

Aus dem Institut für Mikrobiologie
der Universität Hohenheim
Prof. Dr. Süßmuth

**Molekularbiologische Untersuchungen zur
Aufklärung der Phagenresistenz an
Lactococcus l. lactis 05M-47**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt der Fakultät II-Biologie-
der Universität Hohenheim

von
Regina Angelika Gürtler
aus Stuttgart
1992

5. Zusammenfassung

Milchsäurebakterien, wie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, zählen bei der Herstellung fermentierter Milchprodukte zu den wichtigsten Säureweckerkulturen.

Die größten Störungen im Fermentationsprozeß werden durch Bakteriophagen verursacht, welche durch Infektion der Starterkulturen deren Säuerungsaktivität beeinträchtigen.

Die komplexen Phagen-Wirtsbeziehungen konnten häufig noch nicht aufgeklärt werden. Deshalb müssen Bemühungen, die eine biochemische und genetische Charakterisierung der Phagenabwehrmechanismen zum Ziel haben, verstärkt fortgesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit waren Zellen von *Lactococcus l. lactis* 05M-47, welche die Massenlyse durch ihren homologen Phagen P05M-47 überlebt hatten, unter den Gesichtspunkten der Phagenabwehr und der genetischen Instabilität der Phagenresistenz, mittels molekularbiologischer Techniken zu untersuchen.

Transfektions- und Southern-Hybridisierungsexperimente sollten zunächst klären, ob die Phagenresistenz auf einem extra- oder intrazellulären Mechanismus beruht.

Das Transfektionsexperiment, bei dem DNA des Phagen P05M-47 in protoplastierte resistente und sensitive Zellen eingebracht wurde, zeigte, daß bei *Lactococcus l. lactis* 05M-47 ein intrazellulärer Resistenzmechanismus vorliegt.

Durch ein Hybridisierungsexperiment mit einer biotinylierten Phagen P05M-47-DNA-Sonde konnte nachgewiesen werden, daß der Resistenzmechanismus nicht auf einer Lysogenie beruht.

Da die Restriktionsfragmente der Plasmid-DNA der resistenten Zellen mit denen der sensitiven annähernd 100% homolog sind, sind bei *Lactococcus l. lactis* 05M-47 Resistenzplasmide wenig wahrscheinlich.

Beim Vorliegen einer Phagenresistenz waren bei *Lactococcus l. lactis* 05M-47 reproduzierbar 5 HindIII-Fragmente mit Molmassen von etwa 10 kb, 7 kb, 4 kb, 2,5 kb und 1 kb auf dem Agarosegel zu erkennen.

Die Restriktionsfragmente der Plasmide der sensitiven Zellen wiesen auf dem Agarosegel gegenüber den resistenten zusätzliche Banden oder solche mit stärkerer Intensität auf.

Die Transformation von Plasmid-DNA von *Lactococcus l. lactis* 05M-47 in Polyethylenglycol-behandelte resistente Zellen lieferte den Hinweis, daß diese genetischen Elemente im Zusammenhang mit der Propagation des Phagen P05M-47 in *Lactococcus l. lactis* 05M-47 stehen.

An verschiedenen Stellen in der Plasmid-DNA und chromosomalen DNA der resistenten und sensitiven Zellen wurden Homologiebereiche eines 6,3 kb HindIII-Fragments festgestellt, das in der Plasmid-DNA der sensitiven Zellen reproduzierbar auftritt und im Hybridisierungsexperiment als Sonde eingesetzt wurde.

Wiederholte Versuche, das 6,3 kb-Fragment von *Lactococcus l. lactis* 05M-47 zunächst im Plasmid pUC18 und später im Plasmid pBR322 zu klonieren, schlugen jedoch vermutlich auf Grund einsetzender Rekombinationsvorgänge, fehl.

Bei der Durchführung von Massenlysen mit verschiedenen Phagenlysaten konnte nachgewiesen werden, daß der Resistenzverlust nicht auf einer genetischen Veränderung der Bakterien beruht, sondern auf der des homologen Phagen P05M-47.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, daß es sich beim Phagen P05M-47 um einen prolaten Phagentyp handelt, für dessen DNA eine Genomgröße von ca. 22 kb errechnet wurde.

Von 18 getesteten Restriktionsenzymen besaßen auch nach der Reinigung der Phagen-DNA, durch welche eventuell vorhandene Restriktionsenzym-inhibierende Verunreinigungen beseitigt werden sollten, nur die Restriktionsenzyme EcoRI, HpaI, KpnI und XbaI Erkennungssequenzen auf der DNA des Phagen P05M-47.

Auf Grund einer HPLC-Analyse der Nucleoside des Phagen-DNA-Hydrolysats kann angenommen werden, daß die schlechte Schneidbarkeit der DNA des Phagen P05M-47 auf der Existenz zweier modifizierter Basen -1-Methyladenin und einer noch nicht charakterisierten seltenen Base- beruht.

Die Versuchsergebnisse sprechen dafür, daß der Plasmid-DNA der resistenten Zellen von *Lactococcus l. lactis* 05M-47 wichtige genetische Elemente fehlen, die eine Propagation des Phagen P05M-47, z. B. durch Modifikation seiner DNA, ermöglichen.

Dies kann auf einer erniedrigten Kopienzahl der an der phagenbedingten Zell-Lyse beteiligten Plasmide beruhen oder durch fehlende Transposons in der Plasmid-DNA der resistenten Zellen hervorgerufen werden.

Andererseits scheint der Phage P05M-47 durch eine genetische Veränderung seiner DNA den Resistenzmechanismus seines Wirts umgehen zu können.

Darüberhinaus wurden in dieser Arbeit verschiedene *Lactococcus l. lactis*-Bakterien- und -Phagenstämme über das Restriktionsmuster ihrer DNA charakterisiert.

Die *Lactococcus l. lactis*-Bakterienstämme 530-7, 530-12, 05M-47, 05M-13 und 4513-5 konnten durch ihr spezifisches Plasmid- und HindIII-Restriktionsmuster differenziert werden.

Zur Identifizierung der DNA der Phagenstämme P530-7, P530-12, P05M-47 und P05M-13 erwies sich das EcoRI-Restriktionsmuster am geeignetsten.