

LAKTOKOK FAJLARININ MOLEKÜLER GENETİK DOĞASI

MOLECULAR GENETIC NATURE OF LACTOCOCCAL PHAGES

Çağla TÜKEL, Yasin TUNCER, Mustafa AKÇELİK

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Dışkapı 06110 Ankara

ÖZET: *Lactococcus* cinsine ait bakteriler, üründe tipik fiziksel özelliklerin gelişimi, aroma ve tat bileşiklerinin oluşturulması ve koruyucu ajanların üretimi gibi katkılarından dolayı, endüstriyel süt fermentasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Süt fermentasyon süreçlerindeki kesintilerin ana nedeni faj enfeksiyonu ile starter bakterilerin parçalanması ve bunun sonucunda laktik asit üretiminin azalmasıdır. Laktokok fajları ile yürütülen çalışmalarda genetik ve moleküler teknolojilerin kullanılması; fajların, fiziksel ve genetik organizasyonuna yönelik doğalarının anlaşılmasında önemli ölçüde kolaylık sağlamaktadır.

ABSTRACT: Bacteria belonging genus *Lactococcus* are widely used in industrial dairy fermentations; contributing to the flavor, texture and preservation of fermented products. The most common cause of failure of dairy fermentation process is phage infection, which causes lysis of the starter bacteria and consequent reduction of lactic acid production. The application of genetic and molecular technologies to the study of lactococcal phages has proven to be very rewarding in terms of understanding the nature of phages with respect to their physical and genetic organisation.

GİRİŞ

Bakteriyofajların, endüstriyel süt fermentasyonlarında laktokokların gelişimini inhibe ettiğinin saptanmasından bu yana (WHITEHEAD ve COX, 1935) laktokok fajları ve bu fajların konakçı suşları ile verdiği interaksiyonlar, yoğun araştırmaların odağı olmuştur. Fajların; peynir, laktik tereyağı ve laktokokların starter kültür olarak kullanıldığı diğer süt fermentasyonlarında önemli ekonomik kayıplara neden olması, söz konusu çalışmaları sürekli teşvik eden ve gündemde tutan ana unsurdur. 1980' li yıllarda laktokoklara moleküler tekniklerin uygulanmasını olanaklı hale getiren buluşlar sayesinde, bu çalışmalar moleküler düzeyde yürütülmeye başlanmıştır.

Moleküler genetik analizler, hücreyi enfekte eden fajlara karşı laktokok konakçılarının verdiği yanıtın, büyük ölçüde plazmidler tarafından determine edildiğini göstermiştir. Laktokoklarda, genellikle plazmidler tarafından kodlanan, ancak bazı suşlarda kromozomal DNA kökenli de olabilen, başlıca dört tip doğal faj dirençlilik sistemi tanımlanmıştır. Bunlar; faj adsorbsiyonunun engellenmesi, faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi, restriksiyon/modifikasyon ve abortif enfeksiyon sistemleridir. Endüstriyel önemi gereği bu sistemlerin genetik ve biyokimyasal doğasına yönelik çalışmalar halen yoğun bir şekilde devam etmektedir. Diğer yandan laktokok fajlarının genetik düzeyde tanımlanması; söz konusu sistemlerin ve diğer faj-konakçı interaksiyonlarının detaylarına dair önemli ipuçları sunmaktadır. Son on yıl içerisinde gerek temperent ve gerekse litik özellikte, farklı laktokok fajlarının DNA dizi analizleri tanımlanmıştır. Genetik analiz çalışmalarından sağlanan veriler; laktokok fajlarının, konakçı popülasyonundaki yeni bir faj dirençlilik sistemine karşı oldukça hızlı bir şekilde korunma mekanizması geliştirebildiğini göstermiştir. Bu genetik esneklik laktokok fajlarını moleküler biyologlar için çok ilginç kılmaktadır. Buna ilave olarak, bazı faj genomlarının yüksek düzeyde rekombinasyon geçirdiğinin belirlenmesi, fajların endüstriyel starter kültürlerin faj dirençlilik sistemlerinden nasıl korunduğuna ışık tutan bir başka önemli bulgudur. Diğer yandan genom analizlerinden elde olunan veriler; faj enfeksiyonlarına karşı stabil dirençlilik içeren starter kültürlerin geliştirilebilmesi için gerekli stratejileri sunmakta ve laktokoklarda gıda üretimi için önem taşıyan genlerin analizi ve manipülasyonunu olanaklı hale getirmektedir.

Laktokok Fajlarının Sınıflandırılması

Laktokok fajlarının sınıflandırılmasında; morfoloji, konakçı özgüllüğü, seroloji, DNA homolojisi ve faj genom karakteristikleri esas alınmaktadır. Bu sınıflandırma kriterleri doğrultusunda ana faj tiplerinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir (GARVEY ve ark. 1995). Taksonomik çalışmalar, fajların filogenetik ilişkileri ve fermentasyon süreçlerinde sorun yaratan dominant faj tiplerinin belirlenmesinde ana referans noktasını teşkil etmektedir. Bu çalışmalar doğrultusunda endüstriyel fermentasyonların faj kontaminasyonlarından etkilenme düzeylerinin minimizasyonu için kalıcı stratejilerin geliştirilmesi mümkün olmaktadır. Günümüzde faj dirençli endüstriyel starter suş geliştirme çalışmalarında ana strateji; çok sayıda faj dirençlilik geni aktarılmış bakterilerin oluşturulması esasına dayandırılmıştır. Ancak bugüne kadar yürütülen faj sınıflandırılması çalışmalarının büyük bir kısmının, faj morfolojileri ve faj DNA homolojilerinin karşılaştırılmasını temel alması, bu çalışmaların güvenilirliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Zira laktokok fajlarının farklı biyolojik kaynaklardan genetik bilgi sağlama yeteneği (rekombinasyon yeteneği) ve buna bağlı olarak morfolojilerini değiştirebilmeleri (HILL ve ark. 1991; MOINEAU ve ark. 1994; MAHANİNVONG ve ark. 2001) ile faj direnç sistemlerine verdikleri ortak yanıtlar gibi benzerlikleri, filogenetik ilişkileri (dikey evrim) yerine, tür farklılıklarını doğuran genetik adaptasyonlarının (yatay evrim) araştırılmasının daha önemli olduğuna işaret etmektedir. Bu anlamda, laktokok fajlarının genomik DNA dizi analizleri; aynı ya da farklı suşlara spesifik fajların gerçek evriminin anlaşılmasında büyük ölçüde kaynak teşkil etmektedir.

Litik Yaşam Döngüsü

Laktokok fajları, enfeksiyonun ilk aşamasında; konakçı hücre yüzeyinde bulunan ve nadiren farklı bölgelerde lokalize olan faj almaç bölgelere tutunmaktadır (adsorbsiyon). Laktokok suşlarında hücre duvarında yer alan faj almaç bölgelerin genellikle ramnoz ya da galaktoz içerdiği bazı suşlarda ise kompleks polisakaritlerden oluştuğu saptanmıştır (GARVEY ve ark. 1995; DALY ve ark. 1996; TUNÇER ve AKÇELİK, 2002). Faj adsorbsiyonu üzerinde yürütülen detaylı araştırmalarda (VALYASEVI ve ark. 1991; GELLER, 1993; MONTEVILLE ve ark. 1994) bazı fajların hücre yüzeyinde bulunan karbonhidrat yapıdaki almaç bölgeye geri dönüşebilir bir şekilde tutunduğunu, ikinci aşamada ise hücre membranında yer alan faj DNA enjeksiyon proteini (PIP proteini) ile ilişkilenecek faj DNA'ının enjeksiyonunun gerçekleştirildiği belirlenmiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* C2 suşunda PIP proteini yanında, faj DNA enjeksiyonunu aktive eden 32 kDa büyüklükte bir proteininin varlığı da tanımlanmıştır.

Eğer konakçı hücrede restriksiyon endonukleaz enzimleri yok ise, faj DNA enjeksiyonundan sonra, konakçı hücre metabolizması bloke edilmekte ve erken faj proteinleri üretilmek suretiyle faj replikasyonu başlatılmaktadır (POWELL ve ark. 1992). Faj yapısal genlerinin transkripsiyonu ve translasyonunu takiben; üretilen ana faj yapılarının (baş, yaka, kuyruk vb.) montesi, faj DNA'nın baş yapısı içerisine alınması ve son aşamada da faj lizin'leri yardımı ile konakçı hücre duvarının parçalanması sonucu, üretilen faj kuşağının salınımı gerçekleşmektedir. Latent dönemin süresi, suş ve faja bağlı olarak 9-139 dk arasında değişme göstermektedir. Laktokok fajlarının patlama büyüklükleri ise 250 adete kadar ulaşabilmektedir. Değişik araştırmacılar, laktokok fajlarında latent dönemin ve patlama büyüklüğünün; sıcaklık ve konakçı hücre farklılıkları gibi parametrelere bağlı olarak değişebileceğini saptamıştır (ALLISON ve KLAENHAMMER, 1998; MOINEAU, 1999; McGRATH ve ark. 2001).

Temperent Laktokok Fajları ve Lizogeni

Lizogeni, *Lactococcus* cinsine dahil türlerde yaygın olarak görülen bir durumdur. Temperent (ılımlı) fajlarda adsorbsiyon ve faj DNA enjeksiyonundan sonra, bölge spesifik bir rekombinasyon yolu ile faj DNA, konakçı kromozomuna entegre olmakta ve lizogenik bir yaşam döngüsü başlatılmaktadır (ØSTERGAARD ve ark. 2001). Laktokok konakçı hücrelerinin ultraviyole ve mitomisin C gibi mutajenlere maruz bırakılması sonucu SOS-yanıtlı tamir mekanizmalarını devreye sokulduğunun belirlenmesi, lizogenik yaşam döngüsünden litik

yaşam döngüsüne dönüşümün mekanizmasının *Escherichia coli* λ fajının genetik şalter sistemine benzediğinin güçlü delili olarak kabul edilmektedir (BOYLE ve ark. 1993; VAN GUCHTE ve ark. 1994; ALLISON ve KLAENHAMMER, 1998; PETERSEN ve ark. 2000).

Lizogeni pratik anlamda, virüent türev fajların üretilmesinde rezervuar görevi görmektedir. Zira laktokoklara ait birçok temperent fajın, litik fajlarla moleküler genetik düzeyde benzerliği saptanmıştır. Her ne kadar genetik rekombinasyonlar, temperent fajlardan virüent fajların oluşumuna yol açabiliyor ise de, halen temperent fajlarla akraba olmayan birçok virüent fajın tanımlanmış oluşu, bu türemenin genel geçer bir mekanizma olduğu yolundaki görüşleri güvenilirlikten uzaklaştırmaktadır (MOINEAU ve ark. 1994; DALY ve ark. 1996; MAHANINVONG ve ark. 2001).

Lizogeni çalışmaları, laktik asit bakterilerinin yeni genetik araçlar kullanılarak analize tabi tutulmaları ile farklı boyutlar kazanmıştır. Bugüne kadar hem *Lactobacillus* ve hem de *Lactococcus* fajlarında bazı bölge spesifik entegrasyon kasetlerinin ve salınım sistemlerinin analizi gerçekleştirilmiştir (BIRKELAND ve HOLO, 1993; RAYA, 1994; McGRATH ve ark. 1999). Öte yandan, lizogenik suşlarda bir başka faj ile enfeksiyonun engellenmiş oluşu, laktokoklarda lizogeni' yi önemli kılan bir diğer noktadır. Ayrıca litik laktokok fajlarında, bu faj genomları tarafından kodlanan direnç sistemleri (Per) tanımlanmıştır. Bu sistemlerin ortak özelliği, süperenfeksiyona izin vermemeleridir (HILL ve ark. 1992; O'SULLIVAN ve ark. 1993; McGRATH ve ark. 2001; O'SULLIVAN ve ark. 2001).

Laktokok Fajlarının Genomik Organizasyonu

Laktokok fajlarının genetik analizleri sonucu; çift zincir DNA molekülleri içerdiği, G+C oranının ~ % 38 olduğu ve genom büyüklüklerinin 18-40 kb arasında değiştiği saptanmıştır. Ancak, nadiren de olsa 134 kb büyüklüğe ulaşabilen laktokok faj genomları tanımlanmıştır (PREVOTS ve ark. 1990; CHANDRY ve ark. 1997; ALLISON ve KLAENHAMMER, 1998). Laktokok faj genomlarının çoğunluğunun yapışkan uç içerdiği ve bu uçların genom sirkülizasyonunda rol aldığı bilinmektedir. Farklı genom tiplerinde faj DNA' inin baş yapısı içerisine paketlenmesinde iki değişik mekanizmanın kullanıldığı belirlenmiştir (NAUTA ve ark. 1993; CHANDRY ve ark. 1994; ERMEL ve ark. 1994; DALY ve ark. 1996).

Hibridizasyon çalışmaları, laktokok fajlarının değişebilir genetik modüller halinde organize olduğunu kanıtlamıştır. Litik özellikteki $\phi c2$, $\phi sk1$ ve $\phi bL67$ fajlarının genomik ve transkripsiyonel analizleri sonucu; çok erken, erken ve geç ifade edilen gen bölgeleri tanımlanmıştır (SCHOUER ve ark. 1994; SHEENAN ve ark. 1999). Temperent fajlar üzerinde yürütülen DNA dizi analizleri, yaşam döngüsü opsiyonu (litik ve temperent) ile ilgili, farklı oryantasyonlara sahip iki gen grubunun bulunduğunu göstermiştir (DALY ve ark. 1996). Bu gen grupları arasında, özellikle lizogeniden sonra başka enfeksiyonun engellenmesini yöneten genler, endüstriyel açıdan önem taşımaktadır.

Tüm genom analizleri tamamlanmış laktokok fajlarından sağlanan verilere göre, bu fajların genomlarında çok düşük oranda kod içermeyen bölge bulunmaktadır. Primer genetik organizasyonlarında büyük oranda benzerlikler saptanırken, faj türlerine özgü gen sıkışma bölgelerinin (açık okuma kalıpları, ORF) ana farklılığı meydana getirdiği tanımlanmıştır. Bu ORF bölgelerde; replikasyon, gen regülasyonu, kromozoma entegrasyon ve ayrılma, süperenfeksiyona direnç, paketlenme ve adsorbsiyonda rol alan proteinlerin kodlandığı belirlenmiştir (SHAERMAN ve ark. 1989; CHANDRY ve ark. 1994; GARVEY ve ark. 1995). Bu bulgular aynı zamanda, fajların bakteriyel metabolizmayı kendi amaçları doğrultusunda nasıl kullandıklarına ışık tutmaktadır.

Laktokok fajlarına ait yeni genlerin sekans analizleri ve klonlarının oluşturulması ile; konakçı hücre parçalanması, kromozomal entegrasyon ve bazı düzenleyici bölge genlerinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir (HILL ve ark. 1990, BIRKELAND ve HOLO, 1993; VAN SINDEREN ve ark. 1995; MAHANINVONG ve ark. 2001) (Çizelge 1).

Çizelge 1. Laktokok Fajlarında Tanımlanan Genler/DNA Elementleri (GARVEY ve ark.1995 MAHANINVONG ve ark. 2001).

Faj	Gen/element	Fonksiyon
φvml3	Lisin	Lisin
BK5-t	<i>bpi</i>	Gen ifadesinin regülasyonu
	<i>pal1, pf2, pa3, pg2, pf1</i>	Faj promotor sekansları
	<i>imm</i>	Olası bir represör sekansı
φ50	<i>per50</i>	Replikasyon orijini
	<i>Ual</i>	Metilaz
φ197	<i>poa17, por14, poa79</i>	Yapısal proteinleri kodlayan fragmentler
φlc3	<i>cos</i>	Paketleme
	<i>int, attP/attB</i>	İntegraz, bağlanma bölgeleri
	<i>LysA, LysB</i>	Lisin ve Holin
f4-1	<i>mcp, p35, p43</i>	Yapısal proteinler
φ7-9	<i>orf1356</i>	Olası regülatör
φUS3	<i>lytA, orf 66</i>	Lisin ve Holin
p001	Lisin	Lisin
c2	Tamamının DNA dizi analizi yapıldı 39 ORF tanımlandı	Lisin, Holin ve Yapısal proteinler Cos bölgesi, rekombinaz fonksiyonu, helis-dönüş-helis proteini, olası sigma faktörü, olası terminaz bağlanma bölgesi
φ31	<i>per31</i>	Replikasyon orijini
tp9001	<i>attB</i>	Bağlanma bölgesi (integraz klonlandı)
φsk1	<i>cos</i>	Peketleme
tuc2009	Tamamının dizi analizi yapıldı	İntegraz bağlanma bölgesi, yeni bir represör, paketleme bölgesi, dUTPaz, replikasyona katılan proteinler
R1-t	Tamamının dizi analizi yapıldı 50 ORF tanımlandı	Lisin, Holin, Yapısal proteinler İntegraz bağlanma bölgesi, represör, cos-bölgesi, dUTPaz, replikasyona katılan proteinler
bIL67	Tamamının dizi analizi yapıldı 37 ORF tanımlandı	Lisin, Holin, Yapısal proteinler Cos bölgesi, terminaz alt ünitesi, rekombinaz fonksiyonu, olası DNA polimeraz, abi-105 için hedef bölge

Laktokok konakçı hücreninin fajlar aracılığı ile parçalanması, faj lisin enzimlerinin aktivitesinde olduğu gibi, ya peptidoglukan ağındaki amino şekerleri arasında yer alan glikozidik bağları ya da glukoz zinciri ile buna bağlı peptit arasındaki N-asetil-muramyl-L- alanin köprülerini kırmaktadır. İlk klonlanan faj lisin geni φml3 fajına ait genidir (SHAERMAN ve ark. 1989). Daha sonra bu genin, dizi analizi yapılan tüm prolat fajlarda aynı olduğu saptanmıştır (GARVEY ve ark. 1995; ALLISON ve KLAENHAMMER, 1998). Hem Gram pozitif ve hem de Gram negatif bakterilerde bakteriyofajlar tarafından meydana gelen parçalanmanın lisin ve holin olmak üzere iki ana elemanı bulunmaktadır (YOUNG, 1992). Holinlerin membrana spesifik olmayan bölgelerden bağlanarak lezyona yol açtığı ve bu sayede lisinlerin, etki ettikleri murein ağına ulaştığı bilinmektedir (GARVEY ve ark. 1995). Bazı laktokok fajları üzerinde yürütülen DNA dizi analizleri sonucu, holin genlerinin, lisin genlerinin 5' ard bölgelerinde yer aldığı saptanmıştır. Ancak φbIL67 fajının lizis sisteminde ise lisin ve holin genleri ayrı genom bölgelerinde yer almaktadır (PLATTEUW ve de VOS, 1992; ARENDT ve ark. 1994; BIRKELAND ve HOLO, 1993; MOINEAU ve ark. 1999)(Çizelge 2).

Laktokokların temperent bakteriyofajlarının çoğunluğu; λ fajında tanımlanan model sistemde olduğu gibi, faj (*attP*) ve bakteri (*attB*) genomlarında yer alan bağlanma bölgelerinin etkinliği sayesinde meydana gelen bir bölge spesifik entegrasyon olayı ile bakteriyel kromozoma bağlanmaktadır (MAHANINVONG ve ark. 2001; ØSTERGAARD ve ark. 2001). Bu entegrasyon reaksiyonu, faj tarafından kodlanan bir bölge spesifik entegraz enzimine gereksinim duyar. Entegraz enzim genleri,

analizi yapılan 3 laktokok fajında (*tuc2009*, ϕ lc3 ve ϕ r1-t), küçük farklılıklar göstermiştir (CHRISTIANSEN ve ark. 1994; DALY ve ark.1996; McGRATH ve ark. 2001).

Laktokok fajlarının yapısal proteinleri ve bu proteinleri kodlayan genlerinin analizi sonucu; ϕ 197 fajının *pao17* ve ϕ BL67 fajının *orf31* genleri tarafından kodlanan proteinler hariç, diğerlerinin sekans benzerliği gösterdiği saptanmıştır. Yapısal genler laktokok fajlarının genomunda genellikle gen grupları halinde bulunmamaktadır. Ancak f4-1 fajında major kapsid proteini ile minör yapısal proteini genleri grup oluşturacak yakınlıkta ve ϕ c2 fajında 3 major ve 8 minör yapısal proteinin 2 gen grubu oluşturacak şekilde yer aldığı saptanmıştır (SCHOULER ve ark. 1994; VAN SINDEREN ve ark. 1995; PETERSEN ve ark. 2000).

Laktokok fajlarında, faj gen regülasyonunu yöneten bazı proteinlere ait genler saptanmıştır. İlk tanımlanan regülatör gen BK5-t fajına ait *bpi* genidir. Yapılan çalışmalarda *bpi* gen ürünü proteininin lizogen bir faj olan BK5-t' nin belirli promotorlarında transkripsiyonel aktiviteyi inhibe ettiği belirlenmiştir (LAKSHIMIDEVI ve ark. 1990). Diğer yandan laktokok fajlarında tanımlanan bazı genlerin ürünlerinin maya translasyon başlatma faktörü ve *E. coli* LexA proteini ile sekans benzerlikleri, bu faj proteinlerinin regülatör protein karakteri taşıdığına işaret etmiştir. Özellikle BK5-t fajının *imm* ve *cl* geni ürünü RecA-spesifik (parçalayıcı) proteinlerinin, değişik bakteri fajlarında tanımlanan benzer proteinlerle sekans uyumu bu öngörüğü güçlendirmektedir. BK5-t fajında *imm* geninin yapısal gen bölgesinde yer alan ve iki farklı promotor ile tamamlayıcı DNA sekansları içeren üç operatör sekansının saptanması, bu fajda da, λ fajı benzeri bir mekanizma ile lizogeninin oluşturulduğu ve korunduğu fikrini doğrulamıştır (PTASHNE, 1986; ØSTERGAARD ve ark. 2001). Bu öngörüğü destekleyen ileri deliller, R1-t fajının regülatör bölgesinin ifadesini ölçmek için *lacZ* geni füzyonlarının kullanılmasından ve represörü kodlayan gendeki bir mutasyonun gen ifadesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesinden sağlanmıştır.

L. lactis fajı ϕ 50' den klonlanan *per50* ve yine laktokok fajı ϕ 31' den klonlanan *per31*(HILL ve ark. 1991; O'SULLIVAN ve ark. 1993) lokuslarının replikasyona katıldığı ve süperenfeksiyonu engelleyerek konakçı suşa dirençlilik sağladığı belirlenmiştir. *tuc2009* ve ϕ r1-t fajlarında bazı ORF bölgelerinin sekans analizlerinin karşılaştırılması sonucu; *Bacillus subtilis* fajı *ssp1'* in replikasyon proteini ve *E. coli*' nin DnaC proteini homoloğu bir tek zincir bağlanma proteini gen kodu ile tamamen aynı bulunması, söz konusu faj genlerinin replikasyonda rol aldığı kesin kanıtları olarak kabul edilmiştir (CHANDRY ve ark. 1997). Diğer yandan faj paketlenme etkinliği gösteren enzimler, DNA polimeraz, terminazlar ile lisin ve holinlere ait genlerin ORF bölgeleri değişik laktokok fajlarında tanımlanmıştır. Son olarak laktokok fajlarından hücre içi dUTP konsantrasyonunu düşürmek suretiyle urasilin faj DNA'sına katılmasını engelleyen, dUTPaz enzimlerine ait gen kodu belirlenmiştir (GARVEY ve ark. 1995).

Çizelge 2. Laktokok Fajlarında Tanımlanan Lisin Modülleri (GARVEY ve ark. 1995).

Faj	Enzimatik Aktivite	c- Uç Tekrarı	Holin
Prolat			
ϕ vml3	Muramidaz	Yok	Bilinmiyor
c2	Muramidaz	Yok	Bilinmiyor
bIL67	Muramidaz	Yok	Var
p001	Muramidaz	Yok	Bilinmiyor
Küçük İzometrik			
ϕ us3	Amidaz	Yok	Var
<i>tuc2009</i>	Muramidaz	Var	Var
ϕ lc3	Muramidaz	Var	Var
R1-t	Amidaz	Yok	Var

SONUÇ

Laktik fajların genetik elastisiteleri sayesinde konakçı hücre kaynaklı faj dirençlilik sistemlerinden kurtulma yetenekleri, starter kültürlerde kalıcı ve tüm endüstriyel fajlara karşı etkin dirençlilik sistemlerinin geliştirilmesine engel olmaktadır. Bu sorunun aşılmasında; söz konusu fajların genomik organizasyonunun çözümü ile faj kökenli direnç ve yeniden düzenlenme sistemlerine karşı bakterilerde nasıl bir genetik mekanizmanın dizayn edileceğinin tanımlanması, zorunlu aşamalardır. Bu amaç doğrultusunda, son 10 yıldır değişik ülkelerde oluşturulan laktik faj çalışma grupları, laktokok fajlarının tüm genom ve proteom analizleri üzerinde çalışmaktadır. Elde olunan veriler doğrultusunda bazı gıda düzeyli vektör sistemleri geliştirilmiş ve endüstriyel starter kültürlerde kullanılır hale gelmiştir.

KAYNAKLAR

- ALLISON, G.E., KLAENHAMMER, T.R. 1998. Phage Resistance Mechanisms in Lactic Acid Bacteria. *Int. Dairy. J.* 8: 207-226.
- ARENDRT, E.K., DALY, C., FITZGERALD, G.F. 1994. Molecular Characterization of Lactococcal Bacteriophage Tuc2009. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1875-1883.
- BIRKELAND, N. K., HOLO, H. 1993. Transduction of a Plasmid Carrying the Cohesive End Region from *Lactococcus lactis* Bacteriophage ϕ LC3. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1966-1968.
- BOYLE, J.D., DAVIDSON, B.E., HILLIER, A.J. 1993. A Putative Immunity Region of the Temperate Lactococcal Bacteriophage BK5-t. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 9-27.
- CHANDRY, P.S., DAVIDSON, B.E., HILLIER, A.J. 1994. Temporal Transcription Map of the *Lactococcus lactis* Bacteriophage sk1. *Microbiology* 140: 2251-2261.
- CHANDRY, P.S., MOORE, S.C., BOYLE, J.P., HILLIER, A.J. 1997. Analysis of the DNA Sequence, Gene Expression, Origin of Replication and Modular Structure of the *Lactococcus lactis* Bacteriophage sk1. *Mol. Microbiol.* 26: 49-64.
- CHRISTIANSEN, B., JOHNSON, M.G., VOGENSEN, F.K., HAMMER, K. 1994. Characterization of the Lactococcal Temperate Phage TP901-2 and its Site Specific Integration. *J. Bacteriol.* 176: 1069-1076.
- DALY, C., FITZGERALD, G.F., DAVIS, R. 1996. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria with Special Reference to Bacteriophage Resistance. *Ant. Leeuwenhoek* 70: 99-110.
- ERMEL, G., CAVALIER, A., THOMAS, D., Le PENNEC., J.P. 1994. Genetic Studies of Lactococcal Bacteriophages. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 431-441.
- GARVEY, P., VAN SINDEREN, D. TWOMEY, D.P HILL, C., FITZGERALD, G.F. 1995. Molecular Genetics of Bacteriophage and Natural Phage Defence Systems in Genus *Lactococcus*. *Int. Dairy J.* 5:905-947.
- GELLER, B.L. 1993. Cloning of a Chromosomal Gene Required for Phage Infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* c2. *J. Bacteriol.* 175: 5510-5519.
- HILL, C., MILLER, L.A., KLAENHAMMER, T.R. 1991. Rapid Method to Characterize Lactococcal Bacteriophage Genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:283-288.
- HILL, C., SANOSKY-DAVIES, R.B., KLAENHAMMER, T.R. 1992. Bacteriophage and Bacteriophage Resistance in Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 87-108.
- LAKSHMIDEVI, G., DAVIDSON, B.E., HILLIER, A.J. 1990. Molecular Characterization of Promoters of the Lactococcal Bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 934-942.
- MAHANINVONG, C., BOYLE, J.P., DAVIDSON, B.E., HILLIER, A.J. 2001. Sequence Analysis and Molecular Characterization of the *Lactococcus lactis* Temperate Bacteriophage BK5-T. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3564-3576.
- McGRATH, S., SEEGER, J.F., FITZGERALD, G.F., VAN SINDEREN, D. 1999. Molecular Characterization of a Phage-Encoded Resistance System in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1891-1899.
- McGRATH, S., FITZGERALD, G.F., VAN SINDEREN, D. 2001. Improvement and Optimization of Two Engineered Phage Resistance Mechanisms in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 608-616.
- MOINEAU, S., PANDIAN, S., KLAENHAMMER, T.R. 1994. Evaluation of a Lytic Bacteriophage via DNA Acquisition from the *Lactococcus lactis* Chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1832-1841.
- MOINEAU, S. 1999. Applications of Phage Resistance in Lactic Acid Bacteria. *Ant. Leeuwenhoek* 76: 377-382.
- MONTEVILLE, M.R., ARDESTANI, B., GELLER, B.R. 1994. Lactococcal Phages Require a Host Cell Wall Carbohydrate and Plasma Membrane Protein for Adsorption and Ejection of DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3204-3211.
- NAUTA, A., KARSENS, H., VENEMA, G. 1993. Sequence Analysis of a Temperate Lactococcal Bacteriophage. *Microbiol. Rev.* 12: 25-54.

- O'SULLIVAN, J.D., HILL, C., KLAENHAMMER, T.R. 1993. Effect of Increasing the Copy Number of Bacteriophage Origins. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2449-2456.
- O'SULLIVAN, J.D., ROSS, P., TWOMEY, D.P., HILL, C. 2001. Naturally Occuring Lactococcal Plasmid pAH90 Links Bacteriophage Resistance and Mobility Functions to a Food Grade Selectable Marker. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 929-937.
- PETERSEN, M., ØSTERGAARD, S., VOGENSEN, F. 2001. Mutational Analysis of Two Structural Genes of the temperate Bacteriophage TP901-1. *Virology* 276: 315-328.
- PLATTEUW, C., DE VOS, W.M. 1992. Location, Characterization and Expression of Lytic Enzyme Encoding Gene, *LytA*. *Gene* 118: 115-120.
- POWELL, I.B., TULLOCH, P.L., HILLIER, A., DAVISON, B.E. 1992. Phage DNA Synthesis and Host DNA Degradation in the Life Cycle of *Lactococcus lactis* Bacteriophage c6A. *J. Gen. Microbiol.* 66: 2737-2741.
- PREVOTS, F., MATA, M., RITZENTHALER, P. 1990. Taxonomic Differentiation of 101 Lactococcal Bacteriophages with Unusually Large Genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2180-2185.
- PTASHNE, M. 1986. *A Genetic Switch: Gene Control and Phage Lambda*. Blackwell Sci. Pub. Palo Alto, California.
- ØSTERGAARD, S., BR ØNDSTED, L., VOGENSEN, F. 2001. Identification of a Replication Protein and Repeats Essential for DNA Replication of the Temperate Lactococcal Bacteriophage TP901-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 774-781.
- RAYA, R.R. 1994. Site-Specific Integration of the Temperate Bacteriophage ϕ adh. *J. Bacteriol.* 174: 5584-5592.
- SCHOULER, C., ERLICH, P., CHOPIN, M.C. 1994. Sequence and Organization of the Lactococcal Prolate-Headed bIL67 Phage Genome. *Microbiology* 140: 3061-3069.
- SHEENAN, M.M., STANLEY, E., FITZGERALD, G.F., VAN SINDEREN, D. 1999. Identification and Characterization of a Lysis Module Present in a Large Proportion of Bacteriophages Infecting *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 569-577.
- SHAERMAN, C.A., UNDERWOOD, H., JURY, K., GASSON, M. 1989. Cloning and DNA Sequence Analysis of a *Lactococcus* Bacteriophage Lysin Gene. *Mol. Gen. Genet.* 218: 214-221.
- TUNCER, Y., AKÇELİK, M. 2002. A Protein Which Masks Galactose Receptor Mediated Phage Susceptibility in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MPL56. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 37: 1-6
- VALYASEVI, R., SANDINE, W.E., GELLER, B.L. 1991. A Membrane Protein is Required for Bactreiophage c2 Infection. *J. Bacteriol.* 173: 6095-6100.
- VAN GUCHTE, M., DALY, C., ARENDT, E.K. 1994. Identification of the Putative Repressor Encoding Gene *cl* of Temperate Lactococcal Bacteriophage Tuc2001. *Gene* 144: 93-95.
- VAN SINDEREN, D., KARSENS, H., KOK, J., VENEMA, G., TAUTA, A. 1996. Sequence Analysis and Molecular Characterization of Temperate Bacteriophage *r1t*. *Mol. Microbiol.* 19: 1343-1345.
- WHITEHEAD, H.R., COX, G.A. 1935. The Occurrence of Bacteriophage in Lactic Streptococci. *NZ J. Dairy. Sci. Technol.* 16: 319-320.
- YOUNG, R. 1992. Bacteriophage Lysis: Mechanism and Regulation. *Microbiol. Rev.* 56: 430-481.