

Afslutningsrapport

Karakterisering af bakteriofagresistensmekanismer
i *Lactococcus lactis*

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1999-24

April 1999



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport.

**”Karakterisering af bakteriofagresistensmekanismer i
Lactococcus lactis”**

Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet,
KVL,
Rolighedsvej 30,
1958 Frederiksberg C
Marts 1999

”Karakterisering af bakteriofagresistensmekanismer i *Lactococcus lactis*”

Projektleder

Lektor cand. scient. Ph.d. Jytte Josephsen

Medarbejdere

Forskningsassistent cand. polyt. Annette Madsen	01.09.95- 29.02.96
Forskningsadjunkt M.s. ph.d. Nadezda Matvienko	24.06.96- 30.11.98
Laborant Gitte Brandt	01.11.95- 29.02.96
Laborant Dorte Overgaard Jensen	01.06.96- 31.01.98
Laborant Camilla Friis	01.01.97- 30.11.98
Laborant Mikkel F. Jacobsen	01.07.98- 31.12.98

Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet, KVL, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C

Tlf. 35 28 32 32. Fax: 35 28 32 14. E-mail: jjoseph@mli.kvl.dk

Forord:

Medarbejderne på projektet vil gerne takke Mejeribrugets ForskningsFond og Strukturdirektoratet for økonomisk støtte til projektet. Vi vil også takke styregruppen og Mejeriforeningen for den udmærkede opbakning og de gode diskussioner, der har været under hele projektet. Endvidere vil jeg takke levnedsmiddelpraktikant Jannie Nielsen, MLI, for udførelsen af syrningshæmningsforsøgene.

Resumé

Ved fremstilling af en lang række fermenterede mælkeprodukter er det nødvendigt at benytte mælkesyrebakteriestarterkulturer, som er fagresistente. Disse kan konstrueres ved man fører naturligt forekommende plasmider, som koder for fagresistens mekanismer, ind i udvalgte bakterierne. I dette projekt var det målet at identificere og karakterisere to forskellige plasmidkodede fagforsvarsmekanismer i *Lactococcus lactis*.

Plasmiderne pJW566 og pAW601 fra henholdsvis *L. lactis* W56 og W60 blev identificeret som kodende for forskellige slags fagresistensmekanismer. *L. lactis* W56 og W60 er tidligere blevet isoleret fra en dansk Cheddar kultur. Det ene plasmid, pAW601, koder for en mekanisme, benævnt abortiv infektion, som hæmmer isometrisk-hovede fager (de hyppigst forekomne fager på danske mejerier) i deres udvikling. DNA sekvensen for hele plasmidet er blevet bestemt. Analyse af de 4755 basepar tyder på at plasmidet ikke koder for andre proteiner end det protein, som sørger for replikation af plasmidet og måske et lille protein med høj lighed med et fagprotein, hvis funktion ikke kendes. Derudover havde DNA sekvensen stor lighed med en DNA sekvens fra fag sk1 som formodes at være involveret i pakning af fagen. Det er således første gang man har fundet en abortiv infektionsmekanisme, som ikke involverer et protein.

Det andet plasmid, pJW566, er ca. 25 kbp stort. Det koder for et restriktions-modifikations (R-M) system, *LlaBIII*, som hæmmer fagen ved at klippe dens DNA i stykker. Systemets effektivitet overfor forskellige fager er blevet bestemt. De gener, som koder for systemet, er blevet identificeret og DNA sekvensen af dem er blevet bestemt. Analyse af sekvensen tyder på at systemet adskiller sig fra de tre klassiske typer af R-M systemer.

Der er blevet foretaget syrningshæmningsforsøg, som viser at *L. lactis* MG1614 med pAW601, pJW566 eller begge plasmid er bedre istand til at overleve et fagangreb end *L. lactis* MG1614 uden plasmider.

Summary

Lactic acid bacteria have to be resistant towards bacteriophages when they are used for production of fermented milk products. Phage resistant bacteria can be constructed by introduction of naturally occurring phage resistant mechanisms encoding by plasmids into selected bacteria. The aim of this project was to identify and characterise two different plasmid-encoded phage defence mechanisms from *Lactococcus lactis*.

Plasmids pJW566 and pAW601 from *L. lactis* W56 and W60, respectively, were identified as encoding different phage resistant mechanisms. W56 and W60 have previously been isolated from a Danish Cheddar culture. Plasmid pAW601 encodes a mechanism named abortive infection. Strains carrying this plasmid inhibit isometric-headed phages (the most frequent phage on Danish Dairies) in their development. The complete DNA sequence of plasmid pAW601 has been determined. Analysis of the 4755 basepair revealed no other putative orfs than one involved in replication and a small orf with high homology to orf 46 in phage sk1. The function of orf 46 is not known. Furthermore, the DNA sequence had high homology to a area in phage sk1 believed to be involved in packaging of phage DNA. This is the first time a abortive infection mechanism has been found not to consist of a protein.

The size of the other plasmid, pJW566, is about 25 kbp. It encodes a restriction-modification (R-M) system, *LlaBIII* that inhibit the phage by cutting its DNA into pieces. The efficiency of plating has been determined for different phages. The putative genes have been identified and sequenced. Analysis of the sequence indicates that the system belong to type III R-M systems.

L. lactis MG1614 with and without plasmids pAW601 and pJW566 have been grown in milk in the presence of phage sk1. It was found that bacteria MG1614 harbouring both plasmids was better protected against phage sk1 than MG1614 with only one plasmid or without any plasmids.

Formål:

Karakterisering af et plasmidkodet ikke-type II restriktion/modifikation (R/M) system og af et plasmidkodet infektion (Abi) mekanisme. Alle plasmider skal isoleres fra *Lactococcus lactis* stammer.

Baggrund:

Mælkesyrebakterier benyttes industrielt til fremstilling af en lang række fermenterede levnedsmidler blandt andet ost. Ved udnyttelse af mælkesyrebakterier (laktokokker) som starterkulturer til ostefremstillingen kan bakteriofagangreb være en både meget alvorlig og bekostelig forstyrrelse. Da det ikke er muligt helt at udelukke fagerne fra mejerierne, er det nødvendigt at benytte starterkulturer, som er fagresistente. Disse kan man enten isolere fra eksisterende starterkulturer eller man kan forsøge at gøre starterkulturer mere fagresistente. Man har kun fundet meget få bakterier, som både har gode syrningssegenskaber og er fagresistente. Traditionelt har man derfor med varierende succes forsøgt at gøre starterkulturer fagresistente ved at udsætte dem for en stor mængde af fager. Udviklingen af de nye DNA teknikker har imidlertid åbnet mulighed for at man kan føre plasmider, som koder for fagresistens mekanismer, ind i udvalgte starterkulturer og derved gøre dem mere fagresistente. Hvis man vælger denne sidstnævnte metode er det derfor nødvendigt at isolere og karakterisere fagresistensmekanismer fra mælkesyrebakterier. Råder man over mange forskellige fagresistensmekanismer, har man mulighed for at kunne konstruere isogene stammer, dvs. stammer som kun adskiller sig fra hverandre med hensyn til indhold af fagforvarsmekanismer. Hvis en stamme hænges af fager kan man udskifte den med en isogen stamme og derved stadig få samme produkt. Dette har man ikke haft mulighed for at kunne gøre før.

Der er identificeret fire forskellige slags af naturligt forekommende fagresistensmekanismer i *Lactococcus lactis*: 1) adsorptions hæmning, 2) hæmning af fag DNA injektionen, 3) restriktion/modifikation (R/M) og 4) abortiv infektion (Abi) (Josephsen and Neve, 1998). Adsorptions hæmning(1) hæmmer ofte optagelsen af nødvendige substrater, hvorved bakterien hænges i dens vækst. Mekanismen (2), som hæmmer fag DNA injektionen, er kun fundet på et eneste plasmid. Abi (4) er en mekanisme, som hæmmer fagen et eller andet sted i dens udvikling. R/M (3) virker ved at den klipper fagens indtrængende DNA i stykker, hvorved fagen uskadeliggøres. Sidstnævnte mekanisme er meget udbredt i laktokok stammer. Ved undersøgelse af *Lactococcus lactis* og andre bakterier har man

fundet at R/M systemer kan grupperes i mindst tre forskellige typer, I, II og III. Der er især blevet fokuseret på type II systemerne, idet de er de simpleste og er grundlaget for DNA teknologien.

I *Lactococcus lactis* er fire forskellige plasmidkodede type II R/M systemer, *LlaDCHI* (Moineau *et al*, 1995), *LlaBI* (Nyengaard *et al*, 1996), *LlaCI* (Madsen and Josephsen, 1998a) and *LlaDII* (Madsen and Josephsen, 1998b) blevet isoleret og karakteriseret. Derudover har man fundet et type I, *Lla2614I* (Schouler *et al*, 1998), og et type III R/M system, *LlaFI* (Su *et al*, 1999) udover et system, *LlaI*, som ikke kan klassificeres (O'Sullivan *et al*, 1995)

Resultater

Identificering og isolering af et R/M kodende plasmid.

L. lactis W56, der har syv plasmider, er tidligere blevet isoleret fra den udefinerede flerstamme Cheddar starterkultur TK5 (Josephsen and Nielsen, 1988). Total plasmid DNA fra *L. lactis* W56 blev isoleret og co-transformet med et markør plasmid, som medfører resistente til chloramphenicol, ind i den fag-sensitive, plasmid-fri stamme *L. lactis* MG1614. Undersøgelse af de forskellige transformanter viste, at *L. lactis* W56 indeholder mindst tre plasmider, pJW563, pJW565, and pJW566, som koder for forskellige R/M systemer (Josephsen and Vogensen, 1989). Transformanterne blev kureret for markørplasmidet. *LlaBI*, på plasmid pJW563 blev først klonet og sekventeret (Nyengaard *et al*, 1995). Det koder for et type II R/M system, som genkender sekvensen 5'-CTRYAC-3' (Nyengaard *et al*, 1993, 1995). R/M systemet *LlaBII*, på plasmid pJW565 er nu også blevet klonet og sekventeret (Nellemann *et al*, 1999). Det koder for et R/M system hvis type det ikke har været muligt at fastlægge ud fra sekvensen. Ingen af *L. lactis* stammerne med plasmid pJW565 eller pJW566 udtrykte type II endonuklease aktivitet. Plasmid pJW566 blev udvalgt til dette projekt. Et område, som sørger for replikation af plasmidet, er forhen blevet identificeret på plasmid pJW566 (Gravesen *et al*, 1997).

***In vivo* karakterisering af R/M systemet.**

R/M systemet *LlaBIII* er blevet karakteriseret ved at bestemme hvor meget dets tilstedeværelse i den ellers plasmid-fri stamme *L. lactis* MG1614 hæmmer udviklingen af fager. Dette gøres ved at bestemme effieciency of plating (EOP), som er forholdet mellem koncentrationen af fager på den udvalgte stamme (her *L. lactis* MG1614[pJW566]) og koncentrationen på den stamme, som fagen er

opformeret på (her *L. lactis* MG1614). Jo lavere EOP (efficiency of plating) er des bedre virker systemet. EOP for de små isometrisk hovede fager blev bestemt til følgende: fag p2 = 2×10^{-3} , fag jj50 = 5×10^{-3} , og for fag sk1 = 3×10^{-2} . EOP for den prolate hoved fag c2 blev bestemt til 3×10^{-3} . Der er således ikke den store forskel på hvor effektivt plasmid pJW566 i *L. lactis* MG1614 restrikerer de forskellige fager og effektiviteten er rimelig (EOP er normalt mellem 10^{-1} - 10^{-5}).

Da plasmid pJW566 er ret stort (25 kb) kan det ikke udelukkes, at det koder for andre fagresistensmekanismer end det ovennævnte R/M system *LlaBIII*. Det blev derfor undersøgt om tilstedeværelsen af plasmid pJW566 påvirker adsorptionen af fager til cellen. Dette fandtes ikke at være tilfældet, da adsorptionen af fag p2 og sk1 til *L. lactis* MG1614 med og uden plasmid pJW566 er ca. den samme. Det blev undersøgt om plasmid pJW566 også indeholder en abortiv infektion mekanisme, da man har fundet at nogle plasmider indeholder både et R/M og abortiv infektion system. Abortiv infektion mekanismer formindsker som regel fagernes burst size. Burst size er et mål for hvor mange fager, der bliver udviklet efter infektion med en fag. I tabel 1 kan ses hvorledes plasmid pJW566 påvirker burst size af fag sk1.

Tabel 1. Burst size, latenstid og ECOI (antallet af infektiøse centre) af fag sk1 på *L. lactis* MG1616 med og uden plasmid pJW566.

Stamme	<i>L. lactis</i> MG1616	<i>L. lactis</i> MG1616 [pJW566]
Burst size	100	95
Latens tid	37 min	35-40 min
ECOI		0,1

Det ses at burst sizen og latenstiden for fag sk1 ikke påvirkes af tilstedeværelsen af plasmid pJW566, hvilket indikerer at plasmidet ikke koder for en abortiv infektions mekanisme. ECOI for fag sk1 er 0,1, dvs at kun 10% er i stand til at inficere *L. lactis* MG1614 [pJW566].

Det blev også undersøgt om man kunne transformere plasmid pJW566 ind i den plasmid-fri og fagsensitive stamme *L. lactis* IL1403, hvis subspecie er *lactis* i modsætning til MG1614, som er *cremoris*). 350 transformanter blev undersøgt, men ingen havde modtaget plasmid pJW566.

Biokemisk karakterisering.

R/M systemer karakteriseres ved at blandt andet at bestemme hvilke cofaktorer (AdoMet, ATP, Mg^{2+}) som endonukleasen kræver for at kunne virke. De tre forskellige typer af R/M systemer har forskellige krav. Når man har fået udformet et assay til bestemmelse af enzymets aktivitet, kan man derefter forsøge at oprense enzymet.

Restriktionsendonukleasen.

Celleekstrakt blev fremstillet fra stammen *L. lactis* MG1614 [pJW566] ved at cellerne blev opløst i buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25% sukrose, 5 mM EDTA, 100 μ M PMSF, 3mM DTT), og lyseret i en French presse. Efter centrifugering (30.000g i 30 min og 200.000g i 2 timer) blev supernatanten undersøgt for endonukleaseaktivitet. Forskellige kombinationer af ATP (2mM), AdoMet (0,2 mM) og Mg^{2+} (10 mM) blev tilsat. Både methyleret og umethyleret λ DNA, samt plasmid pJW566 DNA blev anvendt som substrat. Forsøget blev gentaget, men begge gange blev der ikke observeret nogen specifik nedbrydning af substratet. Co-faktor-kravene kunne derfor ikke bestemmes.

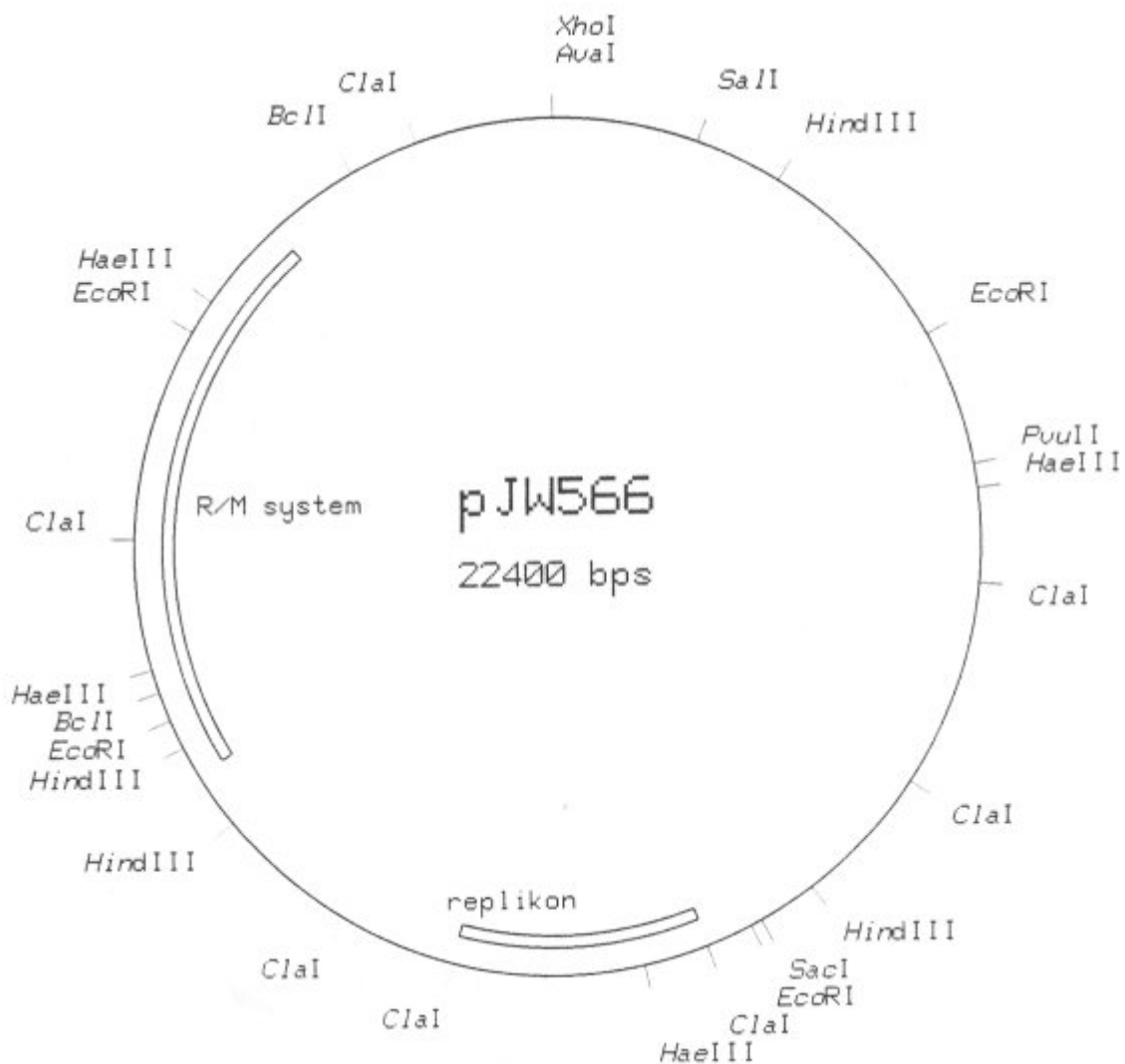
Oprensning af methylasen M-LlaBIII.

Det blev forsøgt om man ved hjælp af FPLC kromatografi kunne oprense methylasen M-LlaBII fra *L. lactis* MG1614 [pJW566]. *L. lactis* MG1614 blev medtaget som en negativ kontrol. Celleekstrakt blev efter centrifugering tilsat 50mM NaCl og sat på en kolonne (Q-Sepharose HP eller DEAE-Sepharose) ekvilibreret med buffer B (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 7 mM mercaptoethanol). Kolonnen blev elueret med en gradient fra 50-1000mM NaCl i buffer B. Tilstedeværelsen af methylasen i fraktionerne blev undersøgt ved at bestemme inkorporeringen af tritium i DNA med mærket substrat ([methyl 3 H] SAM). Aliquots af fraktionerne blev sat til reaktionsmixen, der bestod af 50 mM Tris-HCl 8.0, 10 mM MgCl 2, 0.5 mM DTT, 20 nM methyl- 3 H]SAM. Umethyleret lambda DNA blev anvendt som substrat. Type II methylaserne M-*EcoRI* and M-*HhaII* fra BioLabs blev anvendt som kontrol. Det var muligt at få inkorporering af tritium i DNA,

hvilket viser at det er muligt at bestemme methylaseaktiviteten. Imidlertid lå de fraktioner, som gav methylase aktivitet, mange forskellige steder ved oprensningerne, hvilket gør fortolkningen af resultaterne meget usikkert. Der blev ikke foretaget yderligere undersøgelser.

Molekylærbiologisk karakterisering.

Først blev der udfærdiget et restriktionskort over plasmidet. Dette blev gjort ved at fordøje plasmidet med et eller to restriktionsenzymmer. Restriktionskortet er vist i figur 1.



Figur 1. Restriktionskort over plasmid pJW566.

Derefter blev det undersøgt om man ved at indsætte et gen, som koder for antibiotikaresistens, kunne inaktivere genet for restriktionsenzymet. Restriktionssitene for *PvuII*, *SalI* og *XhoI* og *cat*-genet (som giver resistens til kloramfenikol) og *erm* genet (resistens til erythromycin) blev anvendt. Desværre lykkedes forsøgene ikke. Dernæst blev det undersøgt om man kunne klonе forskellige fragmenter af plasmid pJW566 i pBlueskriptIIISK(+) i *E.coli* XL-IBLue MRF'. Plasmid pJW566 blev skåret med følgende restriktionsenzymene: *DpnII*, *TaqI*, *ClaI* og *HindIII*, og *ClaI* og *HaeIII*. I alt 300 transformanter blev analyseret for insertioner ved hjælp af koloni PCR. 85 kloner er blevet sekventeret. Det lykkedes således at få sekventeret et område på pJW566, som ved homologiundersøgelser viste homologi til adeninmethylaser. Området blev derefter sekventeret ud fra kloner og ved hjælp af mærkede primere. Analyse af sekvensen tyder på at R/M systemet består af kun et protein, som til gengæld er stort (1648 aminosyrer). Foreløbige undersøgelser tyder på at delen, der er involveret i restriktion findes i den N-terminale del af proteinet. Så vidt vides er det første gang man har identificeret et R-M system, som kun består af ét protein.

Identificering og isolering af et Abi kodende plasmid.

Stammerne *L. lactis* W8, W9, W20, W59 og W60, der er isoleret fra TK5 starterkulturen (Josephsen and Nielsen, 1988) blev ved konjugation eller cotransformation. Undersøgt for indhold af plasmider, som i MG1614 gav små plaque med isometrisk-hoved fager. Der blev kun fundet et plasmid, som kunne dette. Plasmider, som koder for en abortiv infektions mekanisme, reducerer burst size og giver derfor små eller ingen plaque. Ingen af transformanterne indeholdt kun plasmid pAW601, men to transformanter havde udover markør-plasmidet kun et andet plasmid. Ved at kurere markørplasmidet og det andet plasmid ud lykkedes det at isolere en stamme, som kun indeholdt 4,7 kb plasmidet pAW601. Der blev også isoleret to varianter, som havde et ca.1 kb fragment, som giver resistens overfor kloramfenikol, indsat i et *HaeIII* (plasmid pCH1) eller et *SphI* site i plasmidet. Den prolat-hoved fag c2 blev ikke påvirket af pAW601's tilstedeværelse.

***In vivo* karakterisering af Abi systemet.**

Det blev undersøgt om plasmid pAW601 kunne restriksere fager ved at bestemme efficiency of plating

(EOP). Denne blev bestemt til 7×10^{-1} for fag sk1, 3×10^{-1} for fag p2 og 2.7×10^{-2} for jj50. Fager opformeret på *L. lactis* MG1614 med pAW601 blev stadig restrikeret hvilket indikerer at plasmidet ikke koder et R-M system. Desuden blev det fundet at adsorptionen af ovennævnte fager til MG1614 med og uden plasmid pAW601 var den samme (99-100%), dvs. plasmid pAW601 påvirker ikke adsorptionen.

Tabel 2. Burst size af de isometrisk hovede fager (p2, sk1 og jj50) i MG1614 uden og med pAW601/pCHI.

Fag	<i>L. lactis</i>		Reduktion af burst size (X)
	MG1614	MG1614[pAW601]	
p2	42	5	8
sk1	100-110	10	11
jj50	86	5	17

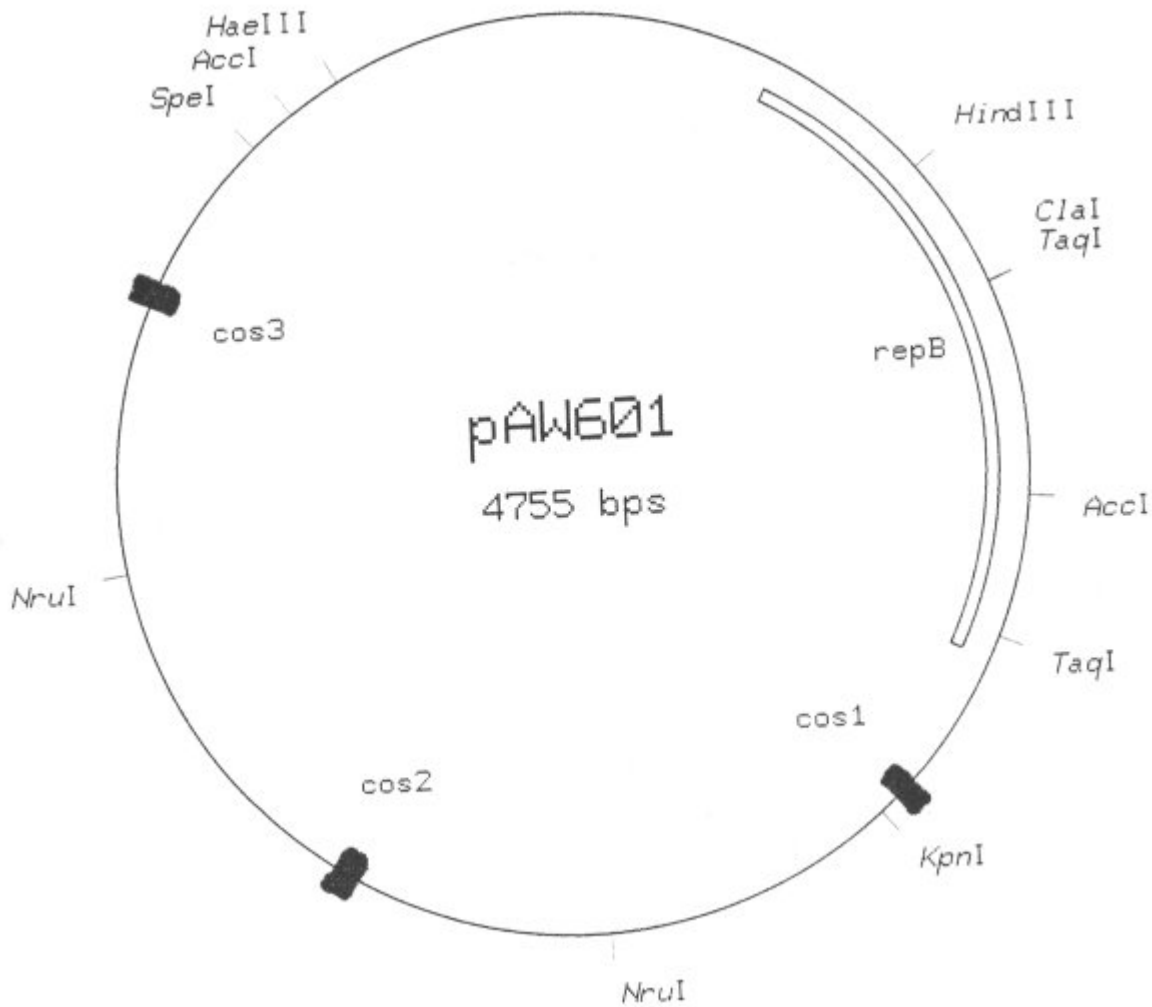
Burst size af den prolat-hovede fag c2 var den samme (124-134-154), for begge stammer.

Sammenligning af disse resultater med de tidligere resultater med *L. lactis* MG1614 viser, at det abortive infektions system på plasmid pAW601 reducerer burst sizen af de isometrisk hovede fager ca. 8-17 gange, mens det ingen indflydelse har på de prolat-hovede fager. Mekanismen på plasmin pAW601 kaldes AbiS. Sammenligning af resultaterne for plasmid pAW601 med resultaterne fra *L. lactis* MG1614 plasmid pCHI viser at indsættelsen af cat genet i plasmid pAW601 (\Rightarrow pCHI) ingen indflydelse har på AbiS-systemet.

Antallet af infektiøse centre (ECOI) på *L. lactis* MG1614 var for fag p2 = 0.2 - 0.3; og for fag c2 = 1. Dette betyder at for den isometrisk hoved fag p2 giver kun 2 til 3 ud af 10 fagangreb anledning til produktion af fager. Med den prolat-hovede fag c2 er tallet 10 ud af 10.

Molekylærbiologisk karakterisering af AbiS.

Først blev der udfærdiget et restriktionskort over plasmid pA W 601. Restriktionskortet er vist i figur 2.



Figur 2. Restriktionskort over plasmid pAW601.

Cat-genet, som giver resistens til kloramfenikol blev indsat i *SphI* og i *HaeIII* sitene, resulterende i henholdsvis plasmiderne pCS1 og pCHI. Indsættelse af *cat*-genet i disse to sites påvirkede ikke AbiS-fænotypen. Forskellige fragmenter blev klonet i pBlueskript IISK(+) i *E. coli* XL-IBLue MRF'. Hele plasmidet blev derefter sekventeret ud fra kloner, subkloner og ved hjælp af mærkede primere.

Plasmidet består af 4755 basepar. Analyse af sekvensen viser, at plasmidet kun indeholder to mulige læserammer (orf'er). Den ene orf har høj homologi til theta replikerende replikons (3) og sørger således for replikation af plasmidet. Den anden orf kan kun kode for et meget lille protein (67 aminosyrer). Dette hypotetiske protein har en vis homologi til orf46 i fag sk1. Imidlertid har den orf46-lignende orf ingen promotor med homologi til konsensus promotoren, hvilket kunne tyde på at der ikke dannes noget protein fra denne orf. For at undersøge om denne orf er nødvendig for AbiS fænotypen blevet 138 bp fragment i den formodentlige orf fjernet fra plasmid pCH1. Fagtitreringer på denne mutant gav små plaque, hvilket viser, at den "orf46"-lignende orf ikke er nødvendig for AbiS fænotypen. Resten af plasmidet indeholder gentagelser (repeats) af varierende længde. Tre steder på plasmidet er det således muligt at identificere områder, som har høj homologi til et område (*cos*-regionen) i fag sk1, som menes at være involveret i pakning af fagen (1). De tre steder, hvor der er homologi til *cos*-regionen er vist på figur 2. For at undersøge om man kan fjerne AbiS-fænotypen ved at eliminere et af de "*cos*"-lignende områder, blev området imellem de to *NruI* sites fjernet (se figur 2). Stammer med dette formindskede plasmid gav store plaque med fag sk1, hvilket viser, at den ikke længere havde AbiS-fænotypen. Vi antager, at de "*cos*"-lignede områder giver stammer, som har plasmid pAW601, en vis fagresistens ved at fange proteiner, som er nødvendige for fagens udvikling. Vi formoder, at plasmidet er blevet dannet ved at bakterien har taget en stykke af en isometrisk-hoved fags *cos*-region, kopieret det og inkorporeret det i et plasmid. Der blev også isoleret en mutant af fag sk1, som kunne overkomme AbiS mekanismen. Dens burst size blev bestemt til 110 på MG1614 og 105 på MG1416[pAW601]. Dette viser, at mutantfagen ikke blev hæmmet af Abi mekanismen på plasmid pA W601. Fagen blev ikke yderligere karakteriseret. Imidlertid kan man ved en mere grundig undersøgelse af mutantfagen, finde og karakterisere den mutation, som er opstået. Herved kan man få oplysninger om hvilket fagprotein, som AbiS påvirker og dermed noget om AbiS' virkningsmekanisme.

Undersøgelse af fag replikation *in vivo* i *Lactococcus lactis* MG1614 med og uden plasmid pAW601.

For at undersøge om AbiS mekanismen influerer på replikationen af fag sk1, blev denne undersøgt ved hybridiseringsforsøg. Replikationen af fag sk1 blev fulgt ved at der til forskellige tider blev udtaget prøver fra fagopformeringen i den sensitive stamme MG1614 og de resistente stammer MG1614[pAW601] og MG1614[pCH1]. Fagudviklingen blev fulgt i 90 minutter. Genomisk DNA blev

isoleret fra alle prøverne. DNA'et blev skåret med *HaeIII* restriktionsenzymet. Efter overførsel til membran blev DNA'et hybridiseret med fag sk1 DNA skåret med *HaeIII* og med det kromosomalt kodede gen for PIP (phage inhibitory protein) som prober. Resultaterne var ikke entydige.

Fagresistens i RIM og AbiS-bærende stamme

Det er blevet undersøgt om introduktion af det R/M kodende plasmid pJW566 og/eller det AbiS-kodende plasmid pAW601(pCH1) i den plasmid-fri stamme *L. lactis* MG1614 øger dennes fagresistens.

For at få en stamme, som indeholdt begge plasmider, blev det AbiS kodende plasmid pCH1 transformeret ind i *L. lactis* MG1614 [pJW566]. EOP og plaque morfologi af fag sk1 på *L. lactis* MG1614 med forskellige kombinationer af AbiS og *LlaBIII* kodende plasmider, blev bestemt. Resultaterne er vist i tabel 3.

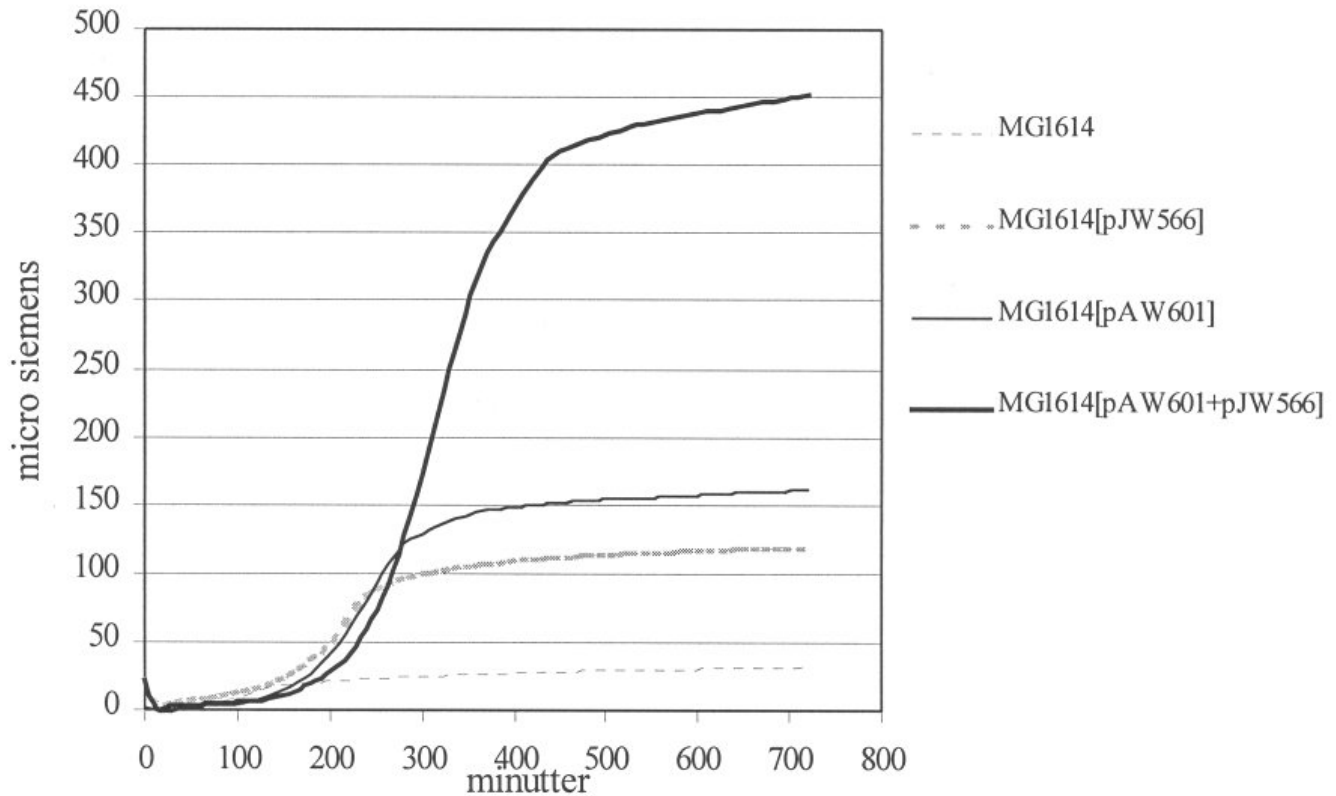
Tabel 3: EOP og plaque-størrelsen af fag sk1 på *L. lactis* MG1614 med og uden plasmiderne pAW601 og pJW566.

	<i>L. lactis</i> MG 1614 med plasmid:				
	Intet	pAW601	pCR1	pJW566	pJW566+pCR1
EOP	1	0.1-1	1	0.01	1.6×10^{-3} - 1×10^{-4}
Plaque størrelse	Store	Små	Små	Store	Små

EOP (efficiency of plating) er bestemt ud fra 2 uafhængige målinger.

Resultaterne viser, at *L. lactis* MG1614[pJW566+pCH1] er mere resistente imod fag sk1 end *L. lactis* MG1614 med ingen eller kun et af plasmiderne pJW566 eller pCH1. Effekten ser måske ud til at være større end summen af de enkelte plasmider. Der er også blevet foretaget vækstforsøg i mælk (rekonstitueret skummetmælk) med *L. lactis* stammerne MG1614, MG1614[pAW601], MG1614[pJW566] og MG1614[pCH1+ pJW566] med forskellige koncentrationer af fag sk1. Vækstforsøg i mælk blevet foretaget i et Malthus apparat ved kontinuert at måle ledningsevnen. I Figur 3 ses hvorledes væksten af *L. lactis* MG1614 stammen med og uden plasmiderne påvirkes af tilstedeværelsen af fag sk1 (8×10^3 fager/ml). Det ses, at plasmid pAW601 er bedre end plasmid pJW566 til at beskytte *L. lactis* MG1614 imod fagangreb af fag sk1.

L. lactis MG1614 med og uden plasmider i nærvær af fag sk1 ($8 \cdot 10^3$ pfu/ml)



Figur 3. Vækstforsøg med *L. lactis* stammerne MG1614, MG1614 [pAW601], MG1614[pJW566] og MG1614[pCH1+ pJW566] i nærvær af $8 \cdot 10^3$ pfu/ ml af fag sk1 i mælk. Forsøgene er blevet foretaget ved bestemmelse af ledningsevnen i et Malthus apparat.

Som forventet opnås den bedste beskyttelse når begge plasmiderne er tilstede i *L. lactis* MG 1614. Således hæmmes væksten af *L. lactis* MG1614 [pCH1 + pJW 566] ikke af tilstedeværelse af ca. 10^4 fager/ml. Også her ser det ud til at tilstedeværelsen af begge plasmider giver en større beskyttelse end summen af enkelte plasmider alene.

Konklusion

Plasmider kodende for to forskellige fagresistensmekanismer blev isoleret og karakteriseret. Plasmid pAW601 fra *L. lactis* W60 koder for en abortiv infektionsmekanisme, som kaldes AbiS. Plasmidet koder ikke for et protein, som er involveret i fagresistensen, men det koder for nogle gentagelser med høj lighed til DNA sekvenser i fag sk1, som antages at være involveret i pakning af fagen. Dette kunne tyde på, at bakterien har foretaget en udveksling af DNA med en lytisk fag af 936-arten og derved kunnet konstruere et nyt plasmid, som giver en vis beskyttelse imod fager.

Det andet plasmid pJW566, isoleret fra *L. lactis* W56, koder for et restriktions-modifikationssystem kaldet *LlaBIII*. Systemet er meget spændende, da det ser ud til kun at bestå af et eneste protein med 1648 aminosyrer og derfor ikke hører til nogen af de hidtil kendte typer af R/M systemer.

Resultaterne viser også, at det er muligt at konstruere mere fagresistente stammer ved at indføre disse to plasmider i den plasmid-fri stamme *L. lactis* MG1614. AbiS på plasmid pAW601 giver bakterier en bedre beskyttelse end R/M systemet *LlaBIII*, men den bedste beskyttelse opnås ved indførelse af begge plasmider i bakterien.

Referencer

- Chandry, P. S., Moore, S. c., Davidson, B. E., and Hillier, A. I. (1994). Analysis of the *cos* region of the *Lactococcus lactis* bacteriophage sk1. *Gene* 138:123-126..
- Gasson, M.J. (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol* 154: 1-9.
- Gravesen, A., von Wright, A., Josephsen, J., and Vogensen, F.K. (1997) Replication regions of two pairs of incompatible lactococcal theta-replicating plasmids. *Plasmid* 38: 115 -127.
- Josephsen, J., and Neve, H. (1998) Bacteriophages and lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria*. (Salminen, S. & von Wright, A., eds) pp. 385- 436, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Josephsen, J., and Nielsen, K.W. (1988) Plasmid profiles and bacteriophage sensitivity of bacteria of a Cheddar starter used for five years without rotation. *Milchwissenschaft* 43: 219-223.
- Josephsen, J., and F. K. Vogensen. 1989. Identification of three different plasmid-encoded restriction/modification systems in *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* W56. *FEMS Microbiol. Lett.* 59:161-166.
- Josephsen, J., Jørgen-Jensen, B. and Nyengaard, N. 1998. Determination of the recognition sequence of the type II restriction endonuclease, *LiaCI*, from *Lactococcus lactis* W15. *FEMS Microbiol. Lett.*, 163:25-29.
- Madsen, A., and Josephsen, J. (1998) Characterization of *LiaCI*, a New Restriction Modification System from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W15. *Biological Chemistry* 379: 443-449
- Madsen, A., and Josephsen, J. (1998) Cloning and Characterization of the new lactococcal type II restriction-modification system *LiaDII*. *Appl Envir Microbiol* 64: 2424-2431
- Moineau, S., S. A. Walker, E. R. Vedamuthu, and P. A. Vandenberg. 1995. Cloning and sequencing of *LiaDCHI* restriction/modification genes from *Lactococcus lactis* and relatedness of this system to the *Streptococcus pneumoniae* *DpnII* system. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 :2193-2202.
- Nellemann, L., Evison, T. P., Kobbemagel, T. S. and Jytte Josephsen (1999) Cloning and DNA sequence of a novel Restriction-Modification system, *LiaBII*, on plasmid pJW565 from *Lactococcus lactis*. Complete nucleotide sequence and analysis of pJW565. Submitted.
- Nyengaard, N. R., Falkenberg-Klok, J., and Josephsen, J. (1996) Cloning and analysis of the restriction-modification system *LlaBI*, a bacteriophage resistance system from *Lactococcus lactis*

subsp. *cremoris* W56. *Appl Environ Microbiol* 62: 3494-3498.

Nyengaard, N., Vogensen, F.K., and Josephsen, J. (1993) *LiaAI* and *LiaBI*, two type-II restriction endonucleases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W9 and W56 recognizing, respectively, 5'-/GATC-3' and 5'-C/TRYAG-3'. *Gene* 136:371-372.

Nyengaard, N., Vogensen, F.K., and Josephsen, J. (1995) Restriction-modification systems in *Lactococcus lactis*. *Gene* 157: 13-18.

O'Sullivan, D. J., Zagula, K., and Klaenhammer, T.R. (1995) *In vivo* restriction by *LiaI* is encoded by three genes arranged in an operon with *UaIM*, on the conjugative *Lactococcus* plasmid pTR2030. *J Bacteriol* 177, 134-143.

Schouler, C., Clier, F., Lerayer, A. L., Ehrlich, S.D., and Chopin, M-C. (1998) A type IC restriction-modification system in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 180, 407-411.

Sti, P., Im, H., Hsieh, H., Kang'A, S., and Dunn, N.W. (1999) *LlaFI*, a type III restriction and modification system in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 65, 686-93

Nye publikationer:

Josephsen, J. and H. Neve. 1998. Bacteriophages and Lactic Acid Bacteria, pp 385-436 in: Lactic Acid Bacteria. Eds: S. Salminen and A. von Wright. Marcel Dekker, Inc. New York.

Jytte Josephsen, Annette Madsen, and Nadezhda Matvienko. *AbiS*, a Novel Abortive Infection Mechanism Encoded by Plasmid pAW601 of *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* W60. Manuskript under udarbejdelse.

Jytte Josephsen. Karakterisering af to bakteriofagresistensmekanismer i *Lactococcus lactis*. Manuskript under udarbejdelse.

