

# Afslutningsrapport

PCR-metode til detektion af lytiske laktokokfager og  
identifikation af gener bestemmende for værtsspecificitet

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2004-63

*Oktober 2004*



**mejeri**foreningen

danish dairy board

## Afslutningsrapport for samarbejdsprojektet:

Metode til PCR detektion af lytiske laktokok-fager og identifikation af gener bestemmende for værtsspecificitet.

### Projektdeltagere:

Projektet er et samarbejdsprojekt mellem Mejeribrugets ForskningsFond og Institut for Fødevarevidenskab, KVL.

Lektor, cand. scient., Ph.d. Jytte Josephsen (projektleder),  
Email: [jjj@kvl.dk](mailto:jjj@kvl.dk), Tlf. 35283232, Fax. 35283214

Lektor, mejeriingeniør Finn K. Vogensen,  
Email: [fkv@kvl.dk](mailto:fkv@kvl.dk), Tlf. 35283211, Fax. 35283231

Cand. tech. al., Ph.D. Kitt Dupont  
Email: [kdu@kvl.dk](mailto:kdu@kvl.dk), Tlf. 35283158, Fax. 35283214

Laboratoriefuldmægtig Bashir Aideh og levnedsmiddeltekniker Camilla Arrildt

KVL, Institut for Fødevarevidenskab  
Rolighedsvej 30  
1958 Frederiksberg C

I en del af projektet har nedennævnte også deltaget.

Cand. scient. Ph.d. Birgitte Stuer-Lauridsen  
Email: [Birgitte.Stuer-Lauridsen@dk-chr-hansen.com](mailto:Birgitte.Stuer-Lauridsen@dk-chr-hansen.com), Tlf. 45748404, Fax. 45748994

Dr. Thomas Janzen,  
Email: [Thomas.janzen@dk-chr-hansen.com](mailto:Thomas.janzen@dk-chr-hansen.com), Tlf. 45748463, Fax. 45748994

Chr. Hansen A/S,  
Bøgeallé 10-12,  
Hørsholm

### Projektperiode:

Projektstart: 1. september 2000

Projektafslutning: 30. juni 2004

### Finansieringskilder:

Projektet er finansieret af Mejeribrugets ForskningsFond, FØTEK III og Chr. Hansen A/S.

## Resumé

Det var projekts mål at udvikle hurtige og følsomme PCR-baserede (Polymerase Chain Reaction) metoder til detektion af lytiske bakteriofager for *Lactococcus lactis*. Projektet skulle udvikle specifikke primere til detektion af lytiske fager indenfor arterne 936 og P335. Derudover skulle gener, der er involveret i 936-fagernes værtsspecificitet identificeres således, at metoden kunne forbedres til også at give oplysninger om fagernes værtsspecificitet. Det har derfor også været projektets mål at genere en basal molekylærbiologisk viden om gen(er), som er bestemmende for hvilke bakterier, som fager kan inficere, replicere DNA og endelig lysere.

I projektet er der blevet udviklet specifikke primere, der kan detektere lytiske fager tilhørende 936- og P335-fagarterne. Dette er opnået ved at opformere alle udvalgte fager til tilstrækkelig høje koncentrationer, således at der kunne fremstilles fag-DNA. Dette DNA blev anvendt til hybridiseringer, så det kunne bestemmes til hvilken fagart, de forskellige fager tilhørte og hvilke områder af DNA, der var konserverede. Det blev fundet, at 936-fager har stor indbyrdes lighed og mange forskellige gener vil kunne anvendes til design af primere. Vi valgte at bruge de gener, der koder for de formodede terminase proteiner som udgangspunkt for fagartsspecifikke primere. Hvad angår P335-fager udviste disse store forskelle. Ved at amplificere de fleste kendte gener fra P335-fagerne og anvende dem i hybridiseringer blev det fundet, at kun genet for dUTPasen var konserveret. Der blev designet primere til dette gen. Primerne blev afprøvet og redesignet således at specificiteten blev større.

Ved at sammenligne DNA og formodede proteinsekvenser fra fagerne sk1 og bIL170 (der har forskellig værtsspecificitet og hvis DNA sekvenser er publiceret), blev en åben læseramme (*orf18/orf20* i sk1/bIL170) i hver af fagerne identificeret som mulig kandidat for det protein, som genkender receptoren på bakteriens overflade. For at bevise denne hypotese blev et fragment, der indeholdt *orf18* og omkringliggende gener klonet og krydset ind i fag bIL170. Rekombinante fager med ændret værtsspecificitet blev dannet. Den C-terminale ende af *orf18* proteinet blev klonet i en ekspressionsvektor, overudtrykt, oprenset og brugt til fremstilling af antistoffer i en kanin. Elektronmikroskopiske undersøgelser viste, at antistofferne mod ORF18 som forventet binder sig til et protein, som sidder i den ende af faghalen, der formodes at være involveret i genkendelse af bakterier. Sekventering af tilsvarende "*orf18*" gener fra andre 936-fager viste, at der er sammenhæng mellem den oversatte proteinsekvens i den C-terminale ende af ORF18 og værtsspecificiteten.

For at identificere mulige receptorer på overfladen af bakterien blev *L. lactis* IL1403 mutageniseret med vektoren pGh9:ISS1. Fire forskellige mutanter, der ikke længere kunne adsorbere fagen bIL170, blev isoleret. Analyser viste, at vektoren i alle tilfælde havde sat sig ind i ét af to gener, som er en del af en stor operon, der er formodes at være involveret i biosyntese og transport af polysakkarider til bakteriens overflade.

Sekventering af "*orf18*" fra 936-fager med forskellig værtsspecificitet gav specifikke sekvenser for 7 faggrupper. Det var muligt at designe primere i dette område således, at der kun kom et PCR-produkt, hvis fagen tilhørte den gruppe som primeren var designet til. Metoden blev optimeret til at kunne detektere mellem  $10^2$  og  $10^3$  fager pr. ml. mælk ved at inkludere selektiv magnetbaseret fangst af fag-DNA ved hjælp af en primer bundet til en jernpartikler.

Projektet har opnået alle de opstillede mål. Der er blevet designet primere, således at fager tilhørende 936- eller P335-arterne kan detekteres med PCR. Desuden er metoden blevet forbedret, så metoden også kan give informationer om 936-fagernes værtsspecificitet. Det skal pointeres, at metoden giver oplysninger om hvilke bakterier, den pågældende fag kan binde sig til. Dette er det første og essentielle trin i infektionsforløbet, men det betyder ikke nødvendigvis, at fagen kan gennemføre de øvrige infektionstrin og i sidste ende forårsage lysning af bakterien.

## Abstract in English

The aim of the project was to develop fast and sensitive PCR-based methods for detection of lytic bacteriophages for *Lactococcus lactis*. In the project specific primers for detection of virulent phages belonging to 936 and P335 phage species had to be developed. Furthermore, genes involved in determining the host range of 936 phages should be identified, in order to improve the method with information on host range of the phage. It has therefore also been the aim of the project to generate basic molecular knowledge about gene(s) important for which bacterial cultures the phage can infect, reproduce its DNA and cause lysis.

Specific primers that can detect virulent phages belonging to 936 and P335 phage species were developed in the project. This has been achieved by propagating all the selected phages to high levels so that phage DNA could be obtained in sufficient amounts. This DNA was used in DNA hybridisations in order to determine which species the different phages belonged to and which areas were conserved within that species. It was found that 936 phages are genetically very alike and many different genes could be used for designing of primers. We decided to use the genes putatively encoding the terminase proteins for design of the specific primers. In contrast the P335-like phages exhibit large differences. By PCR amplification of most of the published sequenced genes from selected P335 phages and using them in DNA hybridisations it was found that only the gene encoding the dUTPase was conserved. Primers were designed for this gene. The primers were tested and redesigned in such a way that greater specificities were obtained.

By comparison of DNA and deduced protein sequences from phage sk1 and bII170 (having different host-ranges and both DNA sequences have been published) an open reading frame (*orf18/orf20* in sk1/bII170) in each of the phages was identified as possible candidate for the protein recognising the receptor on the surface of the bacteria. To prove this hypothesis, a fragment containing *orf18* and the surrounding area was cloned and crossed into the phage bII170. Recombinant phages with changed host range were produced. The C-terminal part of the *orf18* protein was cloned into an expression vector, over-expressed, purified and used for production of antibodies in a rabbit. Electron microscopic examination showed that the antibodies raised against ORF18 were bound to a protein located in the tip of the tail of the phage as expected for a protein involved in recognition of the bacteria. Sequencing of *orf18*-like genes from other 936 phages demonstrated that there was a correlation between the translated protein sequences in the C-terminal part of ORF18 and host specificities.

In order to identify possible receptors on the surface of the bacteria, *L. lactis* IL1403 was mutagenized using pGh9:ISS1. Four different mutants that no longer were able to adsorb phage bII170 were isolated. Analyses showed that the vector in all cases were integrated in one of two genes, which were part of a large operon, assumed to be involved in the biosynthesis and transport of polysaccharides to the surface of the bacteria.

Sequencing of "*orf18*" from 936 phages with different host range gave specific sequences for 7 phage groups. It was possible to design specific primers so that a PCR product was made only if the phage belonged to the group to which the primers were designed. The method was optimised by including capture of phage DNA with a primer bound to a magnetic beam so that the method can detect between  $10^2$  and  $10^3$  phages per mL of milk.

The project has achieved all the listed aims. Specific primers were designed in such a way that phages belonging to 936 or P335 species can be detected by PCR. Furthermore, the method was improved by giving information on the putative host range of 936-like phages. It should be pointed out that the method gives information on which bacteria the phage can bind to. This is the first and essential step in the phage infection, but it does not necessary mean that the phage can conduct the remaining steps of infection and lyse the bacteria.

## Projektets mål

Det var projektets mål at udvikle en ny, hurtig og følsom PCR-metode til detektion af fager tilhørende 936- og P335-fagarterne og at forbedre metoden således, at den også giver oplysninger om fagernes værtsspecificitet. Projektet skulle også generere en basal molekylærbiologisk viden om gen(er), som er bestemmende for hvilke bakterier, som fager kan inficere, reproducere sig i og forårsage lysning af.

## Baggrund

Virulente bakteriofager (fager) er meget små (~200 nm lange) luftbårne vira, som kan komme ind alle vegne. Da de ikke kan ses med det blotte øje, er de ikke lette at opdage. Fager kan kun reproducere sig selv ved at angribe bakterier, hvor bakteriernes reproduktionsapparat benyttes til at opformere fagernes DNA. Fager, der findes i mælken, kan inficere syrningskulturen og dermed påvirke syrningen, således at den enten forsinkes eller helt standser. Fager kan især skabe problemer for ostemejerier. Dette skyldes, at mælken her kun lavpasteuriseres, da kraftigere varmepåvirkning forringer ostekvaliteten. Lavpasteurisering er imidlertid ikke tilstrækkelig til at inaktivere fagerne. Anvendelsen af stadig større tanke og presset produktionstid har ikke gjort problemet mindre. Tilstedeværelsen af fager kan således hurtigt medføre store økonomiske problemer for mejerierne i form af faldende produktkvalitet, råvare- og tidstab.

Ud fra morfologi- og DNA-homologiundersøgelser er laktokok-fagerne blevet inddelt i 10-12 arter (Jarvis *et al.*, 1991). De hyppigst forekommende lytiske bakteriofager tilhører 936-arten, men også fager, som tilhører P335- eller c2-arten ses ofte (Josephsen *et al.*, 1994; Josephsen and Neve, 1998; Moineau *et al.*, 1996; Braun *et al.*, 1989). Derudover er vores viden om dem ret begrænset på trods af, at lytiske bakteriofager for *Lactococcus lactis* har været kendt siden 1930'erne (Josephsen and Neve, 1998). Der er kun foretaget få molekylærbiologiske undersøgelser på 936-fagerne (Chandry *et al.*, 1994a; Chandry *et al.*, 1997; Chandry *et al.*, 1994b), og kun 2 faggenomer for 936 fagerne, nemlig sk1 og bIL170, er blevet sekventeret (sk1: *Accession nummer AF011378*; bIL170: *Accession nummer AF009630*). Derimod er der blevet foretaget en del molekylærbiologiske undersøgelser på flere temporate P335 fager (Brøndsted *et al.*, 2001b; Brøndsted *et al.*, 2001a; Christiansen *et al.*, 1996; Christiansen *et al.*, 1994; Johnsen *et al.*, 1996; Johnsen *et al.*, 1995; Madsen *et al.*, 1999; Madsen and Hammer, 1998; van Sinderen *et al.*, 1996; Zuniga *et al.*, 2002; Labrie and Moineau, 2002; Lillehaug *et al.*, 1991; Lillehaug *et al.*, 1997; Labrie and Moineau, 2002; Blatny *et al.*, 2001a; Blatny *et al.*, 2004; Blatny *et al.*, 2001b; Johansen *et al.*, 2003). Temporale fager er fager, der kan induceres fra profager, der forekommer i visse starterkulturer.

På mejerierne checker man mælken for forekomst af fager ved bestemmelse af mælkesyredannelsen ved måling af pH (syrningshæmningsmetoden) (Nielsen, 1998). Hvis syrningen forsinkes, tages det som udtryk for tilstedeværelse af fager. Metoden tager ca. 6 timer og kan anvendes både på enkelt- og flerstamme-kulturer såvel som på blandingskulturer. Alligevel kan det forekomme, at syrningshæmningsmetoden ikke opdager fagerne før det er for sent. I stedet for pH kan man også måle impedans, ledningsevne eller ATP. Man kan også opdage fager ved plaque-assay, hvor man drypper forskellige fortyndinger af prøven (f.eks. valle) på et tæppelag af en enkelt bakterie på en agarplade. Efter inkubation i mindst 6 timer vil man kunne se opklarede zoner af lysede bakterier (plaque), der hvor der er fager. Denne metode oplyser desuden om, hvilken bakteriestamme, som kan angribes. Imidlertid, kræver metoden kendskab til de bakterier, som indgår i starterkulturen. I Danmark, hvor man overvejende anvender blandingskulturer (DL), har man ikke dette kendskab, hvorfor metoden er uanvendelig. Desuden er alle disse bestemmelser indirekte målinger på tilstedeværelsen af fager, idet man måler metabolisk aktivitet af bakterierne

og ikke direkte tilstedeværelsen af fager. Der er således et behov for nye detektionsmetoder, der hurtigt kan opdage fager i lave niveauer ( $10^3$ - $10^4$  fager/ml eller lavere) inden de bliver et problem.

Lembke og Teuber (Lembke and Teuber, 1981) har udviklet en immunologisk metode til detektion af fager, men kendskabet til fager er endnu ikke tilstrækkeligt stort til, at man ved om der findes nogle antigene proteiner, der er fælles for alle fager indenfor en fagart. Moineau (Moineau *et al.*, 1992) har udviklet en DNA hybridiseringsmetode, hvor man drypper prøven på en nylonmembran, hvorefter prøverne bliver lyseret og fikseret til membranen. De kunne detektere ned til mellem  $10^5$  og  $10^7$  fager pr. plet. Metoden tager 24 timer og dermed både for langsom og for lidt følsom. Labrie og Moineau har senere udviklet en PCR baseret metode til detektion af c2-, 936- og P335-fager (Labrie and Moineau, 2000). Primerne var designet i genet, der koder for et hovedprotein i fag c2 og i 936-fagerne, og et område indenfor orf17-18 i fag r1t og orf20-21 i fag Tuc2009. De kunne detektere mellem  $10^3$  og  $10^5$  fager/ml.

## Resultater

### A. Udvikling af PCR metoden.

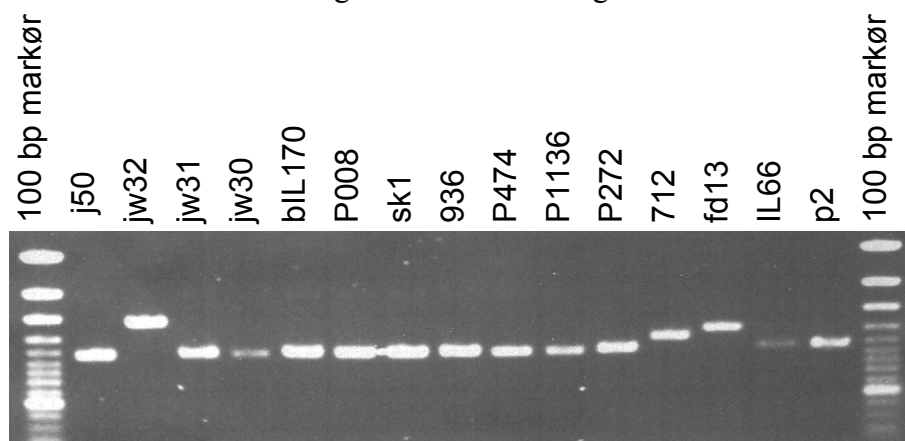
#### Isolering og opformering af fager.

Fager homologe for *Lactococcus lactis* blev isoleret fra nogle danske mejerier og rendyrket. Således blev typefagerne P008 og P335, egne fager (jw30, jw31 og jw32, jw16B, jj50, TP901-1 og TPW22) og rekvirerede fager (bl.a. 936 fagerne 936, sk1 og bIL170, og P335 fagerne, φLC3 og r1t) opformeret til mellem  $10^{12}$  og  $10^{13}$  fager. Fagernes værtsspecificitet blev bestemt på alle værterne og anvendt til fremstilling af DNA.

#### Identifikation af konserverede områder og design og udvælgelse af primere til detektion af fager.

Ved DNA hybridiseringsforsøg blev det bestemt til hvilken af de tre arter, de forskellige udvalgte fager tilhører. Ligeledes blev hybridiseringsforsøg anvendt til at se hvor ens de forskellige 936 og P335 fager er. Det viste sig at der var store ligheder mellem alle 936-fagerne, mens der var store forskelle på P335-fagerne.

Ved at sammenligning af de publicerede DNA sekvenser for 936-fagerne sk1 (*Accession nummer AF011378*) og bIL170 (*Accession nummer AF009630*) blev områder/gener, der er meget ens i de to fager identificeret. Vi valgte at designe primere i generne, der formodes at kode for terminase proteinerne. Disse primersæt blev afprøvet som vist i Figur 1, og redesignet således at de kunne detektere alle 936-fagerne i vores samling.



**Figur 1.** PCR- amplifikation af forskellige fager tilhørende 936-arten med primere med homologi til terminase generne.

Da der var meget få ligheder mellem de forskellige P335-fager besluttede vi at amplificere alle de gener, hvis DNA sekvens var tilgængelig. Således blev i alle gener der var forskellige fra TP901-1 BK5-T og r1t amplificeret. I alt blev mere end 200 PCR produkter amplificeret, dvs. der blev designet primersæt for hvert enkelt gen, der dernæst blev PCR amplificeret. Ved hybridiseringsforsøg fandt vi, at kun genet, der koder for dUTPasen var konserveret i P335-fagerne. Der blev designet flere primersæt for dUTPase genet fra P355 fagerne, og de fleste virkede udmærket på vores samling af fager tilhørende P335-arten. Imidlertid så vi en del falsk positive resultater med disse primersæt for 936 bakteriofagerne. Det viste sig at kromosomalt DNA fra lysogene værtsbakterier også detekteres med disse primere, da temporate fager af P335 typen findes i sådanne bakterier. Adskillige forsøg blev udført for at undgå denne fejlkilde. Det lykkedes at

reducere problemet med DNase I behandling, men aldrig helt at fjerne det. Det er dog muligt at en anden DNase end den anvendte ville kunne løse problemet (fx Turbo DNase fra Ambion). Detektionsniveauet for terminase primerne for 936 fagerne og dUTPase primerne for P335 fagerne var mellem  $10^3$ - $10^5$  fager/ml. Dette kan uden tvivl forbedres med selektiv magnetisk fangst af fag DNA som beskrevet nedenfor, men det løser ikke problemet med kontaminering med kromosomalt DNA.

### **Optimering af PCR metoden.**

Metoden blev afprøvet på prøver, der indeholder fager i mælk eller valle. Metoden virkede udmærket på 936-fagerne og kunne detektere imellem  $10^3$  og  $2 \cdot 10^4$  fager pr ml skummetmælk. Da kromosomalt DNA fra værtbakterien interfererede med bestemmelserne af P335 fagerne blev forskellige forbehandlinger af prøven undersøgt for at optimere metoden, herunder DNase I behandling. Det blev også forsøgt at klonere og udtrykke gener, der koder for proteiner i fagens hoved i *E. coli*. Ideen var at man ved hjælp af antistoffer, dannet mod de udtrykte fagproteiner, og bundet til (magnetiske) jernpartikler kunne fange fagerne i mælken uden samtidig at fange kromosomalt DNA. Herefter kunne man så detektere dem ved hjælp af PCR amplifikation. Desværre lykkedes det ikke at udtrykke de nævnte gener i tilstrækkelig høje niveauer til at de kunne bruges til immunisering af kaniner til fremstilling af de nødvendige antistoffer.

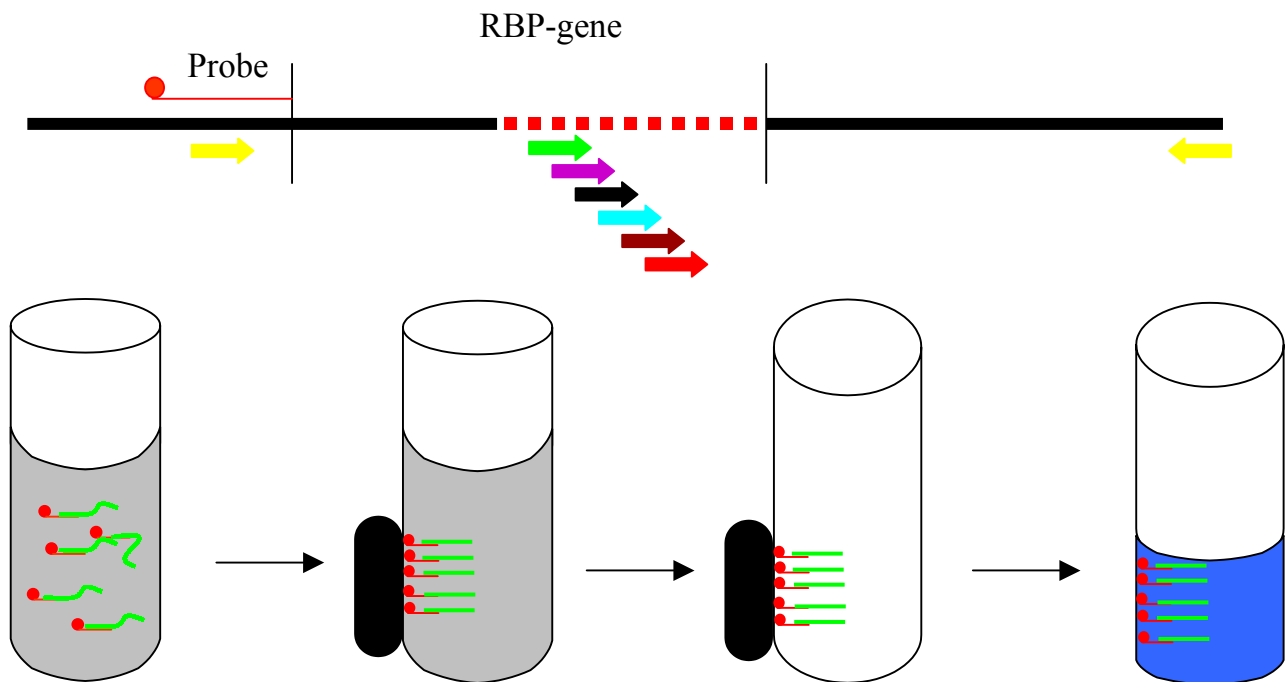
Som det vil fremgå af følgende afsnit blev et receptor-bindingsprotein identificeret i 936 fagerne sk1 og bIL170. Ved at anvende primere tæt på det gen, der koder for receptor-bindingsprotein, men med homologi til konserverede områder, blev DNA sekvensen af flere forskellige receptor-bindingsprotein (RBP) gener bestemt for fager med anden værtsspecificitet (se i det følgende). Herudfra var det muligt at designe en primer specifik for hvert af de seks forskellige typer af RBP gener. Ved at udføre PCR amplifikationen med en primer i det konserverede område nedstrøms RBP-genet med de forskellige primere specifikke for hvert af RBP generne (se Figur 2) blev det muligt at få oplysninger om fagens mulige værter.

Metoden blev yderligere optimeret ved at fag-DNA først fanges med en 80 bp lang primer, der er bundet til en magnetisk kugle (Magnetic Capture Hybridisation (MCH)). Primeren binder sig til et meget konserveret område opstrøms for RBP genet i alle de undersøgte fager. Med MCH-PCR er det muligt at detektere  $10$ - $10^2$  fager i  $100 \mu\text{l}$  valle, mens konventionel PCR kan detektere ca.  $10^4$  fager i  $1 \mu\text{l}$  valle.

Den endelige metode er følgende: først fjernes bakteriecellerne ved at valleprøven filtreres gennem et  $0.45 \mu\text{m}$  filter. Efter justering af pH til pH 7.0 inkuberes prøven ved  $37^\circ\text{C}$  i 30 min med DNase, hvorved kromosomalt DNA fra lyserede bakterier og fager fjernes. Prøven koges i 10 min, hvorefter den overføres til et  $70^\circ\text{C}$  vandbad. Prøver af  $100 \mu\text{l}$  udtages og overføres til 1 ml forvarmet hybridiseringsopløsning. MCH –primeren tilsættes og prøven roteres ved  $60^\circ\text{C}$  i 4 timer. Kuglerne koncentrerer ved hjælp af en magnet, vaskes og resuspenderes i  $28 \mu\text{l}$  vand. De specifikke RBP primere tilsættes og PCR amplifikationen udføres og analyseres.



## Magnetic capture hybridisation PCR



**Figur 2.** Skematisk tegning af MCH-PCR metode til detektion af fager.

Den sorte linie viser det område af RBP (receptor-bindings-protein) genet, hvor fag sk1 og bIL170 er næsten identiske, mens den røde stiplede linie viser hvor de er meget forskellige. De gule pile viser hvor primere homologe til det konserverede område ligger, mens de andre pile er designet så de er specifikke for hver af de forskellige faggrupper. De røde kugler symboliserer de magnetiske kugler bundet til et enkeltstrengt 80 baser langt DNA molekyle (mærket probe)

I trin 1 er prøven blevet filtreret, behandlet med DNase og kogt. Fag DNA med homologi til proben er blevet fanget af probe.

I trin 2 holdes kuglerne fast med en magnet.

I trin 3 vaskes prøven.

I trin 4 køres en konventionel PCR amplifikation med de specifikke primere og de gule primere.

Herefter analyseres prøven ved gelelektroforese.

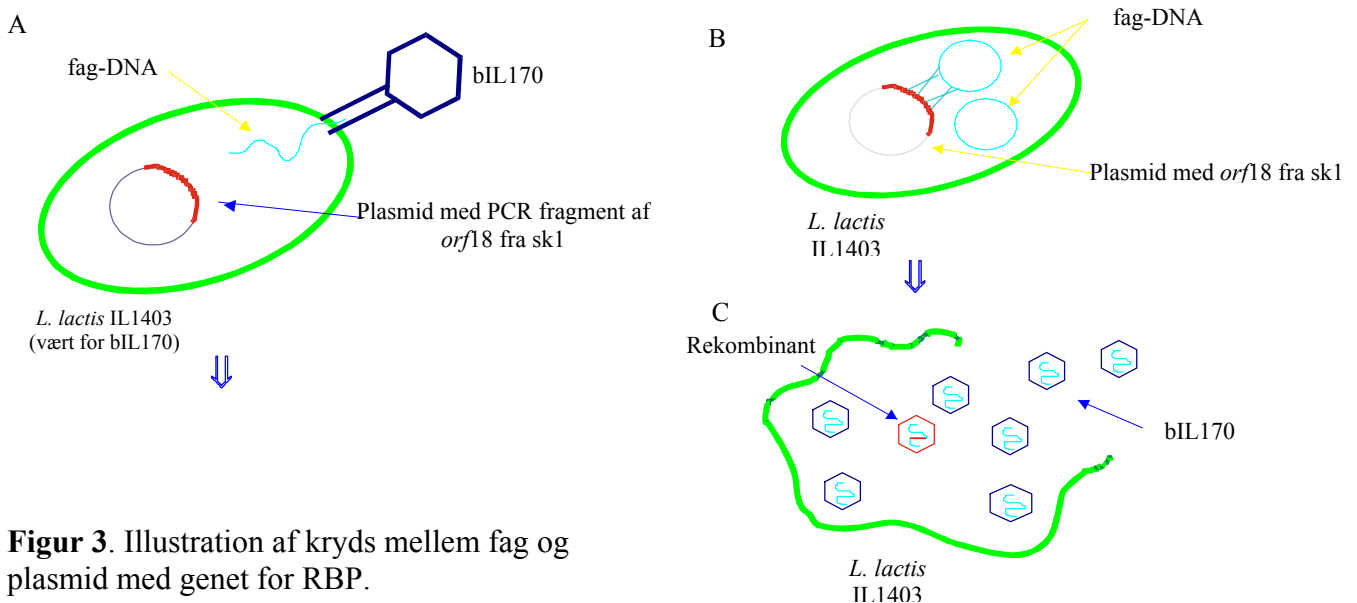
Denne metode vil let kunne udvides til at omfatte fager med andre RBP'er. Ligeledes kan den udvides til også at omfatte detektion af P335-fager; men da RBP-genet endnu ikke er identificeret i P335-fagerne (ikke del af dette projekt), kan den endnu ikke udvides til også at omfatte P335-fagernes værtsspecificitet baseret på deres RBP. Det skal dog pointeres, at den udviklede metode giver oplysninger om hvilke bakterier den pågældende fag kan binde sig til. Dette er det første og essentielle trin i infektionsforløbet, men det betyder ikke nødvendigvis, at fagen kan gennemføre de øvrige infektionstrin og lysere bakterien.

## B. Identifikation af gener involveret i fagers værtsspecificitet.

### Identificering af et gen, som er involveret i fag sk1 og bIL170's værtsspecificitet.

For at udvide PCR-detektionsmetoden til også at omfatte oplysninger om fagernes værtstilhørsforhold, skulle et eller flere fag gener, der er bestemmende for hvilke bakterier fagen kan angribe, identificeres. Til disse undersøgelser anvendtes to fager, som er forskellige med hensyn til værtsspecificitet. Fag sk1 og bIL170 anvender respektive *L. lactis* MG1614 og *L. lactis* IL1403 som værter. Desuden er som ovenfor nævnt de to faggenomer blevet sekventeret.

Det gen, som er involveret i værtsspecificitet må være forskellige i de to fager. Det ansås for sandsynligt, at genet måtte kode for et af fagens haleproteiner. Ved at sammenligne de forudsagte haleproteinsekvenser fra sk1 og bIL170 med hinanden blev *orf18* i sk1 og *orf20* i bIL170 identificeret som mulig kandidat til RBP. De første 340 nukleotider udviste 89% identitet med bIL170, mens de resterende 460 nukleotider ingen homologi udviste. Et område dækkende *orf18* og ca. 800 basepar (bp) omkring genet blev amplificeret med PCR og klonet i vektoren pJDC9-6 (pKDU1) og transformeret ind i *Lactococcus lactis* IL1403, som er vært for fag bIL170. Fag bIL170 blev opformeret på IL1403[pKDU1] og udpladet på *Lactococcus lactis* MG1614 (se figur 3).

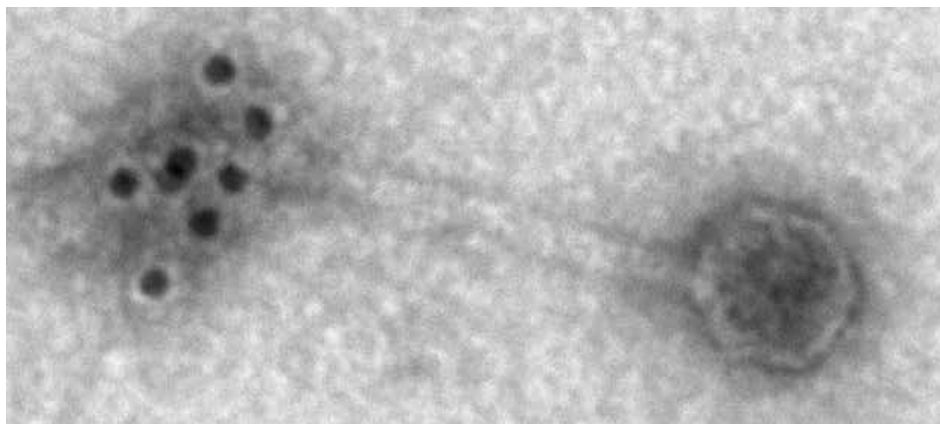


**Figur 3.** Illustration af kryds mellem fag og plasmid med genet for RBP.

Da området rundt om *orf18*(sk1) og *orf20*(bIL170) var meget ens, forventedes det, at der med meget lav frekvens ville ske en overkrydsning mellem pKDU1 og fag bIL170 således at fag bIL170 ville erhverve *orf18* fra sk1 og dermed sk1's værtsspecificitet, hvilket ville betyde de derfor kunne anvende MG1614 som vært. Tolv små turbide plaque blev dannet på MG1614. Desværre kunne de ikke opformeres videre på MG1614, men ved anvendelsen af diverse primere blev det bevist at plaquene på MG1614 var rekombinante fager, dvs. bIL170, der havde fået udskiftet 3'-enden af dets egen *orf20* med 3'-enden af sk1's *orf18*.

For yderligere at bevise at *orf18/orf20* er involveret i fagernes værtsspecificitet blev 487 bp fra den 3'ende af *orf18* klonet i en T7 ekspressionsvektor (pKDU2) i *E. coli*. Proteinene blev overudtrykt og oprenset. En kanin blev immuniseret med det oprensede protein og serum indeholdende polyklonale antistoffer blev opsamlet. Specificiteten af antistofferne blev undersøgt ved Western blot. Som forventet bandt antistoffet til et 28,5 kDa protein, der kun fandtes i sk1 og ikke i bIL170. En dot blot analyse viste at antistofferne kun bandt sig til proteiner fra fag sk1 og ikke til fag proteiner fra bIL170. Ved at anvende antikanin-rettede guldmærkede antistoffer blev det i et

elektronmikroskop vist at de polyklonale antistoffer kun bandt sig til et protein lokaliseret i enden af faghalsen (se figur 4). Dette underbygger hypotesen om at *orf18* i sk1 er involveret i fagens binding til bakteriens receptor.



**Figur 4.** Immunoguld elektronmikrograf af fag sk1. Det primære antistof er rettet mod RBP, mens det sekundære anti-kanin antistof er mærket med guldparkler.

#### Identifikation af gener involveret i værtsspecificitet i andre 936 fager.

En del af de undersøgte fagers værtsspecificitet faldt i to grupper, hvor den ene gruppe kunne inficere de samme værter som sk1, mens den anden gruppe kunne inficere de samme værter som bIL170 (se Tabel 1).

**Tabel 1.** Værtsspecificitet af 936-fager bestemt ved spottest og bindingsassay.

Stamme Fag	IL1403	F7/2	BU.2	KH	MG1614	FD13	V32.2
<b>bIL170</b>	+	+	(+)				
<b>P008</b>	+	+	+				
<b>bIL66</b>	+	+	+				
<b>P113</b>	+	(+)	+				
<b>P272</b>	+	(+)	+				
<b>sk1</b>				+	+	+	+
<b>fd13</b>				+	+	+	+
<b>7</b>				+	+	(+)	+
<b>jj50</b>				+	+	+	+
<b>P2</b>				(+)	+	+	+

Derudover blev det fundet (ved anvendelse af et fluorescens mikroskop) at SYBR Gold-mærkede fager kun kunne binde sig til de værter som de kunne lysere (se figur 5).



**Figur 5.** *L. lactis* IL1403 hvortil SYBR Gold mærkede bIL170 fager binder.

DNA sekvensen af disse fager blev bestemt og den forudsagte aminosyresekvens sammenlignet. Det blev fundet at ca. 135 aminosyrer i den N-terminale ende af RBP var 79% identisk. Den C-terminale ende bestående af ca. 130 aminosyrer kunne inddeles i to grupper, hvoraf den ene havde 64% identitet til RBP'er fra sk1-lignende fager (p2, jj50, fd13,  $\phi$ 7) og den anden 90% identitet til bIL170-lignende fager (P008, bIL66, P272, P113G). Det sås således at der var en overensstemmelse med homologien i den C-terminal ende af RBP og hvilke bakterier fagen kan binde til og inficere. Det er bemærkelsesværdigt, at alle værter, som sk1 gruppen kan inficere er *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, mens alle værterne for bIL170 gruppen er *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Ligeledes blev DNA sekvensen af RPB af yderlig syv fager med andre værtsspecificiteter bestemt. De viste sig ved analyse at disse RBP kunne inddeles i alt i seks grupper.

### **Identifikation af gener i bakterien, som er nødvendig for adsorption af bakteriofager**

*Lactococcus lactis* IL1403 blev udtaget til undersøgelser af hvilke komponenter, der indgår i receptoren på bakteriens overflade. *Lactococcus lactis* IL1403 blev valgt fordi dets kromosom er blevet sekventeret og publiceret (Accession nummer AE005176). Bakterien blev mutageniseret med vektoren pGh9:ISS1. Denne vektor har et replikon, der ikke fungerer ved høje temperaturer ( $\geq 37^{\circ}\text{C}$ ). Vektoren koder desuden for et gen, der gør bakterien resistent mod erythromycin. Når temperaturen hæves og bakterien vokser i substrater med erythromycin er dens eneste mulighed for at overleve at den får integreret vektoren i kromosomet, således at resistensgenet forbliver udtrykt. Integrationen vil ske tilfældige steder i kromosomet. Bakterier blev udpladet på plader med 2  $\mu\text{g/ml}$  erythromycin og  $10^9$  fager således at kun fagresistente bakterier overlevede. Overlevende bakterier blev undersøgt for fagfølsomhed ved krydsstregning. Der blev isoleret 10 fagresistente mutanter. De fagresistente mutanters evne til at adsorbere fager blev bestemt ved adsorptionsassay. De adsorberede mellem 0 og 27% af de tilsatte fager. Kontrollen *Lactococcus lactis* IL1403 adsorberede 97%. Resultaterne blev konfirmeret ved at udføre et bindingsassay, hvor adsorptionen af SYBR Gold mærket fag bIL170 til mutanterne blev undersøgt i et fluorescensmikroskop. Bakterier, der kunne adsorbere fager, kunne ses som grønne celler (se Figur 5). Ingen af de 10 mutanter kunne binde den mærkede fag. For at bestemme hvor integrationen havde fundet sted blev der isoleret kromosomalt DNA fra alle mutanterne. Dette DNA blev skåret med EcoRI og anvendt i Southern hybridisering med

mærket pGh9:ISSI som probe. Herved kunne det ses at pGh9:ISSI var integreret fire forskellige steder i kromosomet. Ved at fordøje det kromosomale DNA med EcoRI, ligere det og dernæst transformere det ind i *Lactococcus lactis* MG1614 fik man gendannet plasmider, der udover pGh9:ISSI også indeholdt det flankerede kromosomale DNA hvor integrationen havde fundet sted. DNA sekvensen af det kromosomale DNA blev bestemt og det viste sig at indsættelser i tre tilfælde var sket i genet *rpgE* og en gang i genet *ycaG*. Genet *rpgE* koder formodentlig for en glycosyltransferase, mens funktionen af *ycaG* ikke kendes. Begge gener er en del af en operon bestående af 25 gener, der alle antages at være involveret i syntesen af polysakkarider på overfladen af bakterien. Disse resultater indikerer at fag bII170 genkender og adsorbere til et specifikt polysakkarid på bakteriens overflade. Om den dernæst binder sig til et protein i cellemembranen vides endnu ikke. Årsagen til at der ikke blev fundet mutationer i et gen kodende for et membranprotein kan enten skyldes at ødelæggelse af dette protein er letalt for cellen eller at dette protein slet ikke findes og bakterien derfor ikke bruger et protein ved injektion af sit DNA.

## Referencer:

1. Blatny, J.M., L.Godager, M.Lunde, and I.F.Nes. 2004. Complete genome sequence of the *Lactococcus lactis* temperate phage phi LC3: comparative analysis of phi LC3 and its relatives in lactococci and streptococci. *Virology* 318:231-244.
2. Blatny, J.M., P.A.Risoen, D.Lillehaug, M.Lunde, and I.F.Nes. 2001a. Analysis of a regulator involved in the genetic switch between lysis and lysogeny of the temperate *Lactococcus lactis* phage phi LC3. *Molecular Genetics and Genomics* 265:189-197.
3. Blatny, J.M., P.A.Risoen, D.Lillehaug, M.Lunde, and I.F.Nes. 2001b. Analysis of a regulator involved in the genetic switch between lysis and lysogeny of the temperate *Lactococcus lactis* phage phi LC3. *Molecular Genetics and Genomics* 265:189-197.
4. 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* 135:2552-2560.
5. Brøndsted, L., S.Østergaard, M.Pedersen, K.Hammer, and F.K.Vogensen. 2001a. Analysis of the complete DNA sequence of the temperate bacteriophage TP901-1: Evolution, structure, and genome organization of lactococcal bacteriophages. *Virology* 283:93-109.
6. Brøndsted, L., M.Pedersen, and K.Hammer. 2001b. An activator of transcription regulates phage TP901-1 late gene expression. *Appl. Envir. Microbiol.* 67:5626-5633.
7. Chandry, P.S., B.E.Davidson, and A.J.Hillier. 1994a. Temporal transcription map of the *Lactococcus lactis* bacteriophage sk1. *Microbiology* 140 ( Pt 9):2251-2261.
8. Chandry, P.S., S.C.Moore, J.D.Boyce, B.E.Davidson, and A.J.Hillier. 1997. Analysis of the DNA sequence, gene expression, origin of replication and modular structure of the *Lactococcus lactis* lytic bacteriophage sk1. *Mol Microbiol* 26:49-64.
9. Chandry, P.S., S.C.Moore, B.E.Davidson, and A.J.Hillier. 1994b. Analysis of the *Cos* region of the *Lactococcus lactis* bacteriophage sk1. *Gene* 138:123-126.
10. Christiansen, B., L.Brøndsted, F.K.Vogensen, and K.Hammer. 1996. A resolvase-like protein is required for the site-specific integration of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *Journal Of Bacteriology* 178:5164-5173.
11. Christiansen, B., M.G.Johnsen, E.Stenby, F.K.Vogensen, and K.Hammer. 1994. Characterization of the lactococcal temperate phage TP901-1 and its site-specific integration. *J Bacteriol* 176:1069-1076.
12. Jarvis, A.W., G.F.Fitzgerald, M.Mata, A.Mercenier, H.Neve, I.B.Powell, C.Ronda, M.Saxelin, and M.Teuber. 1991. Species and type phages of lacococcal bacteriophages. *Intervirology* 32:2-9.
13. Johansen, A.H., L.Brøndsted, and K.Hammer. 2003. Identification of operator sites of the CI repressor of phage TP901-1: evolutionary link to other phages. *Virology* 311:144-156.

14. Johnsen, M.G., K.F.Appel, P.L.Madsen, F.K.Vogensen, K.Hammer, and J.Arnau. 1996. A genomic region of lactococcal temperate bacteriophage TP901-1 encoding major virion proteins. *Virology* 218:306-315.
15. Johnsen, M.G., H.Neve, F.K.Vogensen, and K.Hammer. 1995. Virion positions and relationships of lactococcal temperate bacteriophage TP901-1 proteins. *Virology* 212:595-606.
16. Josephsen, J., N.Andersen, H.Behrndt, E.Brandsborg, G.Christiansen, M.B.Hansen, S.Hansen, W.E.Nielsen, and F.K.and Vogensen. 1994. An ecological study of lytic Bacteriophages of *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* in a cheese plant over five year period. *International Dairy Journal*. . 4:123-141.
17. Josephsen, J. and H.Neve. 1998. Bacteriophages and lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. S.Salminen and A.van Wright, editors. Marcel Dekker Inc., New York. 385-346.
18. Labrie, S. and S.Moineau. 2000. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl. Envir. Microbiol.* 66:987-994.
19. Labrie, S. and S.Moineau. 2002. Complete genomic sequence of bacteriophage u136: Demonstration of phage heterogeneity within the P335 quasi-species of lactococcal phages. *Virology* 296:308-320.
20. Lembke, J. and M.Teuber. 1981. Serotyping of morphologically identical bacteriophages of lactic streptococci by immunoelectronmicroscopy. *Milchwissenschaft* 36:10-12.
21. Lillehaug, D., B.Lindqvist, and N.K.Birkeland. 1991. Characterization of phiLC3, a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* temperature bacteriophage with cohesive single stranded DNA ends. *Appl Environ Microbiol* 57:3206-3211.
22. Lillehaug, D., I.F.Nes, and N.K.Birkeland. 1997. A highly efficient and stable system for site-specific integration of genes and plasmids into the phage phi LC3 attachment site (attB) of the *Lactococcus lactis* chromosome. *Gene* 188:129-136.
23. 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-Uk* 144:2203-2215.
24. Madsen, P.L., A.H.Johansen, K.Hammer, and L.Brøndsted. 1999. The genetic switch regulating activity of early promoters of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *Journal Of Bacteriology* 181:7430-7438.
25. Moineau, S., M.Borkaev, B.J.Holler, S.A.Walker, J.K.Kondo, E.R.Vedamuthu, and P.A.Vandenbergh. 1996. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. *J. Dairy Sci.* 79:2104-2111.
26. Moineau, S., J.Fortier, and S.Pandian. 1992. Direct Detection of Lactococcal Bacteriophages in Cheese Whey Using Dna Probes. *Fems Microbiology Letters* 92:169-174.

27. Nielsen, E.W. 1998. Long term use of a Cheddar starter and development of phages with homology to its bacteria. *International Dairy Journal* 8:1003-1009.
28. van Sinderen, D., H.Karsens, J.Kok, P.Terpstra, M.H.J.Ruiters, G.Venema, and A.Nauta. 1996. Sequence analysis and molecular characterization of the temperate lactococcal bacteriophage r1t. *Molecular Microbiology* 19:1343-1355.
29. Zuniga, M., B.Franke-Fayard, G.Venema, J.Kok, and A.Nauta. 2002. Characterization of the putative replisome organizer of the lactococcal bacteriophage r1t. *Journal of Virology* 76:10234-10244.

#### **Publikationer i internationale tidsskrifter:**

1. Dupont, Kitt, Finn Kvist Vogensen, Horst Neve, José Bresciani and Jytte Josephsen. 2004. Identification of the receptor-binding protein in 936-species lactococcal bacteriophages. *Appl. Envir. Microbiol.* (70), 10, 5818-5824.
2. Dupont, Kitt; Thomas Janzen, Finn Kvist Vogensen, Jytte Josephsen and Birgitte Stuer-Lauridsen. 2004. Identification of *Lactococcus lactis* genes required for bacteriophage adsorption. *Appl. Envir. Microbiol.* (70), 10, 5825-5832.
3. Kitt Dupont, Finn Kvist Vogensen and Jytte Josephsen. Detection of lactococcal 936-species bacteriophages in whey by magnetic capture hybridization PCR targeting a variable region of receptor-binding protein genes. Indsendt til *Journal of Applied Microbiology*

#### Faglige artikler

- Josephsen Jytte, Kitt Dupont og Finn K. Vogensen. Metode til detektion af lytiske laktokok-fager og identifikation af gener bestemmende for værtsspecificitet. *Mælkeritidende*. 2002, 52 (3) 52-55.

#### Indlæg ved faglige kongresser

##### **Mundtligt indlæg**

- Kitt Dupont. Host recognition in lytic lactococcal bacteriophages."Molecular Genetics and Bacteria and Phages. University of Wisconsin-Madison. 5-10 August 2003

##### **Postere:**

1. Dupont, Kitt, Vogensen, F.K. and Jytte Josephsen. Host specificity in lytic lactococcal bacteriophages. LMC congress, Lyngby 2002
2. Dupont, Kitt, Vogensen, F.K. and Jytte Josephsen. Host specificity in lytic lactococcal bacteriophages. May 23-24, 2002, Munkebjerg, Vejle
3. Dupont, Kitt, Vogensen, F.K. and Jytte Josephsen. Host specificity in lytic lactococcal bacteriophages, Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria. Egmond aan Zee, Holland, 1.-5.9. 2002



4. Kitt Dupont, Finn K. Vogensen and Jytte Josephsen. Host recognition in lytic lactococcal bacteriophages."Molecular Genetics and Bacteria and Phages. University of Wisconsin-Madison. 5-10 August 2003.
5. Kitt Dupont, Thomas Janzen, Birgitte Stuer-Lauridsen, Finn K. Vogensen and Jytte Josephsen. Identification of genes in *Lactococcus lactis* IL1403 required for binding of phage bIL170. Poster ved "Molecular Genetics and Bacteria and Phages. University of Wisconsin-Madison. 5-10 August 2003.
6. Kitt Dupont, Finn K. Vogensen and Jytte Josephsen. Host recognition in lytic lactococcal bacteriophages." ASM Conference on the New Phage Biology. Miami. Aug 1-5, 2004

## **Redegørelse for forskeruddannelse og udstationering**

Kitt Dupont har under hele sin ansættelse været indskrevet som ph.d. studerende ved KVL med Jytte Josephsen som hovedvejleder og Finn K. Vogensen som medvejleder. Kitt Dupont forsvarede sin afhandling den 11. juni 2004 og er efterfølgende blevet tildelt ph.d. graden.

Kitt Dupont har været udstationeret hos Chr. Hansen A/S i seks måneder. Her havde hun samarbejde med Birgitte Stuer-Lauridsen og Thomas Janzen.

## **Samarbejdsrelationer nationalt og internationalt**

Nationalt har vi haft samarbejde med Birgitte Stuer-Lauridsen og Thomas Janzen hos Chr. Hansen A/S omkring identificering af gener hvis produkt har betydning for fagernes adsorption til bakteriens overflade. Desuden har forhenværende lektor J. Bresciani været med til at tage elektronmikroskopiske foto af fagen mærket med antistoffer.

Internationalt har Kitt Dupont været på et kortere ophold hos Horst Neve, Institute for Microbiology, Federal Research Centre for Nutrition and Food, Kiel.

Vi har undervejs haft diskussioner med professor Tapani Alatossava, Department of Food Technology, University of Helsinki, om projektet.

## **Praktiske og videnskabelig betydning**

Projektet har udviklet en PCR-baseret metode til detektion af virulente laktokok-fager tilhørende 936- og P335-arten. En konventionel PCR-metode er udviklet for både 936- og P335-fagarterne. Desuden er der udviklet en MCH-baseret PCR-metode til detektion af 936-fagerne. Endvidere er der designet primere, som kan give oplysninger om 936-fagernes værtsspecificitet. Begge metoder vil kunne bruges umiddelbart, men det vil være en fordel at optimere metoden for P335-fagerne, så de kan detekteres med den MCH-baserede PCR. Metoderne har den fordel, at de direkte kan detektere fagerne og ikke som de hidtil anvendte metoder kun indirekte (ved lysning af bakterier). De vil kunne detektere fager, før de forårsager problemer på mejerierne, idet deres detektion ikke er afhængig af deres virulens, dvs. evne til at lysere bakterier. Metoden kan også detektere lavere niveauer af fager end de hidtil anvendte metoder. Metoden for 936-fagerne giver endvidere oplysninger om, hvilke bakterier fagen kan adsorbere til. Dette kan udnyttes til hurtigt at bestemme, om der er fager i prøven, der kan angribe den pågældende starterkultur (enkeltstamme eller multiple stammer) og til at fastlægge, hvor mange forskellige fager, der minimum er i prøven. Metoden kan let udvides til også at omfatte 936-fager fra andre specificitetsgrupper, der angriber andre bakteriestammer, da der er designet primere, der kan anvendes til opformering af det område i faggenomet, som er specifikt for hver værtsspecificitetsgruppe. Efter sekventering af sådanne

områder, kan der designes nye primere for den nye værtsspecificitetsgruppe. Ved anvendelse af en Light Cycler eller lignende apparatur til kvantitativ PCR, kan metoden udvikles til også at give kvantitative data om fagniveauerne. Metoden i sin nuværende form kræver ikke dyrt udstyr og den vil kunne automatiseres, så mange prøver kan analyseres samtidigt.

Projektets videnskabelige betydning er stor, da det er lykkedes for første gang at identificere et protein i en 936-laktokokfag, som har stor betydning for, hvilke bakterier fagen kan genkende og binde sig til. Det er også blevet vist, at der er en sammenhæng mellem sekvensen af den C-terminale ende af RBP og fagens værtsspecificiteten. Yderligere undersøgelser vil kunne give informationer om til hvilke andre fagproteiner, RBP bindes til, og hvilke aminosyrer i RBP proteinet, som er væsentlige for disse genkendelser. Derudover vil flere undersøgelser kunne give informationer om der er andre fagproteiner, der er nødvendige for fagens værtsspecificitet.

Ligeledes er det første gang at man har fundet mutanter i laktokkerne, der ikke kan adsorbere fager og lokaliseret hvor de pågældende mutationer havde fundet sted. Det er således første gang, man har fundet mutationer i gener, hvis produkter er involveret i syntesen af polysakkarider på laktokokkernes overflade. Undersøgelserne her viser, at de forskellige bakterier syntetiserer polysakkarider med forskellig organisering af de indgående monosakkarider, og dette er af betydning for, om bakterien kan genkendes af en 936-fag.

### **Relationer til andre mejerirelaterede samarbejdsprojekter**

Projektet har relation til projektet ”Mælk, diagnosticering af bakteriofagininficerede celler i syrningsprocesser” under Mejeribrugets ForskningsFond, som udføres af projektleder Mogens Kilstrup på BioCentrum, DTU.

