

Roman Krzysztof Górecki<sup>1\*</sup>, Jacek Karol Bardowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

Wpłynęło w sierpniu 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mechanizmy oporności na wirusy bakteryjne. 2.1. Hamowanie adsorpcji faga. 2.2. Blokowanie iniekcji DNA fagowego. 2.3. Abortywna infekcja. 2.4. Restrykcja i modyfikacja (R-M). 2.5. System CRISPS/Cas. 3. Podsumowanie

#### Molecular mechanisms of bacteriophage resistance of lactic acid bacteria

**Abstract:** Lactic acid bacteria (LAB) constitute a heterogeneous group of bacteria, which are found in diverse environments, such as the human body or plants, and are traditionally used to produce fermented food. Food bio-transformation in industrial processes increases the economical importance of LAB. However, conditions that exist in industrial facilities do not seem to be an optimal environment for bacteria. During technological processes, which take place in enclosed space, the intensity of physical (temperature shift), chemical (acids) or biological (phages) stress factors raises dramatically. In the dairy industry, bacteriophage contamination is regarded as a serious problem due to the disturbance or arrest of the production processes, which results in significant economical losses. It is well documented that LAB evolved defense systems against bacteriophages, which allow them to survive in harsh conditions. Therefore, bacteria used in food industry are selected for high level of bacteriophage resistance. According to the mode of action, natural bacterial defense systems against their predators were divided into 5 categories: (i) inhibition of phage adsorption, (ii) blocking of phage DNA injection, (iii) phage abortive infection systems, (iv) restriction modification systems, (v) CRISPR/Cas systems. Remarkably, the majority of known bacteriophage resistance systems are plasmid-encoded. In this context, future studies on phage resistance mechanisms as well as plasmid sequencing may have an impact on solving the problem of phage infections in the dairy industry.

1. Introduction. 2. Bacteriophage resistance mechanisms. 2.1. Inhibition of phage adsorption. 2.2. Blocking of phage DNA injection. 2.3. Phage abortive infection (Abi). 2.4. Restriction-modification (R-M). 2.5. CRISPR/Cas systems. 3. Summary

**Key words:** bacteriophage resistance, bacteriophages, lactic acid bacteria (LAB).

**Słowa kluczowe:** bakterie kwasu mlekowego, bakteriofagi, oporność na bakteriofagi

## 1. Wprowadzenie

Grupa bakterii określanych jako bakterie kwasu mlekowego lub bakterie mlekowe, w skrócie LAB (Lactic Acid Bacteria), obejmuje bakterie spokrewnione funkcjonalnie, w związku z ich zdolnością do produkcji kwasu mlekowego podczas homo- lub heterofermentacji. Według obecnej taksonomii, do grupy LAB należą rodzaje drobnoustrojów jak: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* i stanowiące trzon tej grupy bakterii, rodzaje *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* oraz *Leuconostoc* [25]. Niektórzy badacze do grupy LAB zaliczają także *Bifidobacterium*. Bakterie fermentacji mlekowej charakteryzują się prostym metabolizmem i dlatego mają wysokie wymagania pokarmowe, w zakresie czynników wzrostowych w podłożu. Prosty metabolizm oraz niewielki rozmiar genomów LAB (od 1,8 Mbp w przypadku *Oenococcus oeni* do 3,3 Mbp dla *L. plantarum*) [25] spowodowały duże zainteresowanie tymi bakteriami, jako organizmami modelowymi w badaniach nad „minimalnymi wymogami życiowymi” bakterii Gram-dodatnich.

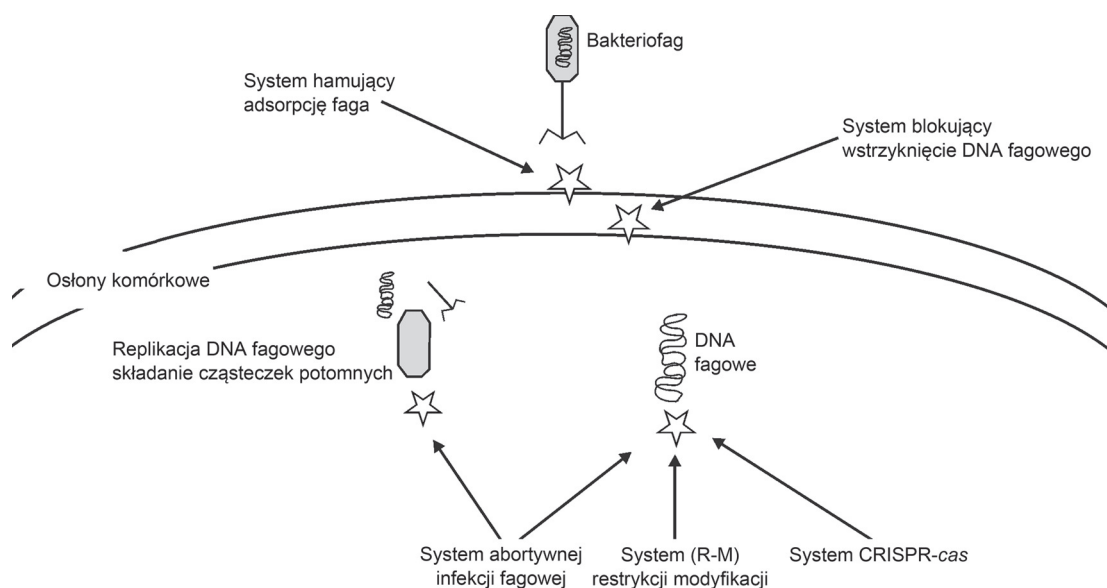
Zapotrzebowanie na substancje odżywcze ma wpływ na rozprzestrzenianie się bakterii mlekowych w przyro-

dzie. Bardzo rzadko występują one w glebie lub w wodzie, a ich naturalnymi siedliskami są: (i) mleko (*Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*), (ii) zdrowe i gnijące rośliny (*Lactobacillus plantarum*, *L. delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*), (iii) układ pokarmowy oraz błony śluzowe ludzi i zwierząt (*Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Streptococcus salivarius*).

Szczególnie zdolność LAB do zasiedlania i rozwoju w mleku została wykorzystana na skalę przemysłową do produkcji fermentowanych artykułów mlecznych. Ponadto bakterie kwasu mlekowego mogą rozwijać się w mięsie i winie, co zostało wykorzystane w produkcji fermentowanych wędlin (*Lactobacillus*, *Pediococcus*) oraz dla poprawy właściwości organoleptycznych wina (*O. oeni*) [25].

W procesach przemysłowych stresowe czynniki fizyczne, chemiczne oraz biologiczne występują w zwiększonym natężeniu [47]. Z tego powodu mikroorganizmy wykorzystywane w takich procesach selekcionowane są w kierunku zwiększonego poziomu oporności na pewne czynniki, jak: niskie pH związane z zakwaszeniem środowiska, wyższe od naturalnych stężenia metabolitów pierwotnych powstających podczas fermentacji

\* Autor korespondencyjny: Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa; tel. 22-592-12-13, e-mail: krzygor@ibb.waw.pl



Rys. 1. Podstawowe systemy oporności fagowej u LAB

oraz niskie temperatury stosowane podczas przechowywania artykułów spożywczych.

Poza czynnikami o charakterze fizycznym i chemicznym, hamującymi rozwój lub zmniejszającymi przeżywalność komórek bakteryjnych, wyróżniono również czynnik biologiczny – wirusy bakteryjne czyli bakteriofagi. Infekcje komórek bakteryjnych wywoływane są przez fagi występujące w stanie wolnym w środowisku lub przez fagi „uśpione” (fagi lizogenne, profagi) wintegrowane w chromosom bakteryjny, a indukowane w pewnych warunkach środowiskowych [42]. Wśród bakteriofagów atakujących jednego z najlepiej poznanych przedstawicieli LAB – *Lactococcus lactis* – wyróżniono 3 grupy genetyczne, c2, 936 i P335, różniące się morfologią, zakresem gospodarza oraz cyklem życiowym [44]. W obrębie grup c2 oraz 936 występują wyłącznie fagi lityczne, powodujące szybką lizę komórek gospodarza. Natomiast grupa P335 obejmuje zarówno fagi lityczne, jak i lizogenne [30]. Bakterie LAB posiadają naturalne systemy obrony przed fagami, które pod względem mechanizmu działania zostały podzielone na 5 kategorii (Rys. 1): (i) mechanizm hamujący adsorpcję, (ii) mechanizm blokujący wprowadzenie DNA do komórki, (iii) system abortywnej (przerwanej) infekcji fagowej (Abi), (iv) system restrykcji modyfikacji (R-M) oraz (v) system CRISPR/*cas*.

## 2. Mechanizmy oporności na wirusy bakteryjne

### 2.1. Hamowanie adsorpcji faga

Oddziaływanie cząstki fagowej z powierzchnią bakterii jest pierwszym etapem, niezbędnym do zainicjowania procesu infekcji wirusowej. W procesie adsorp-

cji faga do komórki bakteryjnej biorą udział dwa komponenty. Jednym z nich jest receptor, znajdujący się w błonie lub ścianie komórkowej, a drugim jest białko faga odpowiedzialne za rozpoznanie i związanie się z receptorem bakteryjnym tzw. białko wiążące receptor RBP (**r**eceptor-**b**inding **p**rotein) [42]. Proces adsorpcji najlepiej poznany jest u bakterii Gram-ujemnych, gdzie stwierdzono że większość interakcji fag – komórka bakteryjna zachodzi dwuetapowo. W przypadku układu bakteria *E. coli* oraz fag T5 zaobserwowano, że bakteriofag wiąże się początkowo w sposób odwracalny do lipopolisacharydów zawierających poli-mannozowy antygen O, a następnie w sposób nieodwracalny z transporterem ferrichromu, który jest rodzajem sideroforu [18].

Podobnie jest u bakterii Gram-dodatnich, gdzie fagi atakujące komórki *Lactococcus lactis*, wiążą się głównie ze specyficznymi receptorami cukrowymi, występującymi w ścianie komórkowej. Do związków najczęściej oddziałujących z fagami w pierwszym etapie przyłączania cząstki wirusowej należą cukry: ramnoza, glukoza, galaktoza, glukozo- oraz galaktozoamina [46]. W przypadku fagów grupy c2, w celu przeprowadzenia skutecznej infekcji, niezbędne jest oddziaływanie faga z bakteryjnym białkiem PIP (**p**hage **i**nfection **p**rotein) [2]. Z kolei fagi grup P335 oraz 936 wiążą się do różnych białek błonowych [11]. Podstawowe mechanizmy hamowania przyłączania się faga do komórki bakteryjnej związane są z fizycznym maskowaniem receptora bądź ze zmianami w jego budowie lub nawet z jego brakiem w osłonach komórkowych [8]. Brak funkcjonalnego receptora może być spowodowany spontanicznymi mutacjami w materiale genetycznym, które powodują powstanie całkowicie niewrażliwego mutantu BIM (**b**acteriophage **i**nsensitive **m**utant). Brak

receptora, np. polisacharydowego, związany jest z mutacją(ami) genów zaangażowanych w jego syntezę lub transport. Niestety zaburzenia w procesie syntezy składników ściany mogą skutkować słabszym wzrostem bakterii, uniemożliwiając wykorzystanie mutantów BIM w procesach przemysłowych [13]. Poza tym mutacje BIM często ulegają rewersji do fenotypu wrażliwego. Z kolei mechanizm polegający na fizycznym maskowaniu receptora związany jest z możliwością syntezy egzopolisacharydów, które tworzą dodatkową otoczkę, ograniczając możliwość oddziaływania fagów z komórkami bakteryjnymi [33].

## 2.2. Blokowanie iniekcji DNA fagowego

Po związaniu się z receptorem, bakteriofag wprowadza DNA do komórki bakteryjnej, gdzie występuje powielenie informacji genetycznej oraz wytworzenie potomnych cząstek wirusa. Systemy oporności fagowej, które polegają na zaburzaniu etapu wprowadzania DNA do komórki mimo związania się faga z receptorem, są najslabiej poznanymi systemami oporności, zarówno u LAB jak i innych mikroorganizmów [42]. Badania przeprowadzone przez W a t a n a b e i wsp. [48], dotyczące interakcji faga PL-1 z komórkami *L. casei* wykazały, że mimo adsorpcji fagów do powierzchni komórki nie obserwowano lizy bakteryjnej. Analiza tej interakcji przy użyciu mikroskopii elektronowej pokazała, że DNA fagowe pozostaje w kapsydie, w przeciwieństwie do infekcji szczepu wrażliwego, gdzie obserwowano znaczący wzrost liczby pustych kapsydów. Jednak czynnik odpowiedzialny za blokowanie iniekcji DNA fagowego nie został zidentyfikowany w tym przypadku. M c G r a t h w badaniach z 2002 roku [32] poświęconych wirusowi Tuc2009 infekującemu komórki szczepu *L. lactis*, zidentyfikował gen chromosomalny kodujący białko nazwane Sie<sub>2009</sub>, które blokuje wprowadzanie DNA fagowego do komórki bakteryjnej. Mechanizm blokowania nie został poznany, ale przypuszcza się, że białko Sie<sub>2009</sub> oddziałuje albo z białkami błonowymi komórki, które są niezbędne do procesu iniekcji DNA, albo z białkami fagowymi odpowiedzialnymi za inicjację procesu uwalniania DNA z kapsydu [32]. Efekt działania białka Sie<sub>2009</sub> może przypominać efekt obecności represora fagów lizogennych, polegający na zapobieganiu ponownej infekcji tym samym fagiem. W przeciwieństwie do tego procesu, gen *sie*<sub>2009</sub> warunkuje oporność na różne fagi i co więcej, również na fagi z innej grupy fagowej niż ta, do której należy Tuc2009. Znane są także przykłady systemu blokowania transferu DNA fagowego do komórki, kodowane na plazmidach występujących w komórkach LAB, jak np. na plazmidzie pNP40, który ponadto koduje dwa systemy abortywnej infekcji [15].

## 2.3. System abortywnej infekcji

Kiedy DNA fagowe „ominie” opisane powyżej wczesne systemy obrony i wniknie do komórki bakteryjnej, rozpoczyna się cykl zdarzeń prowadzący do powstania potomnych cząstek fagowych. Systemy infekcji abortywnej Abi (**ab**ortive **i**nfection system) są w stanie przerwać, na różnych etapach, cykl namnażania faga. Pod pojęciem infekcji abortywnej kryją się komórkowe mechanizmy obronne, które ingerują w procesy niezbędne do powstania potomnych bakteriofagów, takie jak: replikacja wprowadzonego DNA fagowego, transkrypcja, translacja, pakowanie DNA do kapsydu oraz składanie cząstki bakteriofaga [13]. Blokowanie namnażania faga w cytoplazmie z wykorzystaniem systemu Abi wiąże się z przedwczesną śmiercią komórki bakteryjnej. Fenotypowym objawem działania systemów Abi jest zmniejszenie wydajności powstawania łysek o typowych rozmiarach dla danego bakteriofaga, na rzecz nielicznych łysek o znacznie zmniejszonej średnicy [6, 13]. Śmierć pojedynczej zainfekowanej komórki ogranicza liczbę potomnych cząstek wirusa, zmniejszając tym samym rozmiar potencjalnej infekcji fagowej w populacji bakterii. Jak podają dane źródłowe, zidentyfikowano i scharakteryzowano 22 laktokokowe systemy infekcji abortywnej, oznaczane skrótem Abi oraz kolejną literą alfabetu [17]. Jeden system Abi może wpływać na cykl życiowy fagów należących do jednej, dwóch, a nawet trzech grup fagowych. Zazwyczaj mechanizm Abi kodowany jest przez pojedynczy gen zlokalizowany na plazmidzie. Zidentyfikowano i takie mechanizmy Abi, które kodowane są przez dwa geny (AbiE, AbiG, AbiL, AbiT) [6], a nawet jak w przypadku jednego z niedawno odkrytych systemów, systemu AbiR, przez 3 geny [50]. Większość genów kodujących systemy Abi charakteryzuje się nietypowo niską zawartością par GC (24–31%) w porównaniu do średniej zawartości 35% określonej dla genomów laktokokowych, sugerując ich horyzontalny transfer z innych mikroorganizmów [13]. Większość białek systemów Abi funkcjonuje w cytoplazmie, chociaż scharakteryzowano i takie, które wykazują lokalizację transbłonową. W zależności od hamowanego etapu rozwoju faga, systemy Abi podzielono na systemy wczesne, zaburzające replikację DNA fagowego i systemy późne, ingerujące w pozostałe etapy rozwoju bakteriofaga, zachodzące po etapie replikacji DNA fagowego [13]. Systemy, takie jak AbiA, AbiD1, AbiF, AbiK, AbiP i AbiT zaburzają replikację DNA fagowego, podczas gdy systemy AbiB, AbiG i AbiU zaburzają proces transkrypcji. System AbiC powoduje obniżenie wydajności produkcji głównego białka kapsydu, a systemy AbiE, AbiL, and AbiQ zaburzają pakowanie DNA do kapsydu [17]. W przeciwieństwie do wymienionych systemów, działających na procesy replikacji, translacji czy transkrypcji, zidentyfikowany w 2007 roku system AbiZ powoduje

Tabela I

Cechy systemów restrykcji i modyfikacji typów I, II, III, IV

	Budowa molekularna	Aktywność enzymatyczna	Miejsce cięcia
Typ I	strukturalnie niezależne białka: HsdR, HsdM, HsdS	aktywność modyfikująca – kompleks białek HsdS, HsdM aktywność restrykcyjna – kompleks białek HsdR, HsdM, HsdS	losowe miejsce w znacznej odległości od rozpoznawanej sekwencji
Typ II	strukturalnie niezależne białka R i M	aktywność modyfikująca – białko M aktywność restrykcyjna – białko R	miejsce w obrębie lub w najbliższym otoczeniu rozpoznawanej sekwencji
Typ III	strukturalnie niezależne białka Res i Mod	aktywność modyfikująca – białko Mod aktywność restrykcyjna – kompleks białek Mod i Res	w odległości 24–27 pz od strony 3' rozpoznawanej sekwencji
Typ IV	strukturalnie niezależne białka R i M	aktywność modyfikująca – białko M aktywność restrykcyjna – białko R białko R posiada również właściwości metylazy	w stałej odległości (14–16 pz) od strony 3' rozpoznawanej sekwencji

przedwczesną lizę komórki, uniemożliwiając składanie potomnych cząstek wirusa [12]. W wielu przypadkach mechanizmy działania poszczególnych systemów nie zostały szczegółowo wyjaśnione, a jedynie powiązane z zaburzonymi przez nie etapami rozwoju faga. I tak system AbiB powoduje degradację RNA prawdopodobnie przez indukowanie nowych lub stymulowanie aktywności już istniejących RNaz [38]. W przypadku systemu AbiD1, przedstawiciela systemów zaburzających replikację DNA, stwierdzono że system ten jest indukowany przez produkt białkowy wczesnego genu (*orf1*) faga bIL66. Powstałe w wyniku indukcji ekspresji genu *abiD1* białko wiąże się z fagową nukleazą, blokując jej aktywność, która polega na usuwaniu rozgałęzionych struktur w replikowanym DNA faga [6]. Inny system, AbiZ, powoduje przedwczesną lizę komórki w wyniku zaburzenia kontroli nad właściwym momentem uaktywnienia się holiny, poprzez oddziaływanie z jej inhibitorem lub bezpośrednio z samym białkiem [12]. O ile mechanizm śmierci komórki w wyniku aktywności systemu AbiZ nie wymaga wyjaśnień, to w przypadku aktywności innych systemów Abi, mechanizmy powodujące śmierć komórek nie są tak oczywiste. W związku z faktem stwierdzenia toksyczności nadprodukowanych białek systemów infekcji abortywnej wobec komórek bakteryjnych przypuszcza się, że oddziaływania białek Abi z nukleazami czy proteazami, za pośrednictwem których wpływają one na procesy fagowej replikacji, transkrypcji i translacji, nie ograniczają się wyłącznie do procesów fagowych, ale również ingerują w procesy bakteryjne, powodując śmierć komórki [6].

#### 2.4. Systemy restrykcji modyfikacji (R-M)

W odróżnieniu od systemów infekcji abortywnej, które ingerują we wczesne etapy rozwoju faga, jak proces replikacji DNA fagowego, głównym zadaniem systemów restrykcji modyfikacji (R-M) jest rozpoznanie i degradacja w procesie trawienia endonukleolitycznego obcego, w tym DNA fagowego [40]. Zatem systemy R-M ogra-

niczają zainicjowanie procesów cyklu fagowego na terenie cytoplazmy. W przeciwieństwie do systemów Abi, w wyniku aktywacji mechanizmu R-M nie obserwuje się śmierci komórki bakteryjnej, ponieważ DNA komórkowe jest chronione przed degradacją [39]. DNA chromosomalny komórek, posiadających system restrykcji modyfikacji, jest odpowiednio zmodyfikowany w specyficznych sekwencjach przez enzym o aktywności metylotransferazy. Chroni to DNA gospodarza przed aktywnością endonukleazy restrykcyjnej, rozpoznającej te specyficzne sekwencje i zdolnej do wprowadzania nacięć w DNA [41]. Inaczej sytuacja przedstawia się w przypadku pojawienia się obcego DNA. Wnikający DNA nie posiada wzoru metylacji, zgodnego z systemem R-M występującym już w komórce, co prowadzi do jego degradacji przez enzym restrykcyjny [41].

Systemy R-M podzielono na cztery grupy, uwzględniając właściwości związane z typem rozpoznawanej sekwencji, lokalizacją miejsca cięcia w stosunku do rozpoznawanej sekwencji oraz strukturą molekularną systemu (Tab. I).

U laktokoków zidentyfikowano przedstawicieli systemów R-M, należących do trzech z 4 głównych typów: typ I, typ II oraz najmniej poznany i rozpowszechniony typ III. Stwierdzono także powszechne występowanie genów związanych z systemami R-M na plazmidach laktokokowych [13].

Pierwszy opisany u bakterii Gram-dodatnich system R-M typu III został zidentyfikowany na laktokokowym plazmidzie pND801 [43]. Typ ten składa się z dwóch enzymów: metylotransferazy, kodowanej przez gen *mod* i endonukleazy restrykcyjnej, kodowanej przez gen *res*. Metylotransferaza Mod działa niezależnie od endonukleazy Res i katalizuje reakcję metylacji specyficznych sekwencji DNA. Ponadto, pojedyncza Mod jest odpowiedzialna za rozpoznanie dwóch, przeciwstawnie zorientowanych, asymetrycznych miejsc w sekwencji DNA [43]. Białko Res funkcjonuje w kompleksie z białkiem Mod, dzięki czemu reakcje modyfikacji i restrykcji endonukleolitycznej dotyczą tej samej, specyficznej sekwencji. Endonukleaza Res przecina dwuniciowy

DNA w odległości 24–27 nukleotydów poniżej niezmetylowanej specyficznej sekwencji [10].

Większość poznanych systemów R-M u bakterii *Lactococcus* należy do typu II [13]. Systemy te zazwyczaj wymagają prostych kofaktorów i charakteryzują się prostą organizacją genetyczną. Klasyczne systemy R-M typu II zawierają dwa geny, kodujące białka o niezależnych aktywnościach – endonukleazy i metylotransferazy. Endonukleaza rozpoznaje specyficzną, palindromową sekwencję DNA o długości od 4 do 8 nukleotydów i powoduje przecięcie obu nici DNA, a metylotransferaza rozpoznaje oraz metyluje tę samą sekwencję, co chroni DNA przed aktywnością endonukleazy [39]. Metylasy systemu R-M typu II wymagają kofaktora w postaci S-adenozylometioniny, z którego przenoszą grupę metylową na nukleotydy w rozpoznawanej sekwencji. Cechą charakterystyczną endonukleaz typu II jest fakt, że przecięcie nici DNA ma miejsce w obrębie lub w stałej odległości kilku nukleotydów, od miejsca rozpoznawanego przez system R-M oraz, że w odróżnieniu od endonukleaz typu I i III, endonukleazy typu II nie wymagają energii w postaci ATP do przeprowadzenia reakcji [39]. Endonukleazy tej grupy działają jako homodimery, które wymagają kofaktora w postaci jonów magnezu ( $Mg^{2+}$ ) [35]. Nie wszystkie endonukleazy typu II funkcjonują według przedstawionego schematu. W celu uwzględnienia ich zróżnicowania strukturalno-funkcjonalnego wyodrębniono następujące podtypy: IIB, IIE, IIF, IIG, IIM, IIS i IIT [39]. Endonukleazy podtypu IIS działają zazwyczaj jako monomery, rozpoznają asymetryczne sekwencje i przecinają DNA w określonej odległości od rozpoznawanego miejsca [45]. Odmienność endonukleaz podtypów IIG i IIB polega na tym, że obie aktywności enzymatyczne (metylasy i endonukleazy) znajdują się na jednym łańcuchu białkowym. Ponadto, do swojej aktywności enzymatycznej, wymagają dodatkowego kofaktora w postaci S-adenozylometioniny. Dodatkowo, endonukleazy podtypu IIB charakteryzują się tym, że przecinają każdą nić DNA po obu stronach rozpoznawanej sekwencji. Zatem endonukleazy podtypu IIB usuwają z nici DNA krótkie fragmenty, zawierające rozpoznawaną przez nie sekwencję [39]. Odrębność podtypu IIM sprowadza się do faktu, że trawienie DNA następuje po rozpoznaniu specyficznej sekwencji, która w przeciwieństwie do pozostałych systemów R-M jest zmetylowana [27].

Warto podkreślić, że istnieje hipoteza zakładająca, że poprzez fuzję genów podjednostek Mod i Res typu III rozpoczęła się ewolucja systemu R-M typu IV. Dodatkowo, uwzględniając właściwości enzymatyczne endonukleaz systemów Eco57I i BseMII typu IV wysunięto hipotezę, że są one formą pośrednią w toku ewolucji pomiędzy enzymami typu III i typu IIS [23]. Jak do tej pory, typ IV systemów R-M jest najslabiej poznany typem, głównie ze względu na małą liczebność przedstawicieli tej grupy.

Typ I restrykcji modyfikacji jest jednym z najbardziej złożonych systemów pod względem biochemicznym jak i genetycznym. Składa się z 3 białek, które warunkują restrykcję (HsdR lub R), modyfikację (HsdM lub M) i rozpoznawanie specyficznej sekwencji w DNA (HsdS lub S) [36]. Podobnie jak przedstawiciele innych typów, także systemy R-M typu I wymagają do prawidłowego działania kofaktorów w postaci jonów  $Mg^{2+}$  oraz donora grup metylowych – S-adenozylometioniny [36]. W odróżnieniu od endonukleaz typu II, endonukleazy typu I do przecięcia nici DNA potrzebują energii uzyskiwanej podczas hydrolizy ATP. W celu uzyskania funkcjonalnego kompleksu o aktywności endonukleolitycznej niezbędne jest oddziaływanie ze sobą wszystkich trzech podjednostek (R, M i S) w stosunku stechiometrycznym 2:2:1, podczas gdy dla aktywności metylotransferazy wystarczające są jedynie oddziaływania dwóch podjednostek M i jednej S [37]. Poza złożoną strukturą funkcjonalnych kompleksów enzymatycznych, innymi cechami wyróżniającymi typ I są: budowa rozpoznawanej sekwencji oraz miejsce cięcia DNA. Sekwencja nukleotydowa rozpoznawana przez enzymy typu I jest asymetryczna i złożona z dwóch komponentów, jednego o długości 3–4 pz i drugiego o długości 4–5 par zasad, przedzielonych niespecyficzną sekwencją 6–8 pz [36]. Kompleks białek  $R_2M_2S_1$ , o specyficzności endonukleazy, tnie DNA w przypadkowym miejscu, w odległości dochodzącej nawet do kilku tysięcy par zasad od rozpoznawanej sekwencji. Oddziaływanie kompleksów enzymatycznych typu I z DNA jest ściśle uwarunkowane budową białka HsdS. Podjednostka S zawiera tak zwane regiony konserwowane, na końcach białka i w centralnej części, odpowiedzialne za interakcje z podjednostkami M [26] oraz dwie domeny zmienne, oddziałujące z DNA i rozpoznające specyficzne sekwencje nukleotydowe. System R-M typu I, występujący u *Enterobacteriaceae* został podzielony na 4 podtypy (IA, IB, IC, i ID) na podstawie testu krzyżowej hybrydyzacji pomiędzy genami i krzyżowej reakcji kodowanych przez nie białek, z wykorzystaniem przeciwciał. Testy komplementacji wykazały, że w obrębie podtypów może dochodzić do wymiany podjednostek systemu R-M, ale już pomiędzy podjednostkami różnych podtypów wymiany takie nie zachodzą [14].

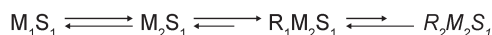
Spośród czterech typów systemów R-M, typ I, a przede wszystkim podtyp IC, wydaje się być najbardziej rozpowszechniony wśród bakterii LAB. W chromosomach szczepów *L. lactis* IL1403 oraz *L. cremoris* MG1363 zidentyfikowano cały operon *hsdRMS* tego typu, a dodatkowe podjednostki S, rozpoznające nową sekwencję, kodowane są przez geny zlokalizowane na plazmidach [4, 5, 16, 49].

Nowy system R-M wnikając do komórki determinuje nowy wzór metylacji, którego komórka jeszcze nie posiada. Zatem DNA chromosomalny może być nara-

żony na działanie endonukleaz tego systemu. Zakłada się, że DNA komórkowy mógłby być chroniony przed endonukleazą nowego systemu w wystarczającym stopniu, poprzez rozdzielenie w czasie aktywności metylazy i endonukleazy lub poprzez wyraźne osłabienie aktywności endonukleolitycznej [36]. W takiej sytuacji istotną rolę odgrywają mechanizmy kontroli ekspresji genów, kodujących metylotransferazy i endonukleazy.

W gronie systemów R-M typu II, kodującego dwa oddzielne enzymy odpowiedzialne za modyfikację i degradację DNA, wyróżniono kilka mechanizmów regulacji ekspresji poszczególnych genów systemu. Metylazy systemów MspI oraz LlaDII są nadprodukowane w początkowej fazie po wnikięciu do komórki, podczas gdy endonukleazy są produkowane konstytutywnie na niskim poziomie. Metylazy tych systemów wiążąc się do sekwencji własnego promotora, dzięki obecności motywu HTH umożliwiającego interakcje z DNA, powodują wyciszenie ekspresji własnych genów [7]. Początkowe zwiększenie ilości metylazy w komórce umożliwia kompletną modyfikację DNA chromosomalnego, chroniąc go przed aktywnością syntetyzowanych endonukleaz. Nie wszystkie systemy typu II posiadają działający w ten sposób mechanizm regulacji. Niektóre systemy, jak np. system Kpn2I z *Klebsiella*, koduje dodatkowe białko regulacyjne, białko C. W tym systemie, podobnie jak w systemie MspI, endonukleaza jest produkowana konstytutywnie na niskim poziomie, podczas gdy poziom biosyntezy białka metylotransferazy oraz białka regulatorowego C jest wysoki. Wraz ze wzrostem stężenia białka C następuje wyciszenie transkrypcji genów kodujących zarówno białko C, jak i białko metylotransferazy [29].

W przypadku systemów typu I nie stwierdzono regulacji ekspresji genów podjednostek związanych z restrykcją i modyfikacją DNA. Zaobserwowano natomiast zależność efektywności nabycia nowego systemu od funkcji kodowanych przez komórkę biorcy [36]. I tak, stwierdzono zaangażowanie ATP-zależnej proteazy jak ClpXP w proces nabycia nowego systemu R-M. Proteaza ClpXP jest odpowiedzialna za okresową utratę restrykcji (w skrócie RA restriction alleviation) poprzez degradację proteolityczną nukleaz systemów R-M typu I. Ekspresja genów tych proteaz jest indukowana przez obecność fragmentów DNA w komórce. Degradacja podjednostki R odbywa się wyłącznie, gdy tworzy ona kompletny holoenzym i to w dodatku związany z niemetylowanym DNA. Przypuszcza się, że również w przypadku podtypów IC i ID mechanizm RA odgrywa pewną rolę w zainstalowaniu się systemu R-M w komórce. Nabycie nowego systemu podtypu IC bardzo często ogranicza się do uzyskania – w procesie koniugacji – plazmidu zawierającego gen (*hdsS*) nowej podjednostki S, warunkującej specyficzność systemu. Opóźnienie wystąpienia aktywności endonukleolitycz-



Rys. 2. Schemat interakcji podjednostek typu IC systemów R-M. Czcionką pogrubioną oznaczono kompleksy enzymatyczne o aktywności metylotransferazy, kursywą o aktywności endonukleolitycznej. Długość strzałek wskazuje kierunek przesunięcia szybkości reakcji.

nej uważa się za najważniejszy mechanizm, umożliwiając zainstalowanie się nowego systemu w komórce. U podstaw tego mechanizmu leżą interakcje pomiędzy podjednostkami systemu R-M podtypu IC oraz ich stężenie w komórce [36] (Rys. 2). I tak, funkcjonalny kompleks  $M_2S_1$ , o aktywności metylotransferazy, ulega łatwej dysocjacji do niefunkcjonalnego, ale bardzo stabilnego kompleksu  $M_1S_1$ . Zatem, wzrost stężenia podjednostki M jest konieczny w celu odtwarzania funkcjonalnego kompleksu metylazy. Należy zwrócić uwagę, że do funkcjonalnego kompleksu metylazy bardzo trwale przyłącza się podjednostka R. Postuluje się, że kompleks o składzie stechiometrycznym  $R_1M_2S_1$  jest nadal aktywną metylotransferazą [22]. Natomiast, aby otrzymać funkcjonalny holoenzym ( $R_2M_2S_1$ ) o aktywności endonukleolitycznej, niezbędne jest przyłączenie drugiej podjednostki R. Proces ten powoduje jednak zmniejszenie stabilności całego układu białek, skutkującej łatwym oddysocjowaniem podjednostki R. W związku z tym, w celu przesunięcia reakcji w kierunku powstawania funkcjonalnego holoenzymu nukleazy niezbędna jest akumulacja podjednostki R w cytoplazmie. W ten sposób następuje opóźnienie w powstaniu funkcjonalnego kompleksu o aktywności endonukleolitycznej, co daje czas na modyfikację DNA chromosomalnego i zapobiega jego degradacji [22].

## 2.5. System CRISPR/Cas

Spśród opisanych powyżej systemów ochrony komórki bakteryjnej przed bakteriofagami jedynie system R-M jest bezpośrednio skierowany przeciwko wnika-jącym elementom genetycznym. Niedawno zidentyfikowano jednak kolejny system (system CRISPR/Cas), który został określony mianem „systemu immunologicznego” *Bacteria* i *Archaea*, wymierzony przeciwko DNA fagowemu lub plazmidowemu [20].

Pierwsze zmianki o ciągu zgrupowanych, regularnie rozmieszczonych, krótkich sekwencji palindromicznych CRISPR (clustered, regularly interspaced short palindromie repeats) odnotowano już w latach 80 ubiegłego stulecia, kiedy to I s h i n o i wsp. [21] zidentyfikowali krótkie powtórzenia w genomie *E. coli*. Natomiast na początku XXI wieku scharakteryzowano, często zlokalizowane w otoczeniu kaset CRISPR, geny *cas* (CRISPR-associated genes) [24]. Trakty CRISPR (Rys. 3) składają się z dwóch typów elementów: z powtórzeń sekwencji (direct repeats) i rozdzielających je, unikatowych sekwencji łącznikowych zwanych również sekwencjami



Rys. 3. Schematyczny obraz regionu CRISPR/*cas*

Szarymi kołkami zaznaczono sekwencje powtórzone, a białymi prostokątami – sekwencje rozdzielające. Zbieżne strzałki symbolizują sekwencje palindromiczne w obrębie sekwencji powtórzonej.

rozdzielającymi (spacers). Wielkość powtórzeń CRISPR waha się w przedziale 23–47 pz, podczas gdy wielkość elementów rozdzielających zawiera się w przedziale 21–72 pz [20]. Poddając analizie genomy bakterii kwasu mlekowego udokumentowano, że jeden ciąg CRISPR zbudowany jest średnio z 50 jednostek, powtórzenie-sekwencja rozdzielająca [19]. Na uwagę zasługuje fakt, że powtórzenia znajdujące się w jednym locus są ściśle konserwowane [20]. Sytuacja przedstawia się odmiennie w przypadku elementów rozdzielających sekwencje powtórzeń. Otóż sekwencje rozdzielające w obrębie jednego regionu CRISPR są bardzo różne, a ponadto wysoce zmienne.

W 2005 roku, w badaniach *in silico*, wykazano homologie pomiędzy sekwencjami rozdzielającymi kaset CRISPR, a sekwencjami plazmidów lub wirusów bakteryjnych [34]. Dodatkowo zaobserwowano, że bakteriofagi, których krótkie sekwencje genomowe odnajdywano w kasetach CRISPR w postaci sekwencji rozdzielających, nie były zdolne do zainfekowania komórek bakteryjnych posiadających te kasety. Te obserwacje pozwoliły postawić hipotezę, że regiony CRISPR mogą stanowić adaptacyjny system immunologiczny przeciwko obcym elementom genetycznym, w którym sekwencje rozdzielające odpowiedzialne są za specyficzność systemu [24].

Barrangou i wsp. zaobserwowali, że wrażliwy na fagi mutant BIM (**b**acteriophage **i**nsensitive **m**utant) *Streptococcus thermophilus* nabył od 1 do 4 typów jednostek rozdzielających o sekwencji identycznej z DNA zastosowanych fagów [3]. Ponadto wykazano, że poziom oporności był skorelowany nie tylko z nabyciem nowych elementów rozdzielających, ale również z ich liczbą. Badania te dowiodły również, że w nabyciu sekwencji rozdzielającej uczestniczą białka kodowane przez geny *cas*. Zaobserwowano, że powtarzające się infekcje fagowe sprzyjały wprowadzaniu sekwencji rozdzielających do odpowiednich regionów CRISPR, w ocalałych komórkach [9]. Ponadto badania ekspresji genów u *Thermus thermophilus* podczas infekcji fagowej wykazały nadekspresję regionu CRISPR, genów *cas* i genu receptora cAMP, wskazując na istnienie mechanizmu wykrywania infekcji [1]. Geny *cas* kodują różnorodną grupę białek, które zawierają funkcjonalne domeny typowe dla nukleaz, helikaz, polimeraz i białek wiążących kwasy nukleinowe [20]. Większość znanych białek Cas oddziałuje z DNA, ale znane są także takie, które wchodzi w interakcje z RNA. Wydaje się, że podczas infekcji fagowej maszynaria enzymatyczna CRISPR/Cas

wybiera sekwencje z genomu faga i wprowadza je, jako nowe elementy rozdzielające. Chociaż dokładny mechanizm decydujący o tym, które fragmenty DNA fagowego lub plazmidowego zostaną włączone do regionów CRISPR nie jest znany, to selekcja fragmentów obcego DNA nie jest przypadkowa. Na modelu badawczym *S. thermophilus* pokazano, że integrowane z chromosomem bakteryjnym w regionach CRISPR fragmenty DNA fagowego zawierają krótkie motywy sekwencji nukleotydowej (NNAGAAW) [9].

Ciągi CRISPR charakteryzują się dużą zmiennością w obrębie gatunku i wydają się być szczepowo specyficzne z uwagi na możliwość wbudowywania nowych elementów rozdzielających sekwencje powtórzone. Ta prawidłowość stanowi kolejny marker wykorzystywany dla ustalenia pokrewieństwa filogenetycznego wśród bakterii [20].

Nie tylko mechanizm nabycia oporności warunkowanej systemem CRISPR wobec obcych elementów genetycznych (genom fagowy lub plazmid) nie został w pełni wyjaśniony. Również mechanizm oporności wobec fagów warunkowany przez elementy kaset CRISPR wymaga wielu badań. Jak dotąd, ponad wszelką wątpliwość stwierdzono, że w ochronie komórki bakteryjnej przed infekcją fagową biorą udział białka kodowane przez geny *cas* oraz sekwencje rozdzielające, znajdujące się w kasetach CRISPR [3]. Wykazano, że to właśnie te elementy składowe kaset CRISPR są zaangażowane w specyficzność odpowiedzi obronnej. Mimo, że do zainicjowania oporności niezbędne są wyłącznie elementy rozdzielające, to transkrypcji ulega cała kaset CRISPR. Sekwencja liderowa CRISPR (Rys. 3), o wielkości dochodzącej do 500 nukleotydów, jest bogata w pary A/T i kończy się wraz z pojawieniem się pierwszej sekwencji powtórzonej. Sugeruje się, że działa ona jako promotor dla regionu CRISPR [28]. W procesie transkrypcji powstaje jeden długi transkrypt (pre-crRNA lub pre-CRISPR RNA) obejmujący sekwencje liderową oraz wszystkie jednostki składające się z sekwencji powtórzonej i sekwencji rozdzielających. Większość sekwencji powtórzonych zawiera regiony palindromiczne. Te krótkie sekwencje umożliwiają powstanie stabilnych, konserwowanych struktur drugorzędowych w jednocieniowym RNA, powstającym w procesie transkrypcji regionu CRISPR. Transkrypt pre-crRNA jest następnie procesowany przez trawienia endonukleolityczne na fragmenty, tworząc drabinkę produktów pośrednich, w tym produktów dojrzałych. Miejsce cięcia następuje poniżej ostatniego nukleotydu tworzącego strukturę szpilki do włosów. Akumulacja produktów procesowania pre-crRNA może wskazywać na rolę dojrzałych fragmentów crRNA dla oporności, na etapie specyficznego rozpoznawania wnikających, obcych elementów genetycznych. Model mechanizmu oporności typu CRISPR/Cas zaproponowany dla *E. coli* zakłada, że crRNA

oddziałuje z białkami Cas, w tym białkiem Cas3, które zawiera domeny charakterystyczne dla nukleaz i helikaz DNA. Prawdopodobnie crRNA rozpoznaje odpowiednie sekwencje w genomie faga, dając tym samym sygnał do zapoczątkowania degradacji DNA, przez zasocjowany z DNA kompleks białek Cas [31].

Zaangażowanie krótkich fragmentów RNA, w proces oporności fagowej związanej z systemem CRISPR, może wskazywać na pewne analogie z eukariotycznym mechanizmem działania RNA interferencyjnego (RNAi). Jednak podstawowa, różnica pomiędzy działaniem RNAi, a kompleksem crRNA/Cas, dotyczy maszyneryi enzymatycznej. Ponadto wprowadzenie powtórzeń do genomu bakteryjnego działa jak pamięć genetyczna, zabezpieczająca komórkę bakteryjną przed ponowną infekcją. Zatem powyższe fakty wskazują, że adaptacyjny system CRISPR/Cas imituje w większym stopniu działanie systemu immunologicznego kręgowców, niż model działania RNAi [20].

Systemy oporności na bakteriofagi typu CRISPR/Cas są rozpowszechnione w świecie mikroorganizmów. Znalezione je prawie u wszystkich znanych przedstawicieli *Archaea* i w około 40% zsekwencjonowanych genomach bakteryjnych, w tym również genomach bakterii fermentacji mlekowej [19]. Spośród 102 kompletnych chromosomalnych lub plazmidowych sekwencji nukleotydowych, pochodzących od bakterii LAB, sekwencje CRISPR znaleziono w 47 genomach i jednym plazmidzie [19]. Dalsze badania pozwoliły zidentyfikować powtórzenia CRISPR u przedstawicieli rodzajów: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium* i *Bifidobacterium*. Zaskoczeniem okazał się brak powtórzeń CRISPR u przedstawicieli jednego z najlepiej scharakteryzowanych rodzajów bakterii mlekowych – rodzaju *Lactococcus*. Co ciekawe, także w genomach dwóch innych przedstawicieli LAB z rodzajów *Leuconostoc* i *Oenococcus* również nie zidentyfikowano elementów CRISPR [19].

### 3. Podsumowanie

W procesach biotechnologicznych bakterie LAB tworzą ogromne populacje skoncentrowane w ograniczonej przestrzeni. Stąd też pojawienie się czynnika szkodliwego, jakim są bakteriofagi, może spowodować lub całkowicie przerwać proces technologiczny, powodując poważne straty ekonomiczne [42].

Z tego względu w procesach przemysłowych, np. do produkcji jogurtów, serów oraz deserów mlecznych, wykorzystywane są bakterie LAB, które posiadają szczególnie wydajne mechanizmy ochrony przed bakteriofagami.

Warto nadmienić, że większość mechanizmów oporności fagowej kodowana jest plazmidowo [13]. Zatem

badania mechanizmów oporności, jak również biologii plazmidów bakterii LAB mogą przyczynić się w przyszłości do rozwiązania problemów napotykanych w czasie prowadzenia procesów przemysłowych.

### Piśmiennictwo

1. Agari Y., Sakamoto K., Tamakoshi M., Oshima T., Kuramitsu S., Shinkai A.: Transcription profile of *Thermus thermophilus* CRISPR systems after phage infection. *J. Mol. Biol.* **395**, 270–281 (2009)
2. Babu K.S., Spence W.S., Monteville M.R., Geller B.L.: Characterization of a cloned gene (*pip*) from *Lactococcus lactis* required for phage infection. *Dev. Biol. Stand.* **85**, 569–575 (1995)
3. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P.: CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**, 1709–1712 (2007)
4. Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich S.D., Sorokin A.: The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**, 731–753 (2001)
5. Boucher I., Emond E., Parrot M., Moineau S.: DNA sequence analysis of three *Lactococcus lactis* plasmids encoding phage resistance mechanisms. *J. Dairy Sci.* **84**, 1610–1620 (2001)
6. Chopin M.C., Chopin A., Bidnenko E.: Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 473–479 (2005)
7. Christensen L.L., Josephsen J.: The methyltransferase from the LlaDII restriction-modification system influences the level of expression of its own gene. *J. Bacteriol.* **186**, 287–295 (2004)
8. Coffey A., Ross R.P.: Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82**, 303–321 (2002)
9. Deveau H., Barrangou R., Garneau J.E., Labonté J., Fremaux C., Boyaval P., Romero D.A., Horvath P., Moineau S.: Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **190**, 1390–1400 (2008)
10. Dryden D.T., Murray N.E., Rao D.N.: Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3728–3741 (2001)
11. Dupont K., Janzen T., Vogensen F.K., Josephsen J., Stuer-Lauridsen B.: Identification of *Lactococcus lactis* genes required for bacteriophage adsorption. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5825–5832 (2004)
12. Durmaz E., Klaenhammer T.R.: Abortive phage resistance mechanism *AbiZ* speeds the lysis clock to cause premature lysis of phage-infected *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **189**, 1417–1425 (2007)
13. Forde A., Fitzgerald G.F.: Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76**, 89–113 (1999)
14. Fuller-Pace F.V., Cowan G.M., Murray N.E.: *EcoA* and *EcoE*: alternatives to the *EcoK* family of type I restriction and modification systems of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **186**, 65–75 (1985)
15. Garvey P., Hill C., Fitzgerald G.F.: The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 676–679 (1996)
16. Górecki R.K., Koryszewska-Bagińska A., Gołębiowski M., Żylinska J., Grynberg M., Bardowski J.: Adaptive potential of the *Lactococcus lactis* IL594 strain encoded in its 7 plasmids. *PLoS ONE*, 6(7): e22238 (2011)



17. Haaber J., Moineau S., Fortier L.C., Hammer K.: AbiV, a novel antiphage abortive infection mechanism on the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6528–6537 (2008)
18. Heller K., Braun V.: Polymannose O-antigens of *Escherichia coli*, the binding sites for the reversible adsorption of bacteriophage T5+ via the L-shaped tail fibers. *J. Virol.* **41**, 222–227 (1982)
19. Horvath P., Coûté-Monvoisin A.C., Romero D.A., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R.: Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int. J. Food Microbiol.* **131**, 62–70 (2009)
20. Horvath P., Barrangou R.: CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, **327**, 167–170 (2010)
21. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A.: Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429–5433 (1987)
22. Janscak P., Dryden D.T., Firman K.: Analysis of the subunit assembly of the type IC restriction-modification enzyme EcoR124I. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4439–4445 (1998)
23. Jurenaite-Urbanaviciene S., Kazlauskienė R., Urbelyte V., Maneliene Z., Petrusyte M., Lubys A., Janulaitis A.: Characterization of BseMII, a new type IV restriction-modification system, which recognizes the pentanucleotide sequence 5'-CTCAG(N)(10/8). *Nucleic Acids Res.* **29**, 895–903 (2001)
24. Karginov F.V., Hannon G.J.: The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol. Cell.* **37**, 7–19 (2010)
25. Klaenhammer T., R. Siezen i wsp.: Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82**, 29–58 (2002) (praca jest dziełem 36 autorów)
26. Kneale G.G.: A symmetrical model for the domain structure of type I DNA methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **243**, 1–5 (1994)
27. Lacks S., Greenberg B.: A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA. *J. Biol. Chem.* **250**, 4060–4066 (1975)
28. Lillestøl R.K., Shah S.A., Brügger K., Redder P., Phan H., Christiansen J., Garrett R.A.: CRISPR families of the crenarchaeal genus *Sulfolobus*: bidirectional transcription and dynamic properties. *Mol. Microbiol.* **72**, 259–272 (2009)
29. Lubys A., Jurenaite S., Janulaitis A.: Structural organization and regulation of the plasmid-borne type II restriction-modification system Kpn2I from *Klebsiella pneumoniae* RFL2. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4228–4234 (1999)
30. Madera C., Monjardín C., Suárez J.E.: Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7365–7371 (2004)
31. Makarova K.S., Aravind L., Grishin N.V., Rogozin I.B., Koonin E.V.: A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res.* **30**, 482–496 (2002)
32. McGrath S., Fitzgerald G.F., van Sinderen D.: Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Mol. Microbiol.* **43**, 509–520 (2002)
33. Mills S., McAuliffe O.E., Coffey A., Fitzgerald G.F., Ross R.P.: Plasmids of lactococci – genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 243–273 (2006)
34. Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E.: Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174–182 (2005)
35. Mruk I., Cichowicz M., Kaczorowski T.: Characterization of the LlaCI methyltransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W15 provides new insights into the biology of type II restriction-modification systems. *Microbiology*, **149**, 3331–3341 (2003)
36. Murray N.E.: Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 412–434 (2000)
37. O'Sullivan D., Twomey D.P., Coffey A., Hill C., Fitzgerald G.F., Ross R.P.: Novel type I restriction specificities through domain shuffling of HsdS subunits in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **36**, 866–875 (2000)
38. Parreira R., Ehrlich S.D., Chopin M.C.: Dramatic decay of phage transcripts in lactococcal cells carrying the abortive infection determinant AbiB. *Mol. Microbiol.* **19**, 221–230 (1996)
39. Pingoud A., Jeltsch A.: Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3705–3727 (2001)
40. Seegers J.F., van Sinderen D., Fitzgerald G.F.: Molecular characterization of the lactococcal plasmid pCIS3: natural stacking of specificity subunits of a type I restriction/modification system in a single lactococcal strain. *Microbiology*, **146**, 435–443 (2000)
41. Smith M.A., Read C.M., Kneale G.G.: Domain structure and subunit interactions in the type I DNA methyltransferase M.EcoR124I. *J. Mol. Biol.* **314**, 41–50 (2001)
42. Sturino J.M., Klaenhammer T.R.: Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **56**, 331–378 (2004)
43. Su P., Im H., Hsieh H., Kang A.S., Dunn N.W.: LlaFI, a type III restriction and modification system in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 686–693 (1999)
44. Szczepańska A.K., Hejnowicz M.S., Kołakowski P., Bardowski J.: Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment. *Acta. Biochim. Pol.* **54**, 151–158 (2007)
45. Szybalski W., Kim S.C., Hasan N., Podhajski A.J.: Class-IIS restriction enzymes – a review. *Gene*, **100**, 13–26 (1991)
46. Valyasevi R., Sandine W.E., Geller B.L.: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 bacteriophage sk1 receptor involving rhamnose and glucose moieties in the cell wall. *J. Dairy Sci.* **77**, 1–6 (1994)
47. van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S.D., Maguin E.: Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82**, 187–216 (2002)
48. Watanabe K., Ishibashi K., Nakashima Y., Sakurai T.: A phage-resistant mutant of *Lactobacillus casei* which permits phage adsorption but not genome injection. *J. Gen. Virol.* **65**, 981–986 (1984)
49. Wegmann U., J. Kok i wsp.: Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* **189**, 3256–3270 (2007) (praca jest dziełem 12 autorów)
50. Yang J.M., Deurraza P.J., Matvienko N., O'Sullivan D.J.: Involvement of the LlaKR2I methylase in expression of the AbiR bacteriophage defense system in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis KR2. *J. Bacteriol.* **188**, 1920–1928 (2006)