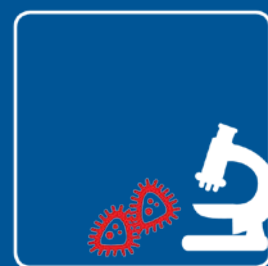
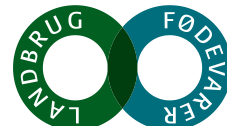


Modningsforløbet i ostekorn, analyseret for *Lactococcus* stammer med flere kromosomer





Slutrapport - 2015 for samarbejdsprojekter under MFF

1. Projektets titel

Modningsforløbet i ostekorn, analyseret for *Lactococcus* stammer med flere kromosomer

2. Projektleder

(siden 2014) Mogens Kilstrup, Lektor PhD
DTU Systembiologi, bygning 301
Danmarks Tekniske Universitet
2800 Lyngby
Telefon: 45252528
E-mail: mki@bio.dtu.dk

(før 2014) Peter Ruhdal Jensen
Professor, Ph. D.
DTU Food, bygning 221
Danmarks Tekniske Universitet
2800 Lyngby
Telefon: 45252510
E-mail: perj@food.dtu.dk

3. Øvrige medarbejdere

Egon Bech Hansen
(Tidligere) Vice President of Research and Development
Cultures Division, Danisco A/S
(Nu) Professor, PhD
DTU Food,
Telefon: 35886203
E-mail: egbh@food.dtu.dk

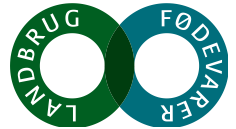
PhD studerende Malene Meyer Pedersen
DTU Systembiologi (2009 til 1/6-2014 incl. barselsorlov). Malene stoppede ansættelsen inden færdiggørelsen af PhD projektet, da hendes liv med tre børn var mere foreneligt med et stabilt job.

Projektansat Ole Michelsen (2009 til 2014)

4. Projektperiode

januar 2009 – oktober 2012

Forlænget til 2014



5. Projektresumé

Før projektet var det fundet at cellerne fra nogle laktokokstammer er små og har kun et enkelt kromosom per celle (haploide), medens andre er større og har to kromosomer per celle (diploid). Projektet var fokuseret på hvad dette skyldes og om det har konsekvenser for ostekvaliteten.

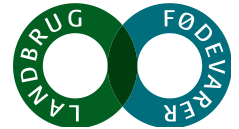
1. Resultatet fra seks ostefermenteringer med blandinger af haploide og diploide laktokokker, udført i samarbejde med Danisco/Dupont i Frankrig, viste at tilbageholdelsen var ens for de to typer celler.
2. Der er konstrueret et stort antal laktokokmutanter hvor mængden af DnaA proteinet, som i andre bakteriearter påvirker antallet af kromosomer per celle, varierer fra 40% til 650% af det normale niveau. Stammerne gror næsten med samme hastighed på nær de stammer med de højeste DnaA niveauer. Her er væksthastigheden lidt lavere. Analyser af DNA-indholdet per celle med flowcytometri viser dog at DNA-syntesen er meget forstyrret i bakterier med over 200% DnaA.
3. Analyse af laktokokker med forskellige niveauer af DnaA proteinet har ikke givet sikre konklusioner på hvorfor nogle stammer er haploide og andre diploide.
4. Mutanter som er gået fra at være diploide til at være haploide er forsøgt selekteret på flere måder. Analyser af mutanterne viste at de alle var diploide.
5. Der er foretaget en sammenligning af genudtrykket blandt haploide og diploide laktokokker og stammer med forskellige niveauer af DnaA proteinet ved hjælp af DNA mikroarray analyse. Screeningen tydede på at haploide laktokokker, og laktokokker som har tre-fold forhøjede niveauer af DnaA i forhold til den diploide MG1363 var ændret i deres udtryk af gener i blandt andet threalose og maltose nedbrydningen. Resultatet er meget interessant, men så uventet at det kræver gentagelse og mere gennemgribende analyser.

6. Projektets formål

Formålet med dette projekt er at udvikle metoder til at kontrollere modningsprocessen uafhængigt af syrningsfasen ved kontrol af starterkulturens sammensætning.

7. Projektets delaktiviteter i hele projektperioden

Analyse af



- 1) tilbageholdelsen af haploide og diploide stammer i ostekorn - både hver for sig og i blandinger.
- 2) hvilke faktorer der er afgørende for om en bakterie er haploid eller diploid – altså hvilke genetiske faktorer der har givet anledning til ændret cellecyclus i de diploide stammer.
- 3) Hvorledes de diploide stammer på nanoskala adskiller sig fra de normale haploide stammer med hensyn til form og overflade. Dette vil blive analyseret ved hjælp af atomic force microscopy.
- 4) Hvorledes *L. lactis* sanser indespærringen i ostemassen og modningsprocessen, ved hjælp af data fra DNA mikroarray analyser.

8. Projektets resultater/faglige forløb i perioden

Fra mikrobiologiundervisningen har vi altid hørt at gær og højerestående organismer kan eksistere i både en haploid og en diploid tilstand, mens bakterier kun kan eksistere som haploide. Muligheden for at eksistere som diploid gør at en organisme kan have to forskellige udgaver af samme gen, for eksempel både et funktionelt og et ufunktionelt. Det kom som en overraskelse at den bedst undersøgte laktokok, MG1363, viste sig at være diploid medens andre laktokokstammer enten var haploide eller diploide. I projektet ønskede vi at finde ud af, om forskellen på haploide og diploide laktokokker skyldtes forskelle i niveauet af DnaA proteinet som er involveret i beslutningen om hvornår cellen skal fordoble sit kromosom under væksten. Vi ønskede også at se om vi genetisk kunne selektere mutanter i MG1363 som dermed blev haploide. Så ville vi kunne undersøge disse med henblik på at opklare mekanismen. Diploide laktokokker er større en haploide. Vi forestillede os at der kunne være forskelle i hvor godt små og store celler blev tilbageholdt i ostemassen når vallen løber fra. Dette blev undersøgt i small-scale ostningsforsøg på Danisco/Dupont's forsøgsmejeri i Frankrig.

I afslutningsrapporten er der sakset nogle figurer sakset fra den interne afrapportering skrevet af PhD studerende Malene Meyer Pedersen til DTU Systembiologi ved hendes aftrædelse. I det følgende anvendes disse med deres oprindelige nummerering og engelske undertekster, selv om nummereringen ikke er fortløbende.

Analyse af tilbageholdelse af laktokokker i ostematrix.

Når caseinet under ostningsprocessen kollapser til en casein-matrix vil en stor del af bakterierne i ostemælken blive fanget. Det var ikke muligt at finde præcise tal for hvor stor en del af bakterierne der bliver fanget i casein-matrixen og hvor mange der undslipper i vallen.

Vores teori var, at hvis bakterierne var af forskellig størrelse ville deres tilbageholdelse i ostematrix være forskellig. I samarbejde med Danisco/Dupont i Frankrig designede vi et eksperimentelt setup som kan ses i figur 24. En syrevækker bestående af den haploide stamme NCDO712 og den diploide NCDO505 blev tilsat mælk i forholdet 1:1 til eksperimentelle miniskala oste. Sample A blev udtaget med det samme. Efter 60 min ved 32°C blev der tilsat løbe, og lige før skæring og valleaftapning blev Sample B udtaget. Efter løbeaftapning blev Sample C taget fra vallen. Sample D blev udtaget efter eftervarmningen (5 min 36,5 °C) og presning fra den udpressede valle. Sample E blev udtaget fra den resulterende ostemasse.

Enkelthederne i proceduren kan ses i figur 25.

Experimental setup

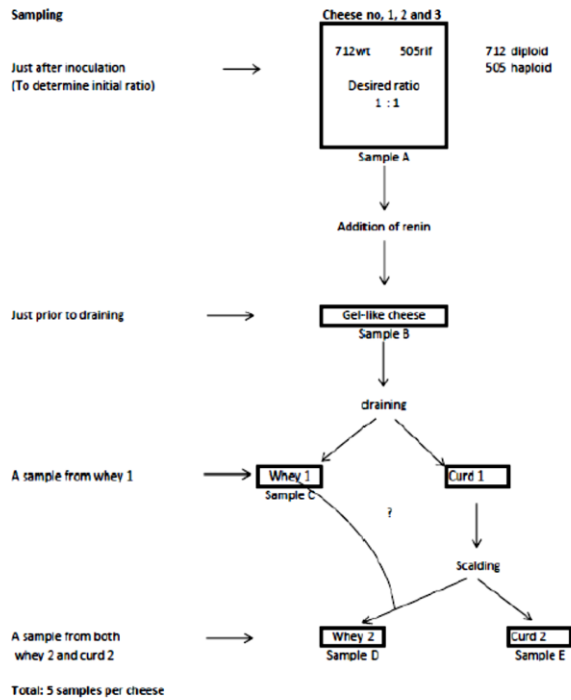


Figure 24: This experiment is made in triplicates with three identical cheeses (1, 2 and 3) made with wild type *L. lactis* NCDO712 (712wt) and rifampicin resistant *L. lactis* NCDO505 (505rif). The same experiment is also performed with wild type *L. lactis* NCDO505 and rifampicin resistant *L. lactis* NCDO712. A total of 5 samples are collected from each cheese (designated A to E).

> Milk:

- Fat 41.7g/L - Protein 34.1g/L
- Pasteurised 174° C + 30mL/100L CaCl₂

Inoculation

Maturation : 60' at 32° C

Renneting : 8000IMCU Carlina 520mg/L

Renneting to cutting time : Renneting time * 1

Grid curd cutting

Break 5'

Cutting 2'

Stirring

Lactose removal 15' after first cutting : subtract 35% of whey and add 30% of water at 36° C

Scalding (5 minutes) increase to a temperature of 36.5° C.

Stirring

Moulding in 1 form of 9cm 2h00 after rennet adding moulds in tray, cheese below whey

Prepressing : 30 min under whey with 1000g on each mould

Pressing : 160g/cm² at 36° C and 310g/cm² until pH 5,30

Salt brine : 120 minutes in brine 300g/L + 0,5g/L of Natamax® at 4°

Drying and packing : 10 min in reduced flow hood (5 min per layer)

Cryovac-packaging storage 6 weeks at 12°C

Figure 25: Procedure for producing Gouda at DuPont in Dangé Saint-Romain for use in the cheese trials

Før processens start var vi nødt til at mærke de to typer bakterier så vi nemt kunne tælle dem bagefter. Da Danisco/Dupont ikke ville acceptere GMO bakterier i deres forskningsfaciliteter måtte vi mærke dem på en ikke GMO-baseret måde. Vi selekterede for naturligt forekommende resistente mutanter ved at udplade stammerne på agarplader som indeholdt enten rifampicin (100 ug/ml) eller streptomycin (100 ug/ml). Vi opnåede rifampicinresistente (RifR) og streptomycinresistente (StrepR) mutanter af begge typer for både NCDO712 og NCDO505. Efter en del tovtrækkerier og diskussioner fik vi overbevist Danisco/Dupont om at mutanterne voksede lige så godt som moderstammerne, og syrnede med samme hastighed (se Danisco/Duponts syrningskurver hvor NCDO505 ikke groede i figur 22, og figur 23 for vores dokumentering for nedsyrning).

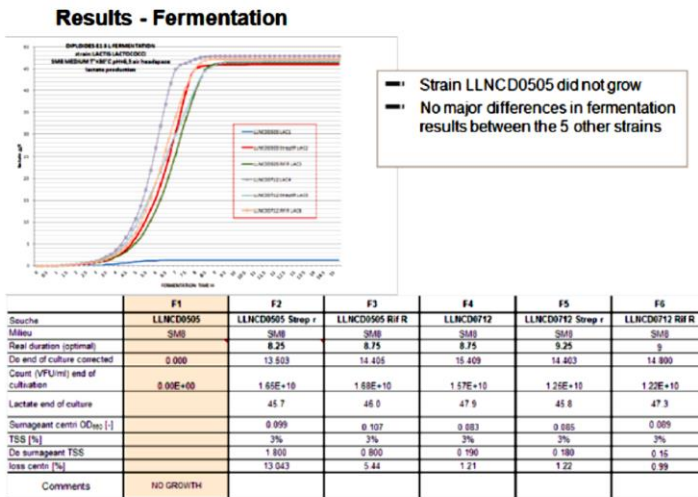


Figure 21: Fermentation evaluation of the dairy strains and the resistant derivatives. There were no observable differences in the fermentation profiles of the 6 strains except for *Lactococcus lactis* NCDO505 which did not grow at all.

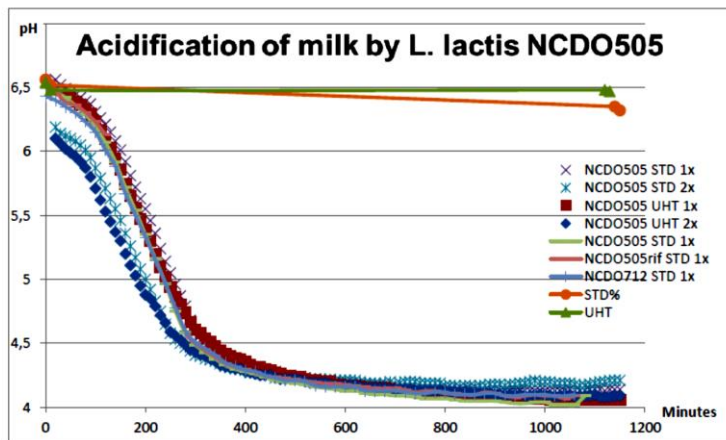


Figure 23: An overview of the acidification properties of the *L. lactis* NCDO505 strain in standard semi-skimmed milk from Arla and in UHT milk from Aldi – the latter resembles the milk used for cheese fermentation. Two inoculation sizes were tried. The acidification pattern was compared to the acidification pattern of the NCDO712 strain and no difference was found for the different milk types or for the different inocula. The variation of starting pH when comparing the double inoculum with the single inoculum, arises from the fact that the starter culture (SA + lactose) is acidified and a larger volume of starter culture contributes to the lower pH. The orange and green lines are the milk without any bacteria.

Der blev udført 2 forskellige ostningsforsøg, hver i triplicat. Det ene forsøg var med blanding af NCDO505 RifR mutant og vildtype NCDO712. Det andet forsøg var omvendt, med vildtype NCDO505 og NCDO712 RifR. Resultatet af forsøgene ses som søjlediagram i figur 26, hvor det kan ses at der ikke er signifikant forskel på tilbageholdelsen af haploide og diploide celler mellem NCDO712 og NCDO505 RifR i forsøg 1/2/3 eller mellem NCDO505 og NCDO712 RifR i forsøg 4/5/6. Der er stor overensstemmelse mellem cellekoncentrationen i alle Samples A, og ligeledes for de øvrige samples.

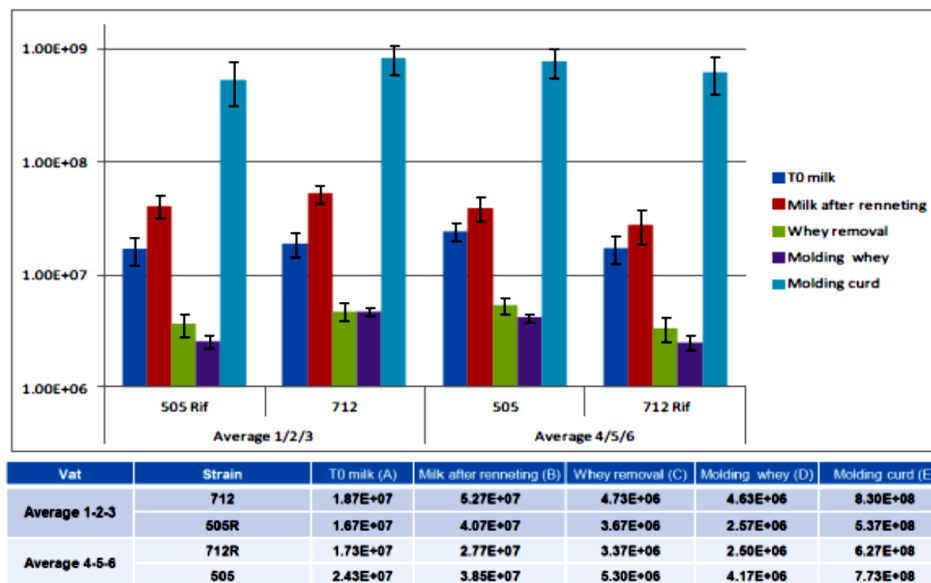


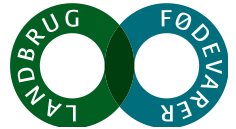
Figure 26: Enumeration of bacteria per ml in curd and whey during cheese production. The NCDO505 strain is haploid and the NCDO712 strain is diploid. No significant differences are seen between the number of haploid and diploid cells present in the comparable samples. The average numbers arise from triplicates.

	Total number of bacteria			Growth no. of generations	Fraction in whey
	before	after	in whey		
Average All	6.27E+10	9.67E+10	4.67E+09	1.54	0.05
SD	8.72E+09	1.81E+10	8.52E+08	0.19	0.01
SD/average	0.14	0.19	0.18	0.13	0.24
Average 712	4.76E+10	7.86E+10	3.59E+09	1.65	0.05
SD 712	1.02E+10	2.02E+10	8.99E+08	0.18	0.01
SD/average	0.21	0.26	0.25	0.11	0.29
Average 505	4.64E+10	6.64E+10	3.41E+09	1.42	0.05
SD 505	8.17E+09	1.55E+10	8.96E+08	0.14	0.01
SD/average	0.18	0.23	0.26	0.10	0.21

Assumptions: Volume before= 1000 ml
Volume after = 900 ml whey + 100 ml curd

Table 4: Result from retention of bacteria in Gouda cheese. "Before" is the total number of bacteria in 1000 ml milk after addition of renin. "After" is the total number of bacteria in 900 ml whey and 100 ml curd. "In whey" is the total number of bacteria in the two whey samples assuming that the total whey volume adds up to 900 ml. "Growth" is calculated from the total number before and total number after. The fraction of bacteria in whey is found from the total number of bacteria in whey and the total number of bacteria before.

De sammenfattede tal i tabel 4 fortæller at det samlede antal celler under ostningen steg fra 63 til 97 milliarder, hvis vi regner med at ostmassen udgør 100 ml af de samlede 1000 ml mælk, og at vollen derfor udgør 900 ml. Det er en forøgelse der viser at de fleste bakterier har delt sig en gang, men at mange slet ikke har delt sig. Det andet interessante resultat var at 95% af laktokokkerne blev tilbageholdt



af ostematrix under alle betingelser, så kun 5% endte i vallen. Det gav dog stadig en koncentration på 2 til 5 millioner laktokokker per ml. valle. Man kan konkludere med stor sikkerhed at haploide celler tilbageholdes lige så effektivt som diploide.

Analyse af diploide laktokokker med forskellige udgaver af samme gen (funktionelt diploide stammer).

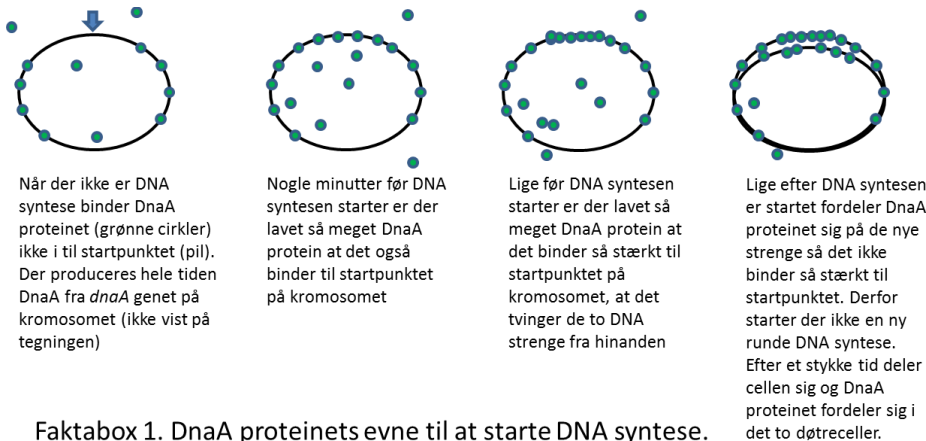
For at kunne komme med konklusioner om diploide celler har andre egenskaber end haploide celler blev der iværksat en undersøgelse om der var iagttaget funktionelt diploide laktokokker. Denne undersøgelse viste at flere forskere havde oplevet at det var muligt at inaktivere gener som man havde forventet var essentielle. Generne var blevet inaktiveret ved genetisk indkrydsning af et resistensgen, som medførte at mutantstammen var blevet resistent overfor et antibiotikum. Der blev fra DTU opnået evidens for at der i samme stamme var et funktionelt og et ødelagt gen for enzymet PRPP synthetase (*prs* genet). Tilsvarende havde den anderkendte forsker Bert Poolmann opnået stammer med et funktionelt og et ødelagt *** gen. Ingen af laktokokstammerne er genomsekventeret, så det er ikke 100% verificeret, men meget tyder på at den diploide MG1363 er i stand til at fungere som funktionelt diploid.

Analyse af kromosomstørrelsen i haploide og diploide laktokokker

Det er muligt at visualisere størrelsen af kromosomer fra bakterier og gær med pulsed field gel-elektroforese. Bakteriernes DNA må ikke gå i stykker, så intakte bakterierne støbes ind i agarose og deres cellevæg bliver nedbrudt enzymatisk inde i gelen før elektroforesen udføres. Hvis en diploid bakteries DNA findes som to adskilte kromosomer vil det ikke være muligt at se forskel på dem og haploide bakteriers DNA. Men hvis den diploide bakterie har to kromosomer der hænger sammen til et af dobbelt længde vil man kunne se forskel. Vi har forsøgt mange gange at sammenligne kromosomstørrelserne for haploide og diploide laktokokker, men det har aldrig givet så klare resultater at der kunne drages nogen konklusion.

Analyse af laktokokker med ændrede niveauer af DnaA proteinet.

Vi starter lige med en kort præsentation af DnaA proteinets virkning i faktabox 1. Proteinet er den faktor der starter DNA syntesen ved at adskille de to strenge fra hinanden i startpunktet, der kaldes "origin of replication". Måden hvorpå DnaA regulerer hvornår der skal startes på DNA syntesen er meget kompleks, men er afhængig af hvor mange DnaA molekyler der er i cellen. Hvis en celle indeholder høje niveauer af DnaA forventer vi derfor, at syntesen af kromosomets DNA vil starte meget oftere, så cellerne kommer til at indeholde flere kopier af kromosomet.



Faktabox 1. DnaA proteinets evne til at starte DNA syntese.

For at opnå stammer med forskellige niveauer af DnaA proteinet indsatte vi, på kromosomet af MG1363, kunstige promotorer foran stammens eget *dnaA* gen. Først skulle vi imidlertid have mulighed for at måle mængden af DnaA på en simple måde. Vi indsatte derfor et *gusA* reportergen efter *dnaA* på en sådan måde at vi ikke ødelagde dette eller det næste gen på kromosomet (se figur 1). Mængden af GusA reporter i cellen svarer til mængden af DnaA, og da GusA er nemt at måle med en farvereaktion kunne vi nemt bestemme DnaA niveauet.

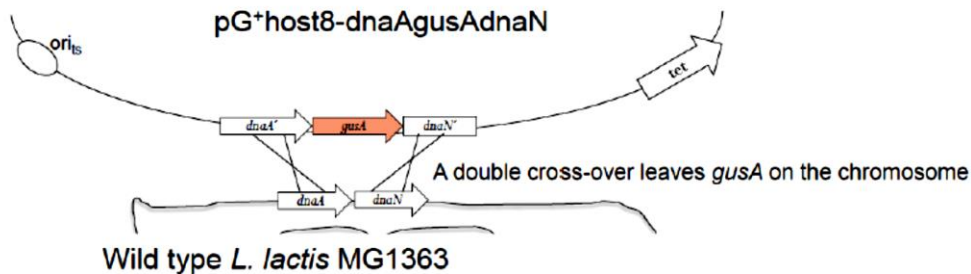


Figure 1: A schematic representation of the double crossover event which leads to the insertion of *gusA* on the chromosome, without leaving any antibiotic marker

Herefter indsatte vi syntetiske promotersekvenser med randomiserede sekvenser foran *dnaA* genet, og opnåede hvad vi kalder et *dnaA* promoterbibliotek. Et promoterbibliotek består af en samling af bakterier med forskellige niveauer af genudtryk, altså her med forskellige niveauer af DnaA proteinet. I figur 3 ses placeringen af den normale promoter (P) og de syntetiske promotersekvenser (SP) i hver celle i biblioteket.

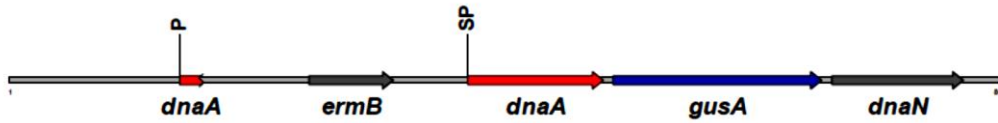


Figure 3: Schematic representation of the DNA of synthetic promoter clones. P: Wild type promoter; SP: Synthetic promoter. The arrows illustrate some of the important genes present. The first *dnaA* gene (left) is truncated, whereas the second *dnaA* gene (middle) encodes the complete DnaA protein. *ermB* encodes a erythromycin resistance methylase protein ; *gusA* is the beta-glucuronidase protein; *dnaN* is the beta-subunit of DNA polymerase III and is found in the *dnaAN* operon

Et stort udvalg af sådanne laktokok-stammer blev analyseret for DnaA niveau, ved at måle på GusA reporteren. DnaA niveauerne ses i søjlediagrammerne herunder i figur 7, sorteret efter størrelse. Det er tydeligt at det blev fundet flere stammer med DnaA niveauer over vildtypens (til højre for den røde søjle) end der blev fundet under dette niveau. Det laveste niveau var på ca. 40% af vildtype laktokokkens , og det højeste var på ca 640% (se figur 7B).

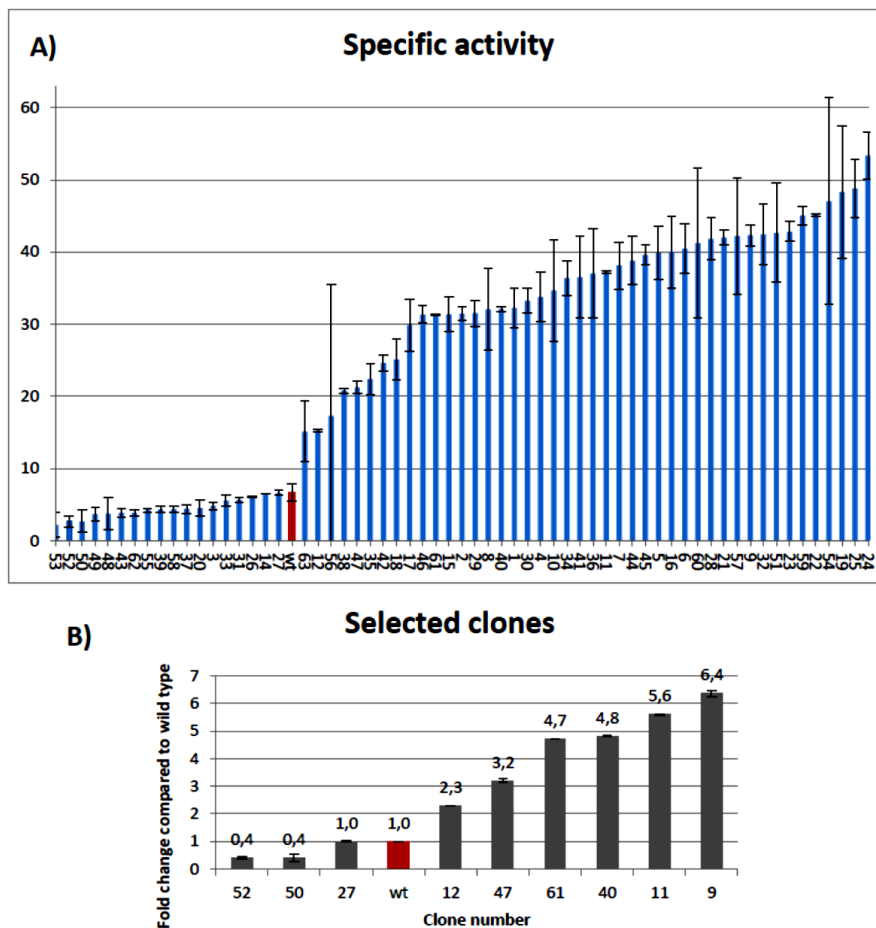
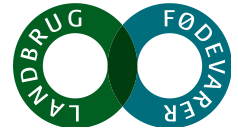


Figure 7: A) The result from the *gusA* assay. The 62 clones obtained covered a large range of DnaA expression from 1/3 to 8 times the expression of the wild type (shown in red). Nine clones were selected for further analysis. B) The *gusA* activity in the selected clones normalized to wild type (shown in red). The red bar corresponds to the WT strain, whereas the rest of the clones are arranged according to the level of activity.



Væksthastigheden af stammerne var forbløffende nok ikke særlig afhængig af DnaA niveauet i cellerne (se figur 8), og alle stammer groede eksponentielt (se figur 4 herunder)

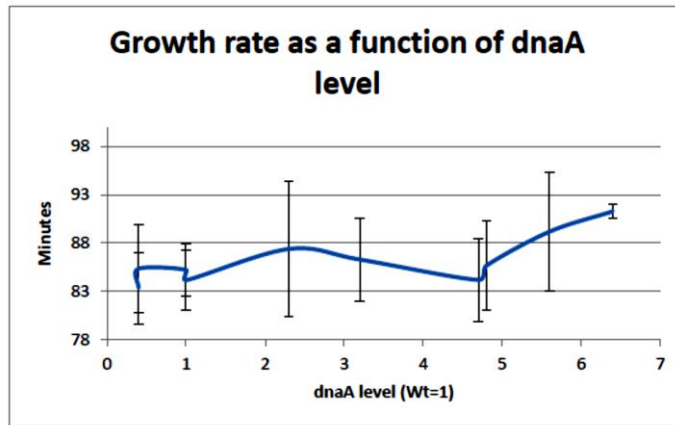


Figure 8: The selected clones arranged according to dnaA level measured as β -glucuronidase activity.

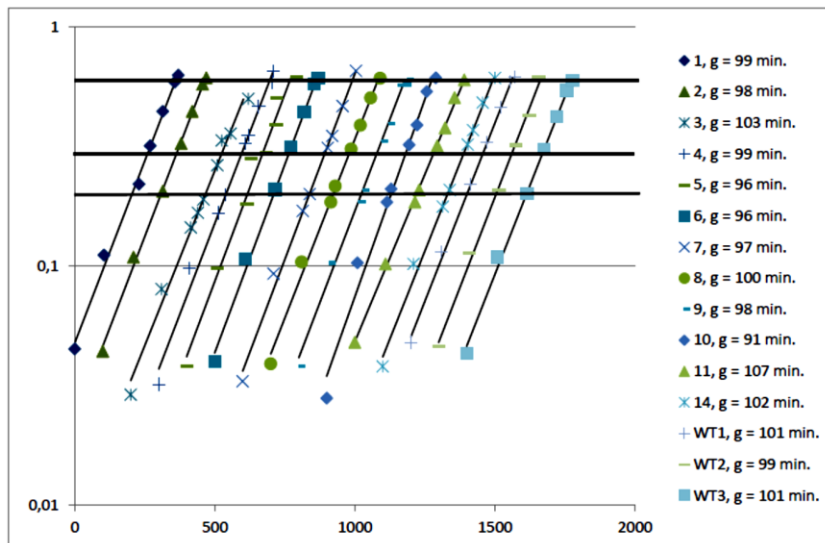


Figure 4: Growth of promoter clones in SAL medium supplemented with 1% maltose. Bold lines indicate the time of sample collection.

Vi var meget interesserede i om DnaA udtrykket per celle var konstant gennem den eksponentielle væksthase. Det viste sig imidlertid at celler i den sene del af fasen indeholdt mere DnaA protein per celle end i den tidlige (data er ikke vist).

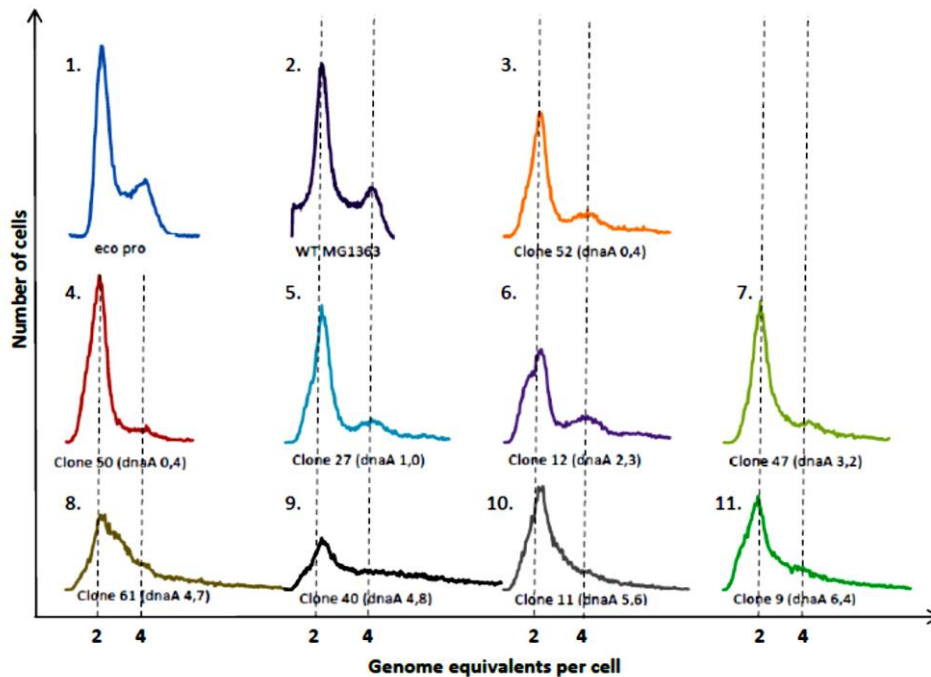


Figure 9: Histograms from flow cytometric analysis of 1) a slow growing *E. coli* (generation time: 128 minutes) used as a size standard, 2) Wild type *L. lactis* MG1363 (generation time: 100 min), 2-11) the selected clones from the obtained promoter library (generation times: see Figure 6). Intensity of fluorescence, which is equivalent to DNA content, is depicted on the x-axis and cell number is shown on the y-axis. A peak on the histogram represents cells that do not replicate, and therefore contains one (only *E. coli*), two or four complete chromosomes.

Den vigtigste analyse af stammerne skete ved hjælp af flow cytometri. Her bliver cellerne en for en ført forbi et mikroskop med et fluorescens-følsomt kamera, hvor cellediameteren og DNA indholdet bliver målt. Ud fra fordelingen af DNA indhold kunne vi visualisere hvor mange kromosomer bakterierne i gennemsnit havde. I figur 9, panel 2 kan man se at en kultur af MG1363 har flest bakterier med 2 kromosomer, men også en mindre fraktion af bakterier med 4 kromosomer. Til sammenligning har en kultur af *Escherichia coli* (panel 1) en stor fraktion af bakterier med 1 kromosom (den store peak) og en mindre fraktion med 2 kromosomer (den lille peak til højre). Stammerne 52, 50 og 27 (panelerne 3, 4 og 5) som har DnaA niveau på 40-100% af vildtype-niveauet ser næsten ud som MG1363. Stammen 12 (panel 6) ser ud til at indeholde en større fraktion af bakterier med 4 kromosomer end MG1363. Alle stammer med højere DnaA niveau end 300%, ser ud til kun at have 2 kromosomer, men ser i det hele taget underlige ud.

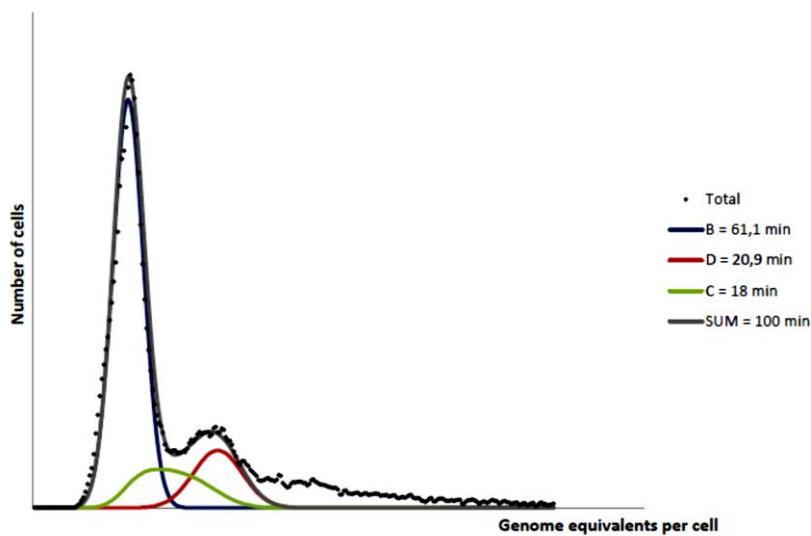
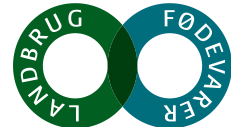


Figure 11: An example of a flow cytometric DNA histogram of a *dnaA* clone of *L. lactis* MG1363 grown in SAL supplemented with maltose and lipoic acid at a generation time of 95 min. The clone (#52) has 0.4 times the amount of DnaA as the wild type. The DNA histogram was resolved into B (dark blue line), C (green line), and D (red line) periods. The grey line show the accumulation of the B, C and D curves and the dotted black curve is the measured values. From the lines the length of the B, C and D periods was calculated (see also Table 1).

Ud fra flowcytometrikurver som dem i figur 9, kan man udregne B, C og D tiderne for laktokokkernes vækstfaser (se figur 11). C-tiden er den periode hvor DNA-syntesen foregår; B-tiden er tiden mellem celledeling og starten på DNA-syntesen; og D-tiden er tiden fra afslutningen af DNA-syntesen til celledelingen. Ud fra de fundne kurver blev tiderne bestemt. Disse ses i tabel 1. Normalt regner man C perioden for konstant, så den store variation i DNA syntesetiden fra 15 til 60 min lyder lidt usandsynlig. Det er muligt at forudsætningerne for denne udregning ikke er opfyldt i stammerne med høje DnaA niveauer, så vi tør ikke rigtig sætte lid til disse udregninger.

Name	<i>dnaA</i> level (relative to wild type)	B period (minutes)	C period (minutes)	D period (minutes)	Sum (minutes)
Clone 50	0.4	70	20	10	100
Clone 52	0.4	61	18	21	100
MG1363 wt	1.0	42	33	25	100
Clone 27	1.0	65	15	20	100
Clone 12	2.3	60	20	20	100
Clone 47	3.2	60	20	20	100
Clone 61	4.7	18	60	22	100
Clone 40	4.8	37	48	15	100
Clone 11	5.6	52	38	10	100
Clone 9	6.4	42	48	10	100

Table 1: The lengths of the different cell cycle periods

I alle de tidligere laktokokker med ændrede DnaA niveauer havde vi fjernet den normale regulering af *dnaA* genet, samtidig med at vi efterlod et halvt *dnaA* gen (se det første stump *dnaA* gen til venstre i figur 3) som kunne give problemer. Vi prøvede at fjerne hele *dnaA* genet ved genetisk overkrydsning med et plasmid der indeholdt de flankerende sekvenser for *dnaA*, men uden genet. Dette viste sig efter flere måneders arbejde at være meget besværligt og blev opgivet.

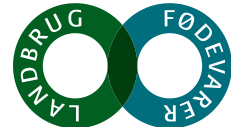
For at se om forøgede mængder af DnaA i den haploide stamme NCDO505 kunne medføre at den blev diploid, startede vi på at konstruere et bibliotek af NCDO505 som indeholdt sit normale *dnaA* gen, og derudover fik en ekstra mængde DnaA fra et *dnaA* der blev indsat på et andet sted på kromosomet. Det andet *dnaA* gen blev transskriberet fra syntetiske promotorer. Herunder i figur 14 ses hvordan genet indsættes i indsættelsepunktet for bakteriofagen TP901-1 (attB).



Figure 14: Schematic representation of attL-attR site promoter clones. SP: Synthetic promoter. The arrows illustrate some of the important genes present. *dnaA* gene (middle) encodes the complete DnaA protein. *ermB* encodes a erythromycin resistance methylase protein; *gusA* is the beta-glucuronidase protein; *dnaN* is the beta-subunit of DNA polymerase III and is found in the *dnaAN* operon.

Der blev opnået en del sådanne kloner, men da alle de flowcytometre vi før havde kunnet anvende var gået ned, strandede det projekt indtil videre.

Selektion af diploid-til-haploid mutanter og haploid-til-diploid mutanter. Ved hjælp af ISS1 elementet blev der lavet mutantbiblioteker fra de diploide stammer MG1363 og NCDO712 samt de haploide stammer NCDO505 og



NCDO2031, hvor vi beregnede at der i hver eksisterede så mange mutantbakterier at det måtte have ramt hvert eneste ikke-essentielle gen i mindst en af dem.

Disse biblioteker skulle sorteres ved hjælp af en Fluorescence Assisted Cell Sorter (FACS), så små haploide celler skulle sorteres fra store diploide. Det blev vist i et kontrolforsøg at sorteringen kunne lade sig gøre, idet vi fra en 1:2 blanding af haploide og diploide celler kunne sortere os frem til en 8:1 blanding.

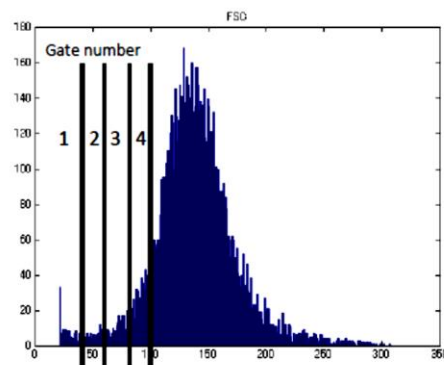


Figure 15: An example of the histogram from a FACS analysis. The gates indicate the area where cells are collected and are numbered 1-4 with number 4 containing the largest cells. Modified from [12]

Figur 15 viser størrelsesfordelingen af bakterierne fra FACS analysen. Der blev sorteret efter størrelse så bakterierne i område 1 (gate 1) blev sorteret for sig, og ligeledes de øvrige gates 2, 3 og 4.

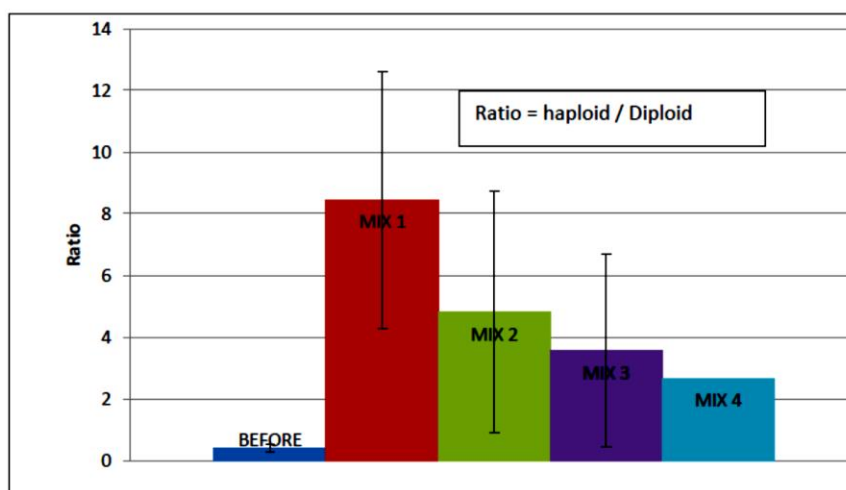


Figure 16: Result from control experiment. The "Before" bar indicates the haploid / diploid ratio in the culture prior to FACS sorting. The MIX1 – MIX4 indicates the ratio in gates 1-4, where gate 1 (presumably) contain fewer diploid cells than gate 2, which contain

I figur 16 ses først fordelingen mellem haploide og diploide i den totale blanding som blev analyseret med FACS i figur 15. Denne fraktion har en fordeling på ca. 0.5 haploid/diploid (blå søjle). I gate 1 blandingen er fordelingen 8 haploid/diploid (rød søjle), og 5 for gate 2 (grøn søjle). Dette viser meget tydeligt at det er muligt ved hjælp af FACS at sortere efter størrelse.

Efter laktokokbiblioteket var blevet sorteret blev otte mutanter udvalgt og analyseret for om de var blevet mindre eller på anden måde var ændret. I figur 17 ses deres væksthastigheder som desværre ikke var væsentlig forskellige fra vildtype stammen.

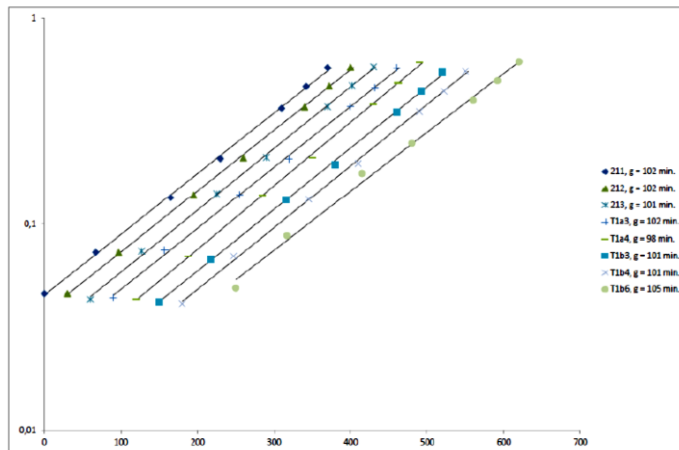


Figure 18: The cells from the first round of sorting, all seemed to grow alike. Not all of the eleven collected cultures grew, which is the reason why only eight growth curves are shown.

Profilen af cellerne med hensyn til DNA indhold versus størrelse viste heller ikke nogen forskel fra vildtypen. Figur 19 viser diagrammerne for tre udvalgte mutanter i sammenligning med vildtypen. Det eneste tidspunkt flowcytometrets FACS funktion virkede efter hensigten i hele forløbet var da vi lavede kontrolforsøget til figur 15 + 16. Vi anvendte tre forskellige FACS maskiner på DTU og KU i projektperioden, og ingen af dem virkede til sortering mere end et par uger af gangen. På disse tidspunkter var de selvfølgelig optaget af maskinernes ejere. Vi måtte konkludere at metoden virkede hvis man havde rådighed over en veltrimmet FACS maskine, men at dette ikke var tilfældet mere end et par gange i projektførløbet. En ny FASC maskine ville have kostet omkring en til to millioner kroner i anskaffelsespris, så dette var ikke en mulighed.

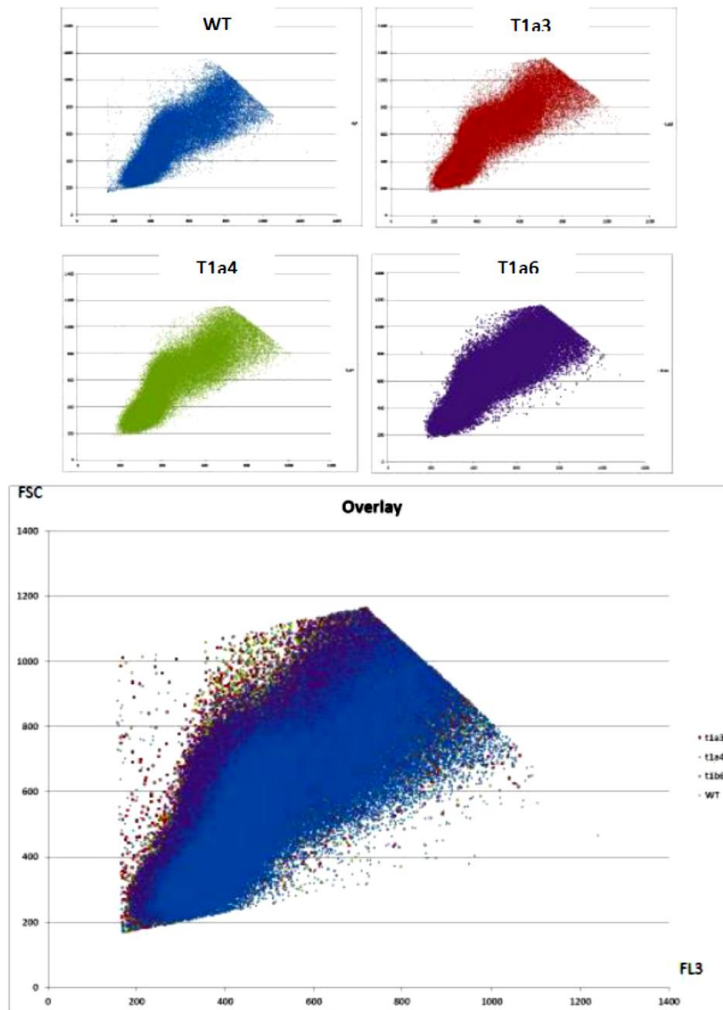
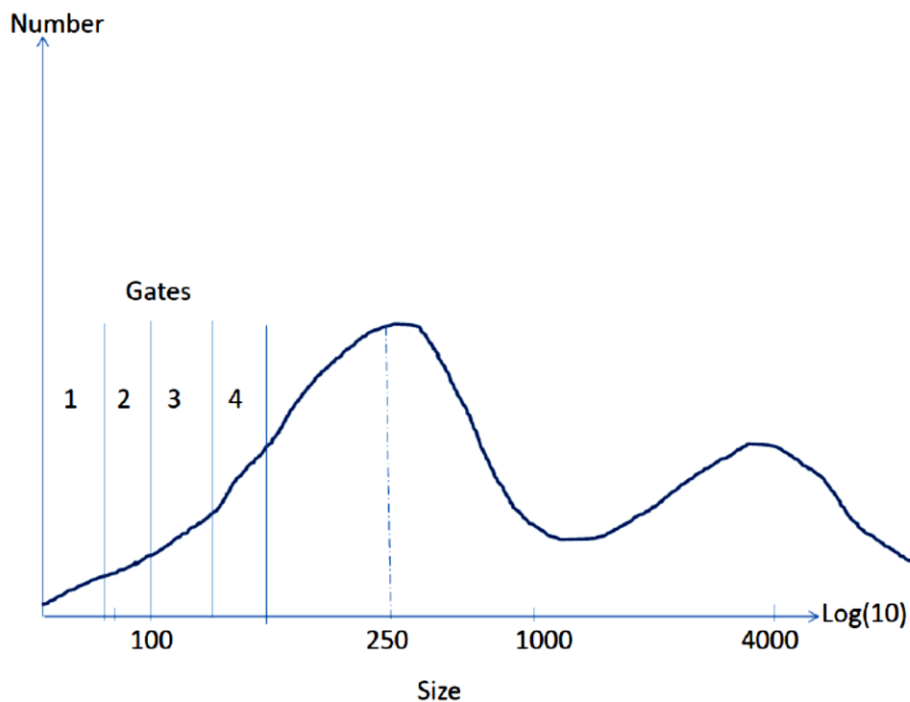


Figure 19: The top four plot show the three cultures T1a3 (red), T1a4 (green) and T1b6 (purple) and the unsorted *L. lactis* NCD0712 strain (blue). The top plot is an overlay of the top four plots. The x-axis shows the fluorescence and the Y-axis shows the size of the cells.

Selektion af haploide laktokokker fra MG1363 ved indsættelse af gener fra en haploid laktokok.

For at undersøge diploid-til-haploid problematikken med den omvendte metodik, blev der lavet et bibliotek af MG1363 celler, som hver især modtog et tilfældigt stykke DNA fra en haploid laktokok. I stedet for at analysere mutanter der manglede forskellige proteiner, så vi her efter bakterier som havde overskud af forskellige proteiner ved at sætte DNA-stykker ind i et plasmid og derefter indsætte dem i kromosomet på MG1363. Der blev anvendt samme type FACS sortering for at adskille små celler fra laktokok-biblioteket. FACS maskinen havde desværre driftsproblemer, og virkede ikke her eller i resten af projektperioden. Figuren herunder viser FACS profilen fra et indledende forsøg, med størrelsen ud af X-aksen og antallet af bakterier med en given størrelse ud af Y-aksen. Bibliotekerne er gemt, men på grund af de tekniske vanskeligheder blev delprojektet sat i bero.



Konstruktion af mutanter hvor gener der burde være involveret i kromosomtallet blev ødelagt.

I stedet for at lede efter tilfældige mutanter som var ændret i deres kromosomantal per celle, gik vi nu målrettet til værks for at fjerne specifikke proteiner fra cellerne, som fra litteraturen var kendt for at have en virkning på kromosomtallet. Vi fokuserede først på at ødelægge genet *parA*, som er nødvendigt for fordelingen af kromosomerne til hver af dattercellerne under en celledeling. Derefter fokuserede vi på at ødelægge *cshA* genet, som ligger ved siden af *parA* genet på kromosomet af MG1363. CshA proteinet, som kodes af *cshA* genet har en DNA "resolvase" funktion som kunne være vigtig for om to kromosomer kunne smelte sammen til et enkelt (dobbelt så stort) kromosom. Vi konstruerede mutanterne og analyserede deres væksthastighed. Vækstkurver ses i figur 28. Det er meget interessant at det ikke observeres nogen stor forskel i væksthastig på mutanterne og vildtypen.

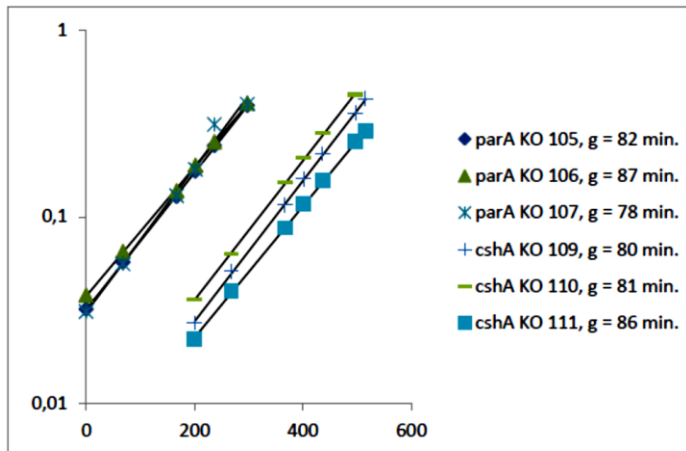


Figure 28: Growth of *parA*- and *cshA*- knock out clones for flow cytometry. The strains were grown in triplicates in SAL medium supplemented with glucose, arginine, asparagine and lipoic acid. The suffix numbering corresponds to the number the strain has in the strain collection.

Under et mikroskop så mutanterne imidlertid meget anderledes ud end vildtypen. I figur 29 kan det tydeligt ses at *parA* mutanten danner lange kæder medens *cshA* mutanten giver meget større celler, efter bakterierne blev vokset i kemisk defineret medium. Efter vækst i det rige GM17 medium kunne der ikke identificeres nogen væsentlige forskelle på mutanterne (se figur 30).

GSA ON

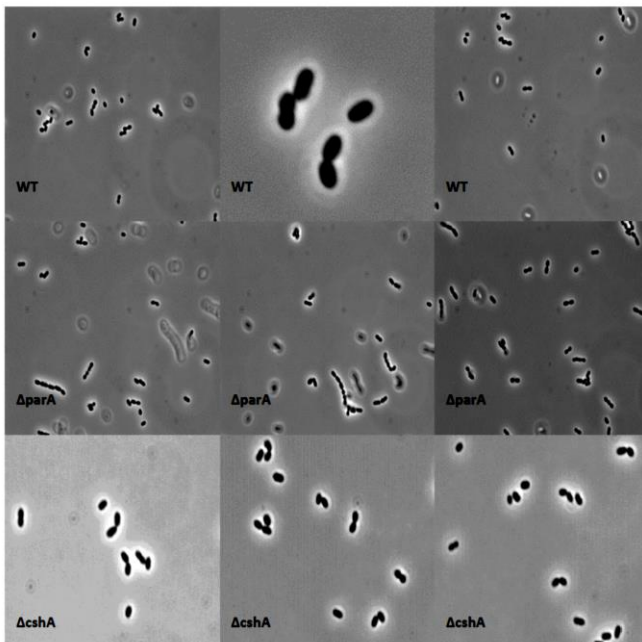


Figure 29: Microscopy on clones grown over night in SA media supplemented with glucose

GM17 ON

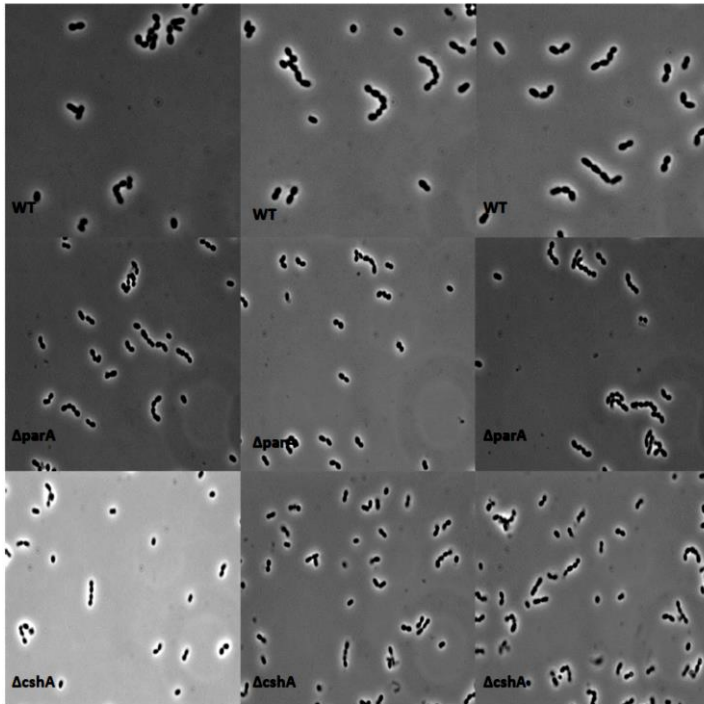
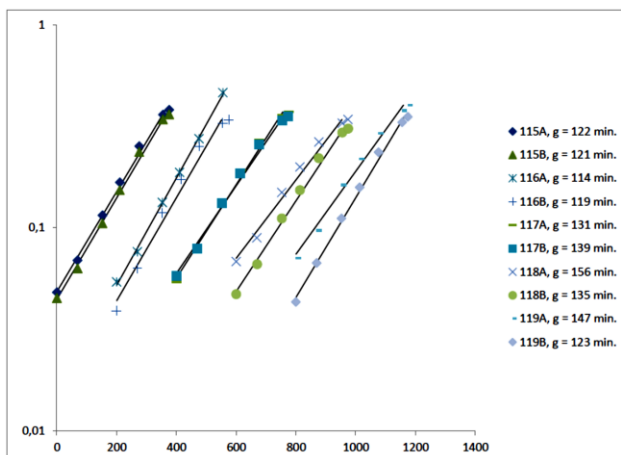


Figure 30: Microscopy on clones grown overnight in GM17

Analyse af stammer hvor *parA* og *cshA* generne blev overekspresset.

I sidste afsnit undersøgte vi om mangel på *parA* genet havde virkningen. Da vi ikke kunne udelukke at overgangen fra diploid-til-haploid krævede højere mængde af ParA eller CshA protein, lavede vi også stammer hvor *parA* genet blev udtrykt højere end i vildtypen. Væksten af sådanne stammer ses i figur 31. Niveuet af ParA i stammerne ses i figur 32. Hvis vi sammenholder de to figurer ses det at et middelhøjt niveau af ParA medfører at cellerne vokser dårligst (høj fordoblings-tid), medens både lave og høje niveauer medfører hurtigere vækst. Selv om dette var interessante observationer blev projektet stoppet under Malenes barsel, og blev ikke genoptaget da hun fik et nyt job med det samme efter afslutningen af barselsloven.

Figure 31: Growth of clones overexpressing *parA* in reduced SAL medium supplemented with glucose and erythromycin. The cultures were incubated at 30°C without shaking. Samples for flow cytometry was collected at OD600=0.4

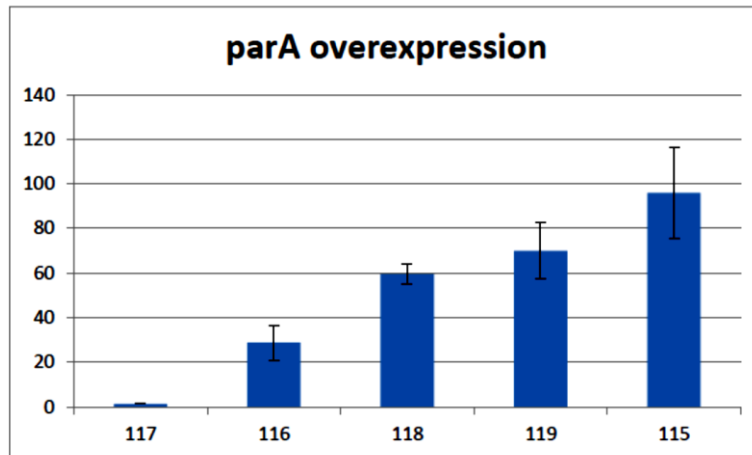


Figure 32: The level of *parA* overexpression in promoter clones measured as β -galactosidase activity. The numbers correspond to the numbers used in the strain collection.

Ændringer i transkriptionsmønsteret mellem haploide og diploide stammer og stammer med overudtryk af *dnaA* genet.

I den originale ansøgning havde vi planlagt et forsøg hvor laktokokkernes genudtryk skulle analyseres under ostemodningen. Dette skulle ske i samarbejde med Danisco/Dupont i Frankrig. Imidlertid viste det sig, at vi ikke ville kunne sikre os at prøverne blev taget på den rigtige måde. RNA syntesen og nedbrydningen i bakterieceller ændrer sig virkelig hurtigt, så bakterieprøverne skal behandles hurtigt mellem høsten og RNA ekstraktionen. Dette var meget problematisk da disse forsøg var planlagt i et tidligere projekt ansøgt af Mogens Kilstруп, og var blevet koblet på dette projekt i en samlet ansøgning.

I stedet for blev det aftalt at transkriptionsmønsteret skulle sammenlignes mellem haploide og diploide celler efter vækst under laboratorieforhold i kemisk defineret medium.

Det blev også aftalt at transkriptionsmønsteret skulle sammenlignes i nogle af de stammer med forskellige niveauer af DnaA proteinet som var konstrueret i projektet. Bakterierne (se oversigten i tabel 5) blev vokset eksponentielt under reproducerbare forhold (se figur 33), og RNA blev ekstraheret fra hver af dem.

Name	Clone number	<i>dnaA</i> level (relative to wt)	Phenotype
High_ <i>dnaA</i>	12	2.7	-
Wt_ <i>dnaA</i>	27	1 (constitutive)	-
Low_ <i>dnaA</i>	50	0.4	-
MG1363	<i>L. lactis</i> MG1363	1	Diploid
NCDO712	<i>L. lactis</i> NCDO712	1	Diploid
NCDO505	<i>L. lactis</i> NCDO505	1	Haploid

Table 5: The strains used for transcriptomics. The *dnaA* level is measured as the level of β -glucuronidase activity in the *dnaA* clones (project I). The three *dnaA* clones also contain, beside a *dnaA* gene downstream of a synthetic promoter, a truncated *dnaA* version.

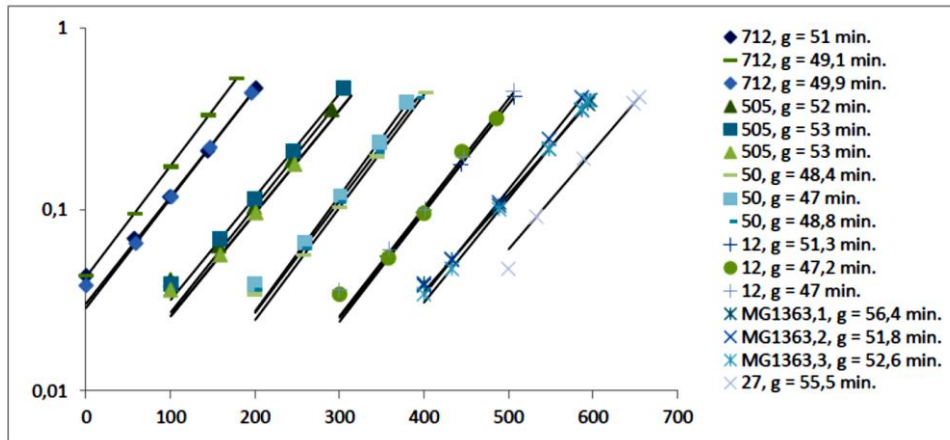


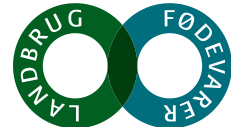
Figure 33: Growth curves of the 15 clones for transcriptomics analysis. They are biological triplicates (except for clone no. 27)

DNA mikroarray analyser blev udført på prøverne, og deres transkriptionsprofiler blev sammenlignet bioinformatisk. Resultaterne ses herunder. Jeg viser detaljerede oplysninger for sammenligningen mellem mRNA niveauerne i clone 12 og MG1363. Andre sammenligninger vil kun blive vist med sammenfattende figurer. På mRNA-niveau viste det sig at clone 12 have 3,4-fold højere niveau af DnaA end MG1363, hvor der tidligere var påvist 2,3-fold (se figur 7B). Forskellene i genudtryk mellem de to stammer viste sig specielt at give sig udtryk i sukkermetabolismen (se figur 34 og 35), men der viste sig ingen system i ændringerne da der både var op- og ned- regulering af gener fra samme klasse.

High-dnaA vs MG1363

Nedregulerede gener	logFC	Foldchange	Function	Average foldchange	SD
ptcC	-2.174	0.222	cellobiose PTS	0.182	0.035
	-2.577	0.168			
	-2.244	0.211			
	-2.890	0.135			
	-2.517	0.175			
bglA	-3.622	0.081	6-phospho-beta-glucosidase	0.128	0.057
	-3.814	0.071			
	-2.853	0.138			
	-2.884	0.135			
llmg_0673_4	-2.230	0.213	putative membraneprotein	0.338	0.051
	-1.421	0.374			
	-1.727	0.302			
tnp1297	-2.809	0.143	Transposase (IS)	0.197	0.048
	-1.797	0.288			
llmg_0676_1	-1.992	0.251	Acetyltransferase	0.478	0.025
	-2.430	0.186			
	-2.341	0.197			
	-2.997	0.125			
llmg_2107_2	-2.141	0.227	?	0.493	0.006
	-1.121	0.460			
	-1.014	0.495			
llmg_2530_1	-1.009	0.497	?		
	-1.033	0.489			

Figure 34: Down-regulated genes in the promoter strain with an elevated dnaA level. The shown genes all had at least two probes showing a logFC of maximum -1. The functions with the same color indicate that the genes might be in an operon.



Opregulerede gener	logFC	Foldchange	Function	Average foldchange	SD
	1.346	2.541			
llmg_0001_1	1.942	3.842	dnaA	3.396	0.704
	2.031	4.087			
	1.638	3.112			
llmg_0453_2	1.138	2.200	Sucrose-specific-PTS enzyme IIABC	2.177	0.033
	1.107	2.154			
	3.162	8.948			
llmg_0454_1	2.022	4.061	PTS beta-gluc	6.549	1.759
	2.791	6.923			
	2.598	6.056			
	2.756	6.757			
	2.848	7.199			
trePP	3.078	8.442	Trehalose/maltose hydrolase	10.195	3.044
	3.196	9.163			
	3.906	14.988			
	3.483	11.185			
	3.541	11.640			
pgmB	3.046	8.260	beta-phospho-glucomutase	7.450	3.581
	3.284	9.743			
	2.197	4.587			
llmg_0457_3	1.595	3.021	putative lipase/esterase	2.321	0.165
	1.286	2.438			
	1.140	2.204			
llmg_0675_2	1.172	2.254	?	2.567	0.491
	1.210	2.314			
	1.647	3.132			
llmg_0677_1	5.913	60.273	putative secreted	37.863	23.608
	4.071	16.805			
	5.813	56.231			
	4.181	18.142			

Figure 35: Up-regulated genes in the promoter strain with an elevated dnaA level. The shown genes all had at least two probes showing a logFC of minimum 1. The functions with the same color indicate that they might be in an operon.

Vi har forsøgt at sammenfatte de største ændringer i figur 36, hvor op-regulerede gener i clone 12 er vist med grønne smileys, medens ned-regulerede gener er vist med røde. Ændringerne er interessant og uventede, men kræver store forsøg til verificering hvis de skal publiceres.

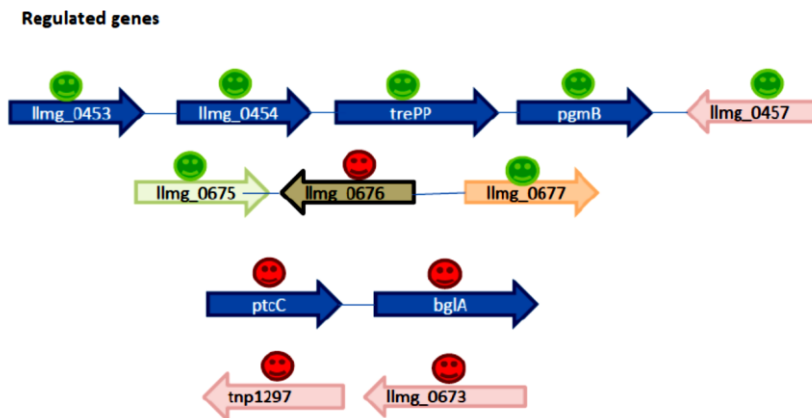


Figure 36: An illustration with the above mentioned up- and down-regulated genes in the promoter strain with elevated dnaA level. The green smileys indicate an up regulated gene, whereas the red smileys indicate a down-regulated gene. The arrows show the proposed direction of transcription.

Når clone 12 sammenlignes med stammen NCDO712 som er moderstamme til MG1363 ses et tilsvarende mønster (se sammenfatning i figur 37).

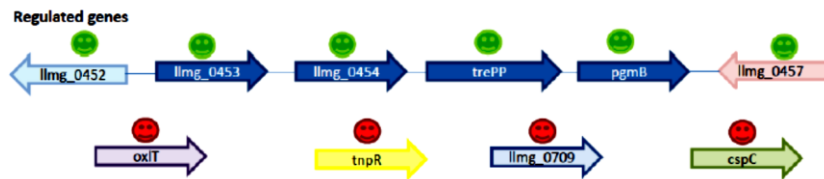


Figure 39: An illustration with the above mentioned up- and down-regulated genes in the promoter strain with elevated *dnaA* level compared to the *L. lactis* NCDO712 strain. The green smileys indicate an up-regulated gene, whereas the red smileys indicate down-regulated genes. The arrows show the proposed direction of transcription.

Når clone 50 som har 0,4-fold DnaA niveau i forhold til MG1363 sammenlignes med denne (figur 43) eller med NCDO712 (figur 46) ses også et tilsvarende resultat. Højere DnaA-niveau (her MG1363 eller NCDO712) giver opregulering af *trePP* operonen og nedreguleringen af *ptcC-bglA* operonen.

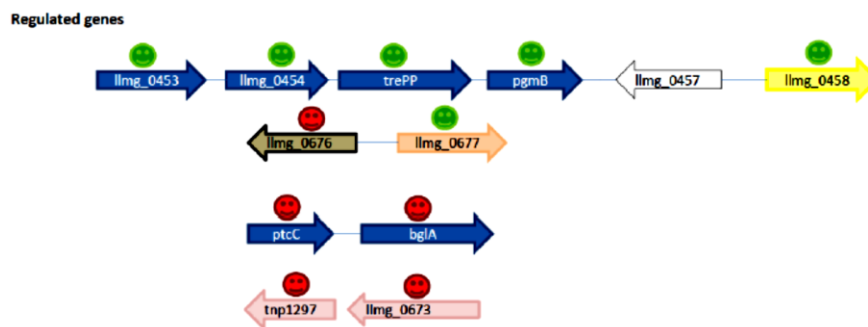


Figure 43: An illustration with the above mentioned up- and down-regulated genes in the promoter strain with lowered *dnaA* level compared to the *L. lactis* MG1363 strain. The green smileys indicate an up-regulated gene, whereas the red smileys indicate down-regulated genes. The arrows show the proposed direction of transcription.

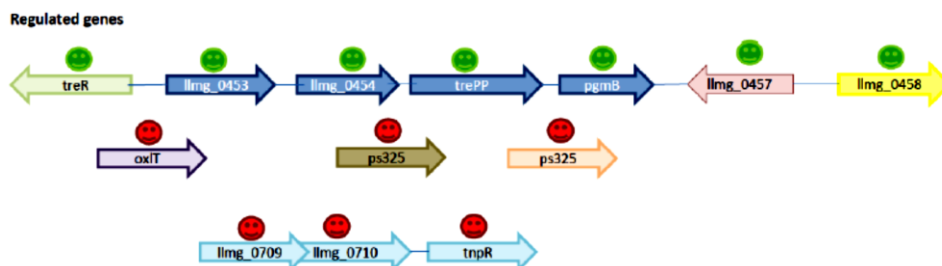


Figure 46: An illustration with the above mentioned up- and down-regulated genes in the promoter strain with lowered *dnaA* level compared to the *L. lactis* NCDO712 strain. The green smileys indicate an up-regulated gene, whereas the red smileys indicate down-regulated genes. The arrows show the proposed direction of transcription.

Til sidst sammenlignede vi profilerne for den haploide stamme NCDO505 og den diploide NCDO712. Begge stammer har som vi tidligere viste (figur 23) alle nødvendige gener for vækst i mælk. Som det ses i figur 51 følger denne analyse trenden fra stammer med ændrede DnaA niveauer idet *trePP-pgmB* generne er nedreguleret i den haploide NCDO505 (altså op-reguleret i den diploide NCDO712). Vi så jo tidligere at stammer med forhøjet DnaA niveau også havde forøget DNA indhold, hvilket korrelerer med op-

regulering af *trePP-pgmB* generne. De øvrige gener der er ændret mellem de haploide og diploide stammer er interessante, men vi kan ikke se nogen sammenhæng mellem denne regulering og en mekanisme for dannelse af haploiditet eller diploiditet

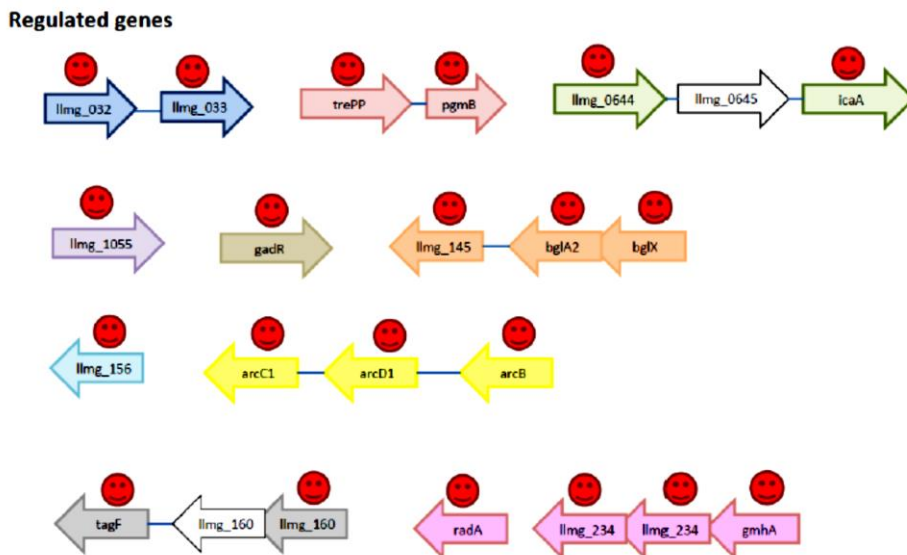
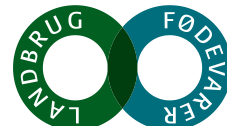


Figure 51: An illustration with the above mentioned down-regulated genes in the *L. lactis* NCD0505 strain compared to the *L. lactis* NCD0712 strain. The red smileys indicate down-regulated genes. The arrows show the proposed direction of transcription.

Hvor langt er der til at resultaterne er anvendelige for mejeribrugget? Udgangspunktet for projektet var meget anvendelsesorienteret, idet vi håbede på at kunne konkludere at store celler med flere kromosomer blev bedre tilbageholdt i ostematrix, og at overvægten af disse celler kunne medvirke til en bedre ostemodning. Det viste sig ikke at være helt så simpelt, idet tilbageholdelsen var fuldstændig ens for de to typer celler.

Da vi udelukkende har fundet de store diploide laktokokstammer blandt mejeribruggets starterkulturer og ikke blandt efterkommerne af laktokokkernes fritlevende forfædre, mener vi at det er mejeribrugget der har fremavlet de store laktokokker. Hvis mennesket har fremavlet diploide laktokokker i løbet af de 5000 til 8000 år mælkefermenteringen har eksisteret, må det være fordi de store diploide bakterier har givet en bedre smag eller fordi de var bedre til at overleve mælkesyrningen. I projektet har vi forsøgt med mange forskellige teknikker at finde baggrunden for at små laktokokker udvikler sig til store diploide laktokokker, men da vi ikke har kunnet opnå klare konklusioner fortæller det os, at vi også skal se efter nye angrebsvinkler. Den mest interessante vinkel ville være at undersøge hvordan laktokokkerne selv oplever ostemodningen. I et projekt under Mejeribrugets Forskningsfond analyserede vi de tidlige faser i mælkesyrningen ved at undersøge hvordan bakterierne om-programmerede deres metabolisme som reaktion på forandringerne. I dette projekt skulle vi have videreført analyserne til også at omfatte modningsprocessen, men vi havde uoverstigelige problemer med at få aftalt produktionen af oste i Danisco's afdeling i Frankrig og derefter at få dem fragtet til Danmark for at få dem analyseret. Nu kan vi se at dette element havde været meget værdifuldt for konklusionerne. For at se om størrelsen af laktokokkerne havde



betydning for modningsprocessen er vi nødt til at analysere ostemodningen med store bakterier og sammenligne den med modningen med små bakterier. Foruden disse analyser vil vi også have brug for at undersøge hvor nemt store og små bakterier går i stykker i osten (autolysering) under modningen. Dette er vigtigt fordi modningen af osten kræver at laktokokkerne går i stykker og deres celleindhold med modningsenzymmer lækker ud. Hvis de store celler går lettere i stykker i osten vil det give en hurtigere og anderledes ostemodning. Et projekt hvor ostemodningen og autolyseringen bliver undersøgt, koblet med afsluttende analyser af DnaA reguleringen ville kunne bringe projektet til et stade hvor det kunne finde anvendelse i mejeribrug.

Hvad kan mejeribrugene bruge dette projekt til? Hvis projektet bliver fulgt til dørs med de nødvendige ekstra eksperimenter, kunne vi stå med en helt ny viden omkring ostemodningen og en viden om hvilke typer stress laktokokkerne oplever i osten i denne periode. Denne viden kunne fortælle mejerierne om anvendelsen af store haploide laktokokstammer vil give bedre oste, og en hurtigere ostemodning. Størrelsen af laktokokkerne har aldrig indgået i beslutningsprocessen omkring sammensætningen af syrevækkeren, så det kunne give endnu en parameter at ændre på for de enkelte mejerier.

9. Afvigelser

9.1 Fagligt

Som beskrevet ovenfor har der været få faglige afvigelser. Vi har måttet undlade at analysere haploide og diploide stammer på nanoskala, idet det planlagte atomic-force mikroskop ikke kunne bringes til at virke.

Vi har også måttet ændre delprojektet med analyse af laktokokkernes respons på modningsprocessen. Da vi ikke kunne opnå en sikret prøveudtagning under ostning aftalte vi at der skulle foretages vækst under laboratoriebetlinger. Vi sammenlignede derfor genudtrykkene (transkriptomet) mellem haploide og diploide stammer og mellem diploide stammer med forskellige niveauer af DnaA proteinet.

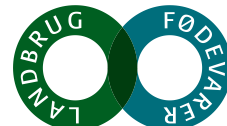
9.2 Økonomisk

Har ikke rådighed over oplysningerne, da jeg først overtog projektet i 2014.

9.3 Tidsplan

Tidsplanen er blevet rykket hele tiden i samarbejdet med Danisco/Dupont i Frakrig og på grund af Malene Meyer Pedersens barselsorlov. Til sidst er projektet stoppet på grund af Malenes opsigelse og mangel på finansiering. Projektet skulle være afsluttet i 2012, men afsluttet først nu.

10. Planer for næste halvår



Projektet er nu afsluttet

11. Formidling og vidensdeling vedr. projektet

Resultater fra projektet har været præsenteret ved flere konferencer. Jeg har ikke rådighed over detaljerede oplysninger.

12. Nye kontakter

Samarbejde med Danisco/Dupont i Frankrig