden eneretsbeskyttelse,
Ingen
- Beskæftigelseseffekt (direkte og indirekte),
Ingen udover de projektansatte
- Markedseffekt (nye markeder eller markedsandele, nye produkter),
Ingen
- Kompetenceopbygning hos projektdeltagerne,
- *Stor kompetenceopbygning i forhold til anvendelse af promoterbiblioteker samt transkriptomanalyse*
- Effekt i relation til kvalitetsparametre (spisekvalitet, holdbarhed, hygiejne m.v.), herunder "bløde" parametre som miljø, arbejdsmiljø, dyrevelfærd m.v.
Ingen
- Resultaternes praktiske og/eller videnskabelige betydning samt hvilke nye problemstillinger projektet måtte have afdækket herunder relationer til andre/fremtidige projekter.
- *Stor videnskabelig betydning af den G-nukleotid inducerede syrestress sensitivitet. Projektet har åbnet et nyt felt som muligvis kan være af vigtighed for forståelsen af bakteriers stress-respons*

F. For forskningsprojekter suppleres med:

- Redegørelse for nationale og internationale samarbejdsrelationer til offentlige og private forskningsmiljøer, erhverv m.m.
Ingen
- Redegørelse for forskeruddannelse herunder tilknyttede gæsteforskere og udstationering.
- *PhD uddannelse af Mia Ryssel, KU Life. Gæsteforsker på DTU fra Ægypten, Mohamed Samir Dawish*
- Et resume på engelsk (maks. 1 A4-side).
The dairy industry would benefit tremendously from validated predictions of downstream effects during maturation from early intracellular events detected immediately after inoculation. In the present project we have investigated the effect of early up-regulation of the GTP biosynthetic enzyme GuaB, that was detected in an earlier project funded by the Danish dairy research foundation. A mutant expression library was constructed with fixed levels of guaB transcription. We found a saturation type relation between the GuaB expression level and growth rate showing that the growth rate is highly dependent upon a sufficient level of GuaB, but that higher levels are neither beneficial nor detrimental. The intracellular GTP pool was found to be dependent on the GuaB enzyme level at even higher levels than in the wildtype. This is in accord with previous findings that lactococci are slightly starved for purine nucleotides. Acidification tests with mutants with 41% or 14% GuaB levels (GuaB41 and GuaB14, respectively) showed that acidification was impaired in GuaB14. Long term survival on agar plates (presumable in an acidified state) was increased in both GuaB41 and GuaB14, suggesting an increased acid tolerance.
Acid tolerance was analyzed in various mutants in the purine interconversion and salvage pathway. It was found that acid resistance was severely decreased if the cells were grown in the presence of a purine source that could be converted to GMP (and thereby to GDP and GTP). Thus lactococci are inherently GTP starved and acid resistant, but become sensitive in the presence of higher GTP pools. A transcriptome

analysis during transit into GTP starvation, induced by decoyinine inhibition of GTP synthesis, showed up-regulation of genes in GTP metabolism and in NAD⁺/NADH metabolism.

G. Redegørelse for projektets perspektiver:

Redegørelse om forventningerne til det udviklede produkt herunder for eventuelle økonomiske forventninger, f.eks. om der forventes påbegyndt en egentlig produktion af det udviklede produkt eller påbegyndt en generel markedsføringsindsats.

Ingen økonomisk relevans

H. Projektets økonomiske forløb:

- Er der afvigelser i forhold til de opstillede budgetter?
Kun tidsmæssige afvigelser
- Ved samarbejdsprojekter redegøres for om alle parter har opfyldt deres økonomiske forpligtigelser? Eventuelt afvigelser i forhold til tilsagnet hos en eller flere projektparter forklares.
- *Alle økonomiske forpligtelser er opfyldt*

I. Liste over publikationer mm., der er et direkte resultat af projektet:

- Artikler i internationalt anerkendte tidsskrifter, indlæg ved kongresser, symposier o.lign., faglige artikler eller anden formidling, f.eks. mødeindlæg, åbent hus m.m. eller eventuelle planlagte publikationer og artikler, som indsendes løbende, når de er accepteret.

Jessing, S., P. R. Jensen og M. Kilstrup. Control analysis of the purine biosynthesis in *Lactococcus lactis*. Poster præsenteret ved "5th Symposium on Food Microbiology" arrangeret af Levnedsmiddelcentret (LMC). Helsingør, den 22.-23. maj 2007.

Jendresen CB, Jessing SG, Haaber JB, Martinussen J, Kilstrup M. Homeostasis of intracellular GTP and ATP pools in *Lactococcus lactis* stains with lowered GMP flux Cold Spring Harbor meeting on Molecular Genetics of Bacteria & Phages, August 24 – 28, 2010

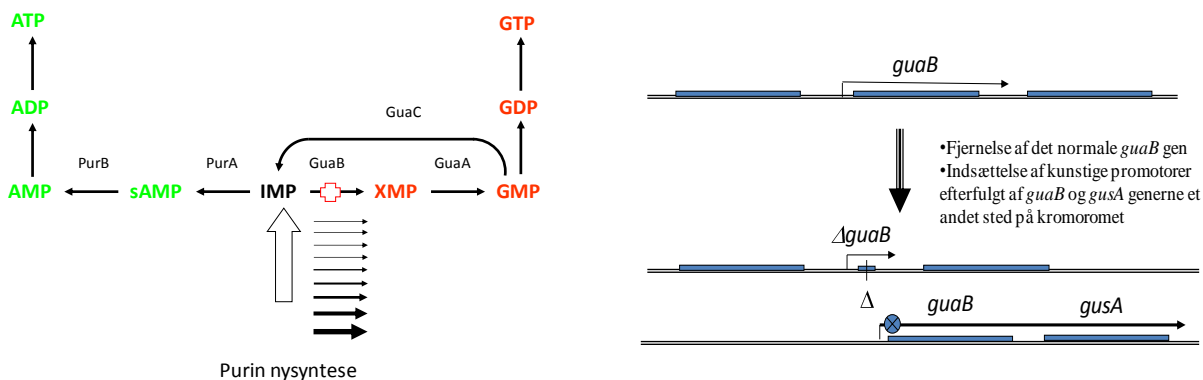
- Eventuelle afhandlinger vedlægges i ét eksemplar eller eftersendes, når de foreligger.

Ryssel M (2010). Investigation of the physiology of genetically modified strains of *Lactococcus lactis*, and their potential for accelerated ripening of cheese. PhD thesis, University of Copenhagen

J. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater (maks. 5 A4-sider):

Er opreguleringen af enzymer i GTP og ATP dannelsen umiddelbart efter podning af mælkekulturer vigtig for cellernes fysiologi?

Det ville være et stort ønske fra mejeriindustrien at kunne korrelere den tidlige bakterielle intracellulære tilstand (early events) i starten af en mælkefermentering med kvaliteten af det endelige produkt. Sådanne forudsigelser kunne anvendes til at justere på fermenteringsbetingelserne for at optimere produktet ud fra den givne situation. I et tidligere MFF støttet projekt blev det undersøgt hvorledes proteinprofilen i bakterien *Lactococcus lactis* ændrede sig fra den blev tilsat mælk, gennem den eksponentielle væksthase til den gik i stationær vækst på grund af nedsyrning. Det blev her rapporteret at de to enzymer PurA og GuaB samt mRNA niveauerne fra deres respektive gener *purA* og *guaB*, var specielt højt udtrykt i den tidlige lagfase, hvorefter de mindskedes gennem resten af fermenteringen (Larsen *et al.* 2006). I det nuværende projekt ønskede vi at undersøge om det høje udtryk af de to enzymer kunne være korreleret med en god fysiologisk tilstand som kunne medføre effektiv syring. Purin-forstadiet IMP er udgangspunktet for dannelsen af både GTP og ATP, og de to enzymer omdanner IMP til hvert sit mellemprodukt. PurA enzymet omdanner IMP til sAMP, som derefter i tre trin omdannes til ATP. På samme måde omdanner GuaB IMP til XMP, som derefter i tre trin omdannes til GTP. Omdannelserne kan ses på figur 1. For at forenkle projektet valgte vi imidlertid at fokusere på den højre side af syntesen, som syntetiserer G-nukleotiderne GMP, GDP og GTP.



Figur 1 (venstre). Syntesevejene fra IMP til ATP og GTP. Pilene mellem mellemprodukterne angiver enzymkatalyserede reaktioner. Krydset over GuaB reaktionen viser at vildtype *guaB* genet i dette projekt blev fjernet, og substitueret med GuaB reaktioner af forskellig effektivitet.

Figur 2 (højre). Konstruktion af *guaB* promoterbibliotek. Metoden er beskrevet i teksten.

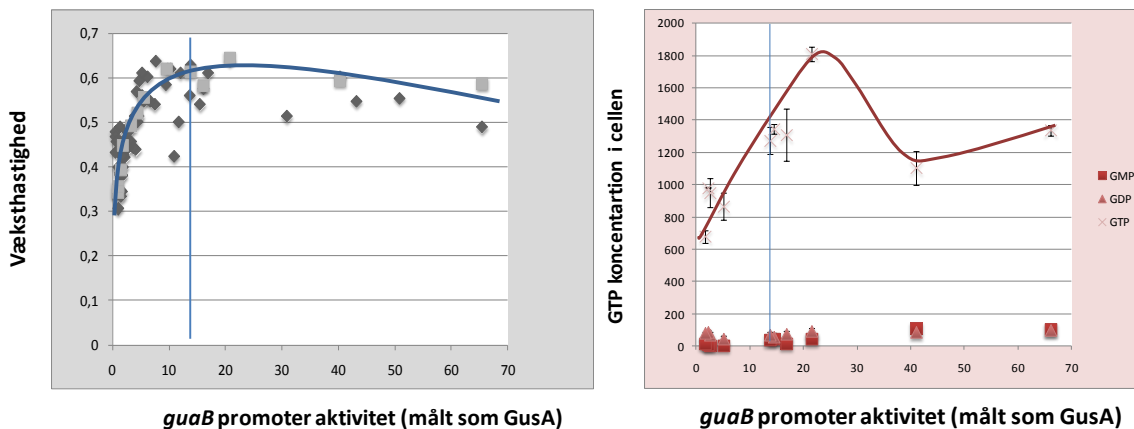
Projektet blev udført ad tre spor:

- Konstruktion af ekspressionsbiblioteker med fastlagte GuaB niveauer, samt undersøgelse af niveauets virkning på den fysiologiske tilstand.
- Analyse af GuaB's involvering i syrerensistens
- Analyse af laktokokkers respons på mangel af G-nukleotider

Konstruktion og analyse af ekspressionsbiblioteker med fastlagte GuaB niveauer.

Metoden hvorpå vi konstruerede et GuaB ekspressionsbibliotek var ved hjælp af Jensen og Hammer's (1998) promoterteknologi. Promotorer med forskellig styrke kan syntetiseres kunstigt med tilfældige DNA sekvenser på strategiske steder. Promoterstyrken bestemmer hvor ofte genet

udtrykkes og dermed hvor meget af det kodede protein der dannes i cellen. I projektet fjernede vi først det normale *guaB* gen fra kromosomet ved genetisk overkrydsning med et PCR fragment der manglede *guaB* genet. Processen ses i figur 2. Derefter blev der konstrueret et *guaB* promoterbibliotek ved at koble tilfældigt genererede promotorer foran *guaB* genet og indsætte dem på kromosomet foran et *gusA* rapportergen i integrationsstedet for bakterievirusen TP901-1. De forskellige promotorer bestemmer derved aflæsningen af både *guaB* genet og *gusA* genet, så vi kunne udvælge bakterier fra biblioteket med en stor spændevide af promoterstyrker ud fra deres mængde af GusA enzymet som let kan kvantificeres med en farvereaktion i levende celler. Et udvalg af bakteriestammer med forskellige GuaB niveauer blev analyseret med hensyn til væksthastighed og syringseffektivitet. Figur 3 viser en lille del af de opnåede resultater med hensyn til væksthastighed og metabolitkoncentrationer. Det ses at en GuaA aktivitet der ligger over vildtypeniveauet (angivet ved den blå lodrette streg i figur 3) ikke medfører nævneværdige ændringer i væksthastigheden, medens væksthastigheden falder drastisk når GuaA niveauet falder under vildtypeniveau. På figur 4 kan det ses at den maksimale GTP koncentration kræver et GuaA niveau på over det dobbelte af vildtypeniveauet. Dette passer med tidligere rapporter om at laktokokker er svagt sultede for puriner.



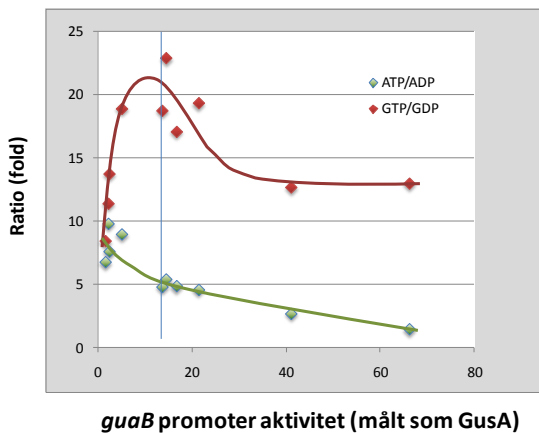
Figur 3 (venstre). Sammenhæng mellem væksthastighed og *guaB* ekspression for et udvalg af stammer fra promoterbibliotek. Væksthastighed og GusA aktivitet blev målt individuelt på de enkelte stammer. Promoteraktiviteten i vildtypen er angivet med en blå lodret streg.

Figur 4 (højre). Sammenhæng mellem GTP koncentration i cellen og *guaB* promoteraktivitet. Promoteraktiviteten i vildtypen er angivet med en blå lodret streg

Af særlig interesse er sammenhængen mellem GuaB aktiviteten og GTP/GDP samt ATP/ADP forholdene, som ses på figur 5. Et stort ATP/ADP forhold fortæller at cellerne kanalisere megen energi ind i ATP, og tilsvarende angiver et højt GTP/GDP forhold at cellerne kanalisere energien ind i GTP. Som det ses kanalisere cellerne mindre og mindre energi ind i ATP med stigende GuaB niveau, hvorimod kanaliseringen ind i GTP har et maksimum omkring vildtype niveauet. Det kunne altså se ud som om *Lactococcus* prioriterer GTP som energikilde under normale forhold. Disse resultater er ved at blive skrevet sammen til en publikation i et internationalt peer-reviewed tidsskrift.

Tre af stammerne fra denne analyse, med GuaB niveauer på henholdsvis 100% (GuaB100), 41% (GuaB41) og 14% (GuaB14) blev analyseret med hensyn til syrningshastighed i mælk og langtidsoverlevelse på agarplader uden purinkilde. Det blev fundet at syrningshastigheden af GuaB100 og GuaB41 var næsten identiske medens hastigheden faldt til halvdelen med GuaB14 stammen. Dette kunne skyldes at GuaB14 bakterierne vokser meget langsomt i mælk der ikke indeholder en purinkilde. Antallet af døde bakterier efter fem dage på agarplader uden purinkilde blev analyseret med fluorescensmikroskopi. Cellerne blev farvet med live/dead staining, som detekterer intakte cellemembraner. Næsten hver anden GuaB100 bakterie var død efter de fem dage,

men for GuaB41 og GuaB14 døde under en femtedel. Det er tilsyneladende en fordel for bakterierne at sulte for GTP når de skal overleve i et nedsyret medium. Væksthastigheden på agarpladerne blev sideløbende analyseret ved mikroskopi, og det sås at væksthastigheden var stærkt korreleret med GuaB niveauet. Disse resultater er beskrevet i Mia Ryssels PhD afhandling (Ryssel 2010).



Figur 5 Sammenhæng mellem ATP, ADP, GTP og GDP metabolitkoncentrationer og *guaB* promoteraktivitet. I grafen ses forholdet mellem koncentrationerne af ATP og ADP (blå) samt GDP og GTP (rød).

Det intracellulære GTP-niveaus indvirkning på syrestress resistens.

Ovenfor blev det vist at overlevelsen under nedsyrede forhold steg under mangel på GTP. Dette fik os til at rette opmærksomheden mod den såkaldte multistressresistens fænotype, som kan opstå i mutanter der sulter for GTP (Duwat *et al* 1999). Når laktokokker vokser i rigt medium såsom M17 er de moderat sensitive til varme, syre, oxidativ stress og andre stress faktorer. Duwat *et al* (1999) fandt at mutanter i en række gener, herunder mutanter i GTP metabolismen opnåede forøget resistens til alle de forskellige stressfaktorer. Det blev også vist, at tilsætning af et specifikt antibiotikum, decoyinine, som hæmmer GuaA enzymet (se figur 1) medfører multistressresistens under vækst på rigt medium.

Disse publicerede data stemmer godt overens med vores påvisning af en forøget overlevelse af GuaB14 mutanten under nedsyrede forhold. Derfor iværksatte vi en stor analyse af syrestress resistens af mutanter i purin-metabolismen under en lang række dyrkningsforhold. Den vigtigste konklusion fremkom meget hurtigt, nemlig at laktokokker som udgangspunkt allerede er multistress-resistente i medier hvor der ikke findes en purinkilde. Den multistressresistente fænotype er altså et artefakt, som fremkommer når laktokokker vokser på det rige M17 medium. Vi kunne genskabe den multistress-sensitive fænotype ved at tilsætte en purinkilde til vores kemisk definerede SA medium (Jensen & Hanner 1993). Den omfattende analyse af G-nukleotid induceret syrestress-sensitivitet som er beskrevet i Mia Ryssels PhD afhandling (Ryssel 2010) kan opsummeres til den simple konklusion: *Syrestress bliver induceret hvis en purinkilde kan omdannes til GMP, GDP eller GTP.* Vi har dog stadig et problem med at vise at der kræves omdannelse af purinbaserne guanin og hypoxanthin til GMP, for at kunne inducere syrestress-sensitivitet; men vi antager at det skyldes at de anvendte mutanter har opsamlet kompensatoriske mutationer som forvirrer resultaterne.

Det intracellulære GTP-niveaus indvirkning på cellens transkriptom.

Efter at have påvist at GTP (GDP eller GMP) niveauet er vigtig for induktion af syresensitivitet ønskede vi at opklare hvordan cellen responderer på G-nukleotid stress. For at opnå information om ændringer i hele cellens fysiologi analyserede vi udtrykket af alle cellens gener ved hjælp af en total-genom DNA mikroarray transcriptomanalyse. Tidligere havde vi udført en proteomanalyse under GTP mangel (Beyer *et al* 2003), hvor vi analyserede syntesehastigheden af alle de proteiner der kunne adskilles og visualiseres på en 2-dimensionel gel. Vi havde behandlet cellerne med decoyinine og via hæmningen af GuaA enzymet induceret en delvis G-nukleotid sult. Flere proteiner viste sig at

være kraftigt opregulerede under disse forhold, heriblandt GuaB og GuaA enzymerne. Det var derfor klart at der måtte eksistere et reguleringssystem som kan måle GTP niveauet og ændre udtrykket af specifikke gener; men det var ikke klart om systemet virkede direkte på transkriptionen af generne. Der blev foretaget et nyt eksperiment hvor tre parallelle bakteriekulturer i GSA medium blev vokset balanceret i ti generationer. På et givent punkt i deres væksthase blev hver af kulturerne behandlet med decoyinine så deres væksthastighed gik ned til en tredjedel. Prøver til RNA ekstraktion blev udtaget både umiddelbart før og ti minutter efter tilsætningen af decoyinine, så vi kunne detektere de tidligste ændringer. Resultatet af transkriptomanalysen, som blev foretaget på DTU DNA microarrayfacilitet (DMAC), var at de fleste gener forblev uændrede (som forventet), men at en række gener var kraftigt opregulerede under G-nukleotid sult, og en række gener var nedregulerede. De opregulerede gener kunne opdeles i to klasser: i) gener som kunne direkte hjælpe med at kanalisere purinfluxen mod GTP (*add*, *guaA* og *guaB*), og ii) gener involveret i omdannelsen af NADH til NAD⁺ (*noxE*, *trxH*, *pyrDa*, *nrdF*). Den sidste klasse blev mere forståelig da vi kobled informationen sammen med GuaB's enzymkatalyserede reaktion: $IMP + NAD^+ \leftrightarrow XMP + NADH$. Opreguleringen af NAD⁺ producerende enzymer medførte således at GuaB enzymet kunne foretage omdannelsen af IMP hurtigere. For at validere resultaterne fra transkriptomanalysen blev der konstrueret promotorfusioner til *lacLM* genet, som blev integreret i kromosomet af *L. lactis* stammen MG1363. Promotorerne foran generne *guaA*, *guaB*, *trxH-noxE* og *pyrDa* var alle opreguleret under GTP-mangel medens kontrolgenet *pyrDb* ikke viste opregulering. De kraftigst nedregulerede gener kunne også opdeles i to kategorier: iii) gener i pyrimidinmetabolismen (*pyrC*, *pyrDb*, *pyrE*, *pyrF*) og iv) gener i phosphat-metabolismen (*phn DCB*) Disse resultater er ved at blive skrevet sammen til en publikation i et internationalt peer-reviewed tidsskrift.

Selektion og analyse af transposon-mutanter som har ændret regulering af *guaA* promotoren.

Da vi havde fundet at *guaA* promotoren var kraftigt opreguleret under GTP-sult forsøgte vi at screene for mutationer på kromosomet, som indvirkede på udtrykket af vores *guaA-lacLM* fusion. Dette kunne gøres på en enkel måde ved at vokse bakterierne på GM17 agarplader i tilstedeværelsen af stoffet X-gal som omdannes af beta-galactosidase enzymet til det blå stof "X". Mængden af beta-galactosidase bestemmes af promotoren foran *lacLM* genet, så mutanter med opregulering af *guaA* genet dannede kolonier med kraftigere blå farvereaktion. En sådan mutant havde integreret en transposon i et gen som kunne identificeres som gen nummer 991 på genomsekvensen (llmg_0991). Genet var ved sammenligning til andre gener blevet annoteret som et gen med ukendt regulatorisk funktion. Mutanten groede næsten normalt på rigt GM17 medium, men kunne næsten ikke gro på det kemisk definerede GSA medium. En gennemgribende fænotypisk analyse med Biolog-systemet (dog uden dobbeltbestemmelse) tydede på at mutanten manglede phosphat, hvilket efterfølgende kunne eftervises i kolber med GSA medium. Analysen gav dog aldrig information nok til at kunne finde de tilføjelser som kunne give fuld væksthastighed i GSA medium.

En foreløbig transkriptomanalyse (enkeltbestemmelse) på total-genom DNA mikroarray viste at når mutanten og vildtypen blev groet i GM17 medium var en række gener opreguleret i mutanten. Det drejede sig mest om gener involveret i fructose-metabolismen, men også ribosomale gener var opreguleret. Af størst interesse var imidlertid de nedregulerede gener, hvor gener involveret i phosphat-metabolismen var kraftigt repræsenteret. Vi forestiller os at det DNA bindende protein, som er kodet af llmg_0991 genet er en vigtig komponent i phosphat-reguleringen i *L. lactis*. Ingen af de kendte phosphatregulatorer fra andre bakteriegrupper er til stede i *L. lactis*. Disse præliminære resultater kræver flere eksperimenter før de kan publiceres.

Konklusion.

Vi har vist at

- GuaB genet og syntesevejen for GMP, GDP og GTP (G-nukleotider) er vigtig for cellens fysiologi og overlevelse under stressende omstændigheder.
- Sult for G-nukleotider er nødvendig for syrestres-resistens
- Sult for G-nukleotider medfører op-regulering af syntesevejens gener samt af gener involveret i NAD⁺ dannelse
- Sult for G-nukleotider medfører ned-regulering af gener i pyrimidinbiosyntesen og fosfat-metabolismen
- En mutant i genet limg-0991 medfører nedregulering af gener i fosfat-metabolismen og kræver tilførsel af fosfat

Vi har ikke vist

- Om induktion af syrestres-resistens er koblet til det reguleringsystem der kontrollerer G-nukleotid induceret op- og ned-regulering af gener.
- Om limg_0991 genet er involveret i syrestres-resistens

Referencer:

- Beyer NH, Roepstorff P, Hammer K, Kilstrup M. (2003).** Proteome analysis of the purine stimulon from *Lactococcus lactis*. *Proteomics*. 3(5):786-97.
- Duwat P, Ehrlich SD, Gruss A. (1999)** Effects of metabolic flux on stress response pathways in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol*. 31(3):845-58.
- Jensen PR, and Hammer K (1993)** Minimal Requirements for Exponential Growth of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*. 59(12): 4363-4366
- Jensen PR, Hammer K. (1998).** Artificial promoters for metabolic optimization. *Biotechnol Bioeng*. 58(2-3):191-5.
- Larsen N, Boye M, Siegumfeldt H, and Jakobsen M (2006).** Differential Expression of Proteins and Genes in the Lag Phase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Grown in Synthetic Medium and Reconstituted Skim Milk. *Appl Environ Microbiol*. 72(2): 1173–1179
- Ryssel M (2010).** Investigation of the physiology of genetically modified strains of *Lactococcus lactis*, and their potential for accelerated ripening of cheese. PhD thesis, University of Copenhagen

9. Underskrifter og dato (suppleret med navn, titel og institution/virksomhed i
blokbogstaver):

_____ den _____
Kim Tram Sørensen, Chefkonsulent, Mejeribrugets ForskningsFond

_____ den _____
Henrik Siegumfeldt, Lektor, Institut for Fødevarevidenskab, KU-Life

_____ den _____
Mogens Kilstrup, Docent, Center for System Mikrobiologi, DTU-Systembiologi

_____ den _____
Søren Lillevang, Arla Foods amba
