

k výrazné stimulaci Th-2 cytokinu IL-6 v porovnání s kontrolou, protože pro zachování zdraví je nezbytná rovnováha mezi Th-1/Th-2 cytokiny. Při porušení této rovnováhy dochází k rozvoji celé řady onemocnění. Stimulační efekty různých koncentrací *Dunaliella salina* na ostatní sledované cytokiny (IL-10, IL-4, INF- γ) byly nízké v porovnání s kontrolou a nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami. V další studii An *et al.* (2008) testovali také imunomodulační vlastnosti *Chlorella vulgaris* tentokrát na zvířecím modelu myši. Zjištěné výsledky opět prokázaly zvýšení IFN- γ a IL-2 po aplikaci *Chlorelly* (1 mg/ml) v porovnání s kontrolou a minimální efekt na IL-4. Imunomodulační efekt vodných extraktů jednobuněčných řas je připisován přítomnosti polysacharidů se specifickou strukturou Suárez *et al.* (2010). V práci Caroprese *et al.* (2012) testovali imunomodulační a protizánětlivé vlastnosti směsi fytoosterolů (ergosterol a 7-dehydroporiferasterol) izolovaných z řasy *Dunaliella tertiolecta* na mononukleárních buňkách izolovaných z krve ovcí. Výsledky ukázaly možné použití směsi fytoosterolů, jako krmných doplňků při zánětlivých onemocněních ovcí vzhledem ke zjištěné redukci pro-zánětlivých cytokinů a stimulaci regulačního cytokinu IL-10.

Zjištěné výsledky ukázaly pozitivní vliv *Dunaliella salina* na růst vybraného souboru mikroorganismů i pozitivní imunomodulační vlastnosti, přesto bude dále vhodné otestovat i vliv extraktů řasy a její dezintegrované formy, jelikož byl k testování využit komerčně dostupný produkt v podobě řasového prášku, který obsahuje lyofilizované celé buňky. V předložené studii byla použita pro testování imunomodulačního efektu krev zdravých dárců, v budoucnu je pro bližší posouzení plánováno použití také mononukleárních buněk od lidí s autoimunitními onemocněními, aterosklerózou apod.

Poděkování:

Tato práce vznikla v rámci institucionální podpory VÚM s.r.o., rozhodnutí č. RO 1416.

Literatura:

- AN, H. J., H. K. RIM, J. H. LEE, M. J. SEO, J. W. HONG, N. H. KIM, N. Y. MYUNG, P. D. MOON, I. Y. CHOI, H. J. NA, S. J. KIM, H. J. JEONG, H. S. PARK, J. G. HAN, J. Y. UM, S. H. HONG AND H. M. KIM (2008): "Effect of *Chlorella vulgaris* on Immune-enhancement and Cytokine Production *in vivo* and *in vitro*." *Food Science and Biotechnology* **17**: 953-958.
- BEHESHTIPOUR, H., A. M. MORTAZAVIAN, P. HARATIAN AND K. K. DARANI (2012): "Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties." *European Food Research and Technology* **235**: 719-728.
- BEHESHTIPOUR, H., A. M. MORTAZAVIAN, R. MOHAMMADI, S. SOHRABVANDI AND K. KHOSRAVI-DARANI (2013): "Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* Algae into Probiotic Fermented Milks." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**: 144-154.
- CAROPRESE, M., M. ALBENZIO, M. G. CILIBERTI, M. FRANCAVILLA AND A. SEVI (2012): "A mixture of phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* affects proliferation of peripheral blood mononuclear cells and cytokine production in sheep." *Veterinary immunology and immunopathology* **150**: 27-35.
- DE JESUS RAPOSO, M. F. AND A. M. M. B. DE MORAIS (2015): "Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke." *Life Sciences* **125**: 32-41.

- DUFOSSÉ, L., P. GALAUP, A. YARON, S. M. ARAD, P. BLANC, K. N. CHIDAMBARA MURTHY AND G. A. RAVISHANKAR (2005): "Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?" *Trends in Food Science & Technology* **16**: 389-406.
- EWART, H. S., O. BLOCH, G. S. GIROUARD, J. KRALOVEC, C. J. BARROW, G. BEN-YEHUDAH, E. R. SUÁREZ AND M. J. RAPOPORT (2007): "Stimulation of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells by an aqueous *Chlorella* extract." *Planta medica* **73**: 762-768.
- HYRSLOVA, I., G. KRAUSOVA, J. BARTOVA, L. KOLESAR AND L. CURDA (2016): "Goat and Bovine Colostrum as a Basis for New Probiotic Functional Foods and Dietary Supplements." *Journal of Microbial & Biochemical Technology* **8**: 56-59.
- CHEN, C. Y., K. L. YEH, R. AISYAH, D. J. LEE AND J. S. CHANG (2011): "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review." *Bioresource Technology* **102**: 71-81.
- KAVIMANDAN, A. (2015): "Incorporation of *Sp. irulina platensis* into Probiotic Fermented Dairy Products." *International Journal of Dairy Science* **10**: 1-11.
- PULZ, O. AND W. GROSS (2004): "Valuable products from biotechnology of microalgae." *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**: 635-648.
- SUÁREZ, E. R., J. A. KRALOVEC AND T. BRUCE GRINDLEY (2010): "Isolation of phosphorylated polysaccharides from algae: the immunostimulatory principle of *Chlorella pyrenoidosa*." *Carbohydrate research* **345**: 1190-1204.

Přijato do tisku: 11. 7. 2017

Lektorováno: 1. 8. 2017

PŘIROZENÉ SYSTÉMY OCHRANY PROTI BAKTERIOFÁGŮM U BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

**Kateřina Fliegerová¹, Jakub Mrázek¹,
Miloslava Kavková², Jaroslava Marková²,
Martina Křepelková¹, Irena Němečková², Jan Kopečný¹**

¹ Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.

² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Natural Bacteriophage Defence Systems of Lactic Acid Bacteria

Abstrakt

Zákysové kultury bakterií mléčného kvašení dodávají fermentovaným mléčným výrobkům požadované texturní a organoleptické vlastnosti a rovněž přispívají k zajištění jejich mikrobiologické bezpečnosti a trvanlivosti, avšak mohou být náchylné k napadení bakteriofágy. Bakteriofágy infikující zákysové kultury zpomalují fermentaci, negativně ovlivňují kvalitu a bezpečnost fermentovaných produktů a mohou způsobit až úplné zastavení fermentace, což vede k významným hospodářským ztrátám. Studiu těchto bakteriofágů se proto věnuje mimořádná pozornost a postupně se odhalují genetické procesy životních cyklů bakteriofágů a také strategie, které ohrožené buňky používají k obraně vůči bakteriofágům. Tyto strategie lze rozdělit do pěti skupin. 1. Inhibice adsorpce bakteriofága na buněčnou stěnu bakterie, 2. Zablokování proniknutí bakteriofágové DNA do bakteriální buňky, 3. Restriktivně-modifikační obranný systém, 4. Systém abortivní infekce a 5. CRISPR/Cas systém.

Klíčová slova: bakteriofágová infekce, obranný systém bakterií, inhibice adsorpce, superinfekce, restriktivně-modifikační systém, Abi systém, CRISPR/Cas systém

Abstract

Lactic acid bacteria as dairy starters provide the desired texture and organoleptic properties of fermented products as well as contribute to their microbiological safety and shelf-life but they may be susceptible to the attack of bacteriophages. Bacteriophages infecting dairy starters slow down the fermentation, negatively affect the quality and safety of fermented products, and can cause quite discontinuance of fermentation, leading to significant economic losses. Therefore, extraordinary attention is paid to studies of these bacteriophages and obtained information gradually reveals the genetic processes of bacteriophage life cycles as well as the strategies of infected cells to defend against bacteriophages. These strategies can be divided into five groups. 1. Inhibition of bacteriophage adsorption on the bacterial cell wall, 2. Blocking the penetration of bacteriophage DNA into the bacterial cell, 3. Restriction-modification defensive system, 4. Abortive infection system, and 5. CRISPR / Cas system.

Key words: bacteriophage infection, bacterial defence system, inhibition of adsorption, superinfection, restriction-modification system, Abi system, CRISPR/Cas system

Úvod

V potravinářství se hojně používají kmeny Gram-pozitivních bakterií, které odvozují svou metabolickou energii z fermentace sacharidů na laktát, a proto se označují jako bakterie mléčného kvašení. Mlékárenský průmysl využívá zejména různé kmeny druhu *Streptococcus thermophilus* a rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus*, jakožto základní nebo doplňkové kyselé kultury při výrobě různých fermentovaných mléčných výrobků. Bakterie mléčného kvašení ovlivňují chuť a vůni fermentovaných výrobků a přispívají k prodloužení jejich trvanlivosti, jakož i k zajištění jejich mikrobiologické bezpečnosti, avšak mohou být náchylné k napadení bakteriofágy. Bakteriofágy, což jsou viry infikující bakterie, v tomto případě jednotlivé kmeny v kyselé kulturách, zpomalují fermentaci, negativně ovlivňují kvalitu a bezpečnost fermentovaných produktů a mohou způsobit až úplné zastavení fermentace, což vede ve svém důsledku k významným hospodářským ztrátám. Studium těchto bakteriofágů se proto věnuje mimořádná pozornost. Výrazný pokrok v molekulárně biologických, genomických a proteomických metodách v posledních letech postupně odhaluje na jedné straně diverzitu a genetickou podstatu životních cyklů bakteriofágů a na druhé straně umožňuje pochopení interakcí mezi bakteriofágy a hostitelem. To s sebou přináší odhalení strategií, které ohrožené buňky používají k obraně a nastolení rezistence vůči bakteriofágům. Selektace kyselé kultur se zvýšenou odolností vůči bakteriofágům se proto stává významnou součástí kontrolní strategie proti šíření bakteriofágů v mlékárenských provozech.

Bakterie mléčného kvašení si v průběhu koexistence s bakteriofágy vyvinuly přirozené obranné systémy, které jim umožňují přežít v prostředí, které je stálým rezervoárem bakteriofágové kontaminace. Tyto antifágové systémy lze rozdělit podle způsobu, jakým fungují, do pěti skupin. 1. Inhibice adsorpce bakteriofága na buněčnou stěnu bakterie, 2. Zablokování proniknutí bakteriofágové DNA do bakteriální buňky, 3. Restriktivně-modifikační obranný systém, 4. Systém abortivní infekce a 5. CRISPR/Cas systém.

1. Inhibice adsorpce bakteriofága na buněčnou stěnu bakterie

Zablokování adsorpce bakteriofága (fága) na extracelulární membránu představuje první linii bakteriální ochrany proti bakteriofágové infekci, která zabraňuje připojení fága (pomocí struktur fágového ocasu) k receptorům kódovaným hostitelskou bakterií. Při inhibici adsorpce se mohou uplatnit dva odlišné mechanismy.

První mechanismus zahrnuje expresi extracelulárních faktorů, které umožňují fyzické maskování receptoru. Jde buď o přímou syntézu antigenů na buněčném povrchu, které rozpoznají fágovou specifitu, nebo o produkci extracelulárních sacharidů (exopolysacharidů), které bakteriofágům zamezují přístup k receptorům (Tuncer a Akçelik, 2002). U některých kmenů (např. náležejících k druhu *L. lactis* subsp. *lactis*) syntetizované antigeny vykazují podobnost s lektiny, což je skupina proteinů, které se adsorbují na specifické monosacharidové složky polysacharidů v buněčné stěně, a tím fágům znemožní rozpoznání specifických fágových receptorů. Tento protein tak spíše specificky chrání receptor obsahující daný monosacharid, než že by interagoval s fágem. Bakteriální lektin tedy vlastně soutěží s fágem o receptor (Tuncer a Akçelik, 2002). Další formou fyzického maskování je produkce exopolysacharidů, které pokrývají povrch buněk, a poskytují tak bakteriím ochranu nejen proti bakteriofágům, ale i jiným škodlivým látkám, a pravděpodobně chrání buňku také proti vysoušení. U laktokoků určité důkazy naznačují, že exopolysacharidy obsahují cukerné zbytky, které jsou podobné nebo dokonce identické s fágovými receptory. Proto může být odolnost některých kmenů bakterií mléčného kvašení vůči fágům způsobena tím, že je fág imobilizován vazbou na takový exopolysacharid (Forde a Fitzgerald, 2003).

Druhý mechanismus souvisí se změnami ve struktuře receptorů nebo dokonce s jejich úplnou absencí na povrchu buněk (Coffey a Ross, 2002). Nedostatek funkčního receptoru může být důsledkem spontánní mutace v genetickém materiálu, což vede následně k mutantům necitlivým na bakteriofágy. U laktokoků je známo, že nedostatek funkčních receptorů pro určité fágy souvisí s mutacemi v genech, které zodpovídají za syntézu a transport sacharidů v těchto receptorech obsažených. Příkladem může být necitlivost některých kmenů laktokoků vůči fágům 936 a P335, která koreluje se ztrátou "galaktózového" receptoru v buněčné stěně. To však narušuje syntézu složek buněčné stěny a ve svém důsledku to vede k tomu, že takový bakteriální kmen sice je necitlivý vůči daným fágům, avšak často ztrácí požadované

fermentační vlastnosti a vykazuje zpomalený růst. Naproti tomu mutace v bakteriálním genu pro membránový *Pip* protein (fágový infekční protein), který kóduje specifický receptor pro fágy typu c2 a jehož interakce s fágem je nezbytná pro účinnou infekci, nemá žádné významné dopady na vitalitu laktokokových buněk a výsledné mutanty lze stabilně udržovat (Coffey a Ross, 2002).

2. Zablokování proniknutí fágové DNA do bakteriální buňky

I když se fág úspěšně adsorbuje na buněčný povrch bakterie, nemusí ještě dojít k jeho proniknutí do cytoplasmy. V tomto typu obranného mechanismu sehrávají roli systémy pro vyloučení superinfekce známé jako *Sie* (Superinfection exclusion) systémy. Tyto systémy byly dosud charakterizované pouze u některých bakterií (Mahony a kol., 2008) a zdá se, že mechanismy přerušování infekce bakterie fágovou DNA se pro jednotlivé rody liší. Poprvé byl *Sie* systém popsán u rodu *Lactococcus* a specifického fága typu P335, což vedlo k poznání, že po integraci bakteriofágového genomu do chromozomu bakterie se začne produkovat profágový *Sie* protein, který do budoucna zablokuje vstup infekční fágové DNA do buňky. Způsob zablokování nebyl dosud zcela objasněn, předpokládá se však, že *Sie* interaguje s faktory zodpovědnými za zahájení uvolnění fágové DNA z kapsidy nebo může interagovat s proteiny buněčné membrány, které jsou nezbytné pro translokaci DNA. Je tu určitá analogie s lysogenním fágovým represorem, který zabraňuje opakované infekci stejným fágem. Na rozdíl od něj však přítomnost *Sie* genů zajišťuje rezistenci vůči celé řadě fágů, včetně fágů jiných typů (Mahony a kol., 2008). Profágy jsou známy také u laktobacilů (Ventura a kol., 2004). Komparativní genomika u nich odhalila přítomnost genů kódujících proteiny sekvenčně podobné povrchově umístěnému lipoproteinu s biologicky potvrzenou funkcí fágové rezistence, který je kódován profágem TP-J34, jenž infikuje druh *Streptococcus thermophilus*. Z toho vyplývá, že u bakterií mléčného kvašení jsou *Sie* geny, které umožňují vyloučení infekce, umístěny na lysogenních modulech profágů, a proto jsou označovány jako systémy fágové rezistence odvozené od fága (Sun a kol., 2006).

3. Restriktivně-modifikační obranný systém

Po úspěšném proniknutí DNA do buňky může být fágová infekce zablokována pomocí restriktivně-modifikačních (RM) systémů. RM systémy v sobě spojují dvě enzymatické aktivity, a to endonukleázovou a methyltransferázovou, které zajišťují restriktivní a modifikační funkce (Blumenthal a Cheng, 2002). Obě tyto aktivity jsou specifické pro stejné cílové sekvence. Endonukleázová aktivita je zodpovědná za degradaci invazivní cizorodé DNA, včetně fágové DNA, která postrádá protektivní metylové skupiny. Methyltransferázová aktivita pak chrání hostitelskou DNA proti degradaci tím, že obsadí specifické nukleotidy cílového štěpného místa metylovou skupinou (Seegers a kol., 2000). Nemetylované cílové sekvence fágové DNA chráněny nejsou a jsou tudíž značně náchylné k působení endonukleáz,

což vede k degradaci genomu bakteriofága (Smith a kol., 2001). Tento způsob kombinující uvedené enzymatické aktivity omezuje proliferaci fágů v cytoplasmě, a přitom nepoškozuje bakteriální buňku. Jednou z největších výhod RM systémů je to, že infekci ukončí předtím, než je zahájena fágově řízená buněčná smrt. S určitou frekvencí však jistý počet fágových genomů unikne restriktivnímu štěpení a v průběhu replikace může být modifikován bakteriální methyltransferázou. Jakmile je fágová DNA modifikována, stává se pro endonukleázy nerozlišitelnou, a tudíž rezistentní, a fág může zahájit bez omezení svůj životní cyklus, který je pro hostitelskou buňku fatální (Wilson a Murray, 1991).

RM systémy se dělí do čtyř skupin na základě molekulární struktury enzymů, požadovaných kofaktorů, rozpoznávacích sekvencí a pozic pro štěpná místa (Seegers a kol., 2000, Smith a kol., 2001). U bakterií mléčného kvašení byly dosud popsány pouze systémy I, II a III, přičemž RM systém typu III není mezi mléčnými bakteriemi příliš rozšířený.

4. Systém abortivní infekce

Když RM systémy při ochraně bakterie proti invazivní fágové DNA selhávají a dochází k zahájení lytického cyklu šíření fágů, může ještě nastat dramatické omezení proliferace fágového potomstva, a to díky systémům známým jako abortivní infekce (Abi). Tyto systémy dokáží přerušit infekci v různých fázích fágového cyklu prostřednictvím zásahů do řady různých procesů. Jsou schopny přerušit replikaci i transkripci fágové DNA, syntézu proteinů nebo sestavení fágových částic a indukovat předčasnou lýzi buněk (Chopin a kol., 2005). Nejlépe jsou Abi systémy prostudovány u laktokoků, u nichž bylo dosud identifikováno více než 20 skupin mechanismů, které se postupně označují písmeny abecedy (Chopin a kol., 2005). Činnost jednotlivých mechanismů nebyla dosud zcela objasněna. Předpokládá se, že Abi proteiny interferují s procesy nezbytnými nejen pro fága, ale také pro vývoj bakterie, a je známo, že aktivace Abi systému vždy vede ke smrti individuálních buněk (Chopin a kol., 2005). V důsledku toho, že bakteriální buňka neposkytne své hostitelské prostředí pro pomnožení fága, uvolňování částic fágového potomstva je značně omezeno a ostatní buňky bakteriální populace přežívají. Abi systémy tedy představují bariéru proti bakteriofágové proliferaci, která je založena na "altruistické sebevraždě" infikovaných bakteriálních buněk. Toto sebeobětování sice vede k zániku jednotlivých buněk, ale poskytuje ochranu před fágovou infekcí pro bakteriální populaci jako celku.

5. CRISPR/Cas systémy

Další přirozeně se vyskytující obranný systém proti invazi cizorodých genetických elementů (fágy, plazmidy), popsán u prokaryot teprve nedávno, se označuje jako CRISPR/Cas systém (Horvath a Barrangou, 2010). Tento mechanismus fágové rezistence je založen na zabudování krátkých sekvencí odvozených z fágové DNA do specifických míst bakteriálního genomu, což činí bakteriální buňky imunními vůči těm fágům, které nesou homologní sekvence.

Termín CRISPR je zkratkou anglického slovního spojení "*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*", které označuje regiony sestávající z nekódujících sekvencí tvořených unikátními mezerníky (spacers) o velikosti 21 až 72 pb, které jsou odvozeny z fágové DNA a které jsou odděleny krátkými přímými opakovanými sekvencemi (21-48 pb) bakteriálního původu. Délka mezerníků a opakovaných sekvencí uvnitř jednoho uspořádání je vždy stejná, avšak počet těchto uspořádání se liší v závislosti na druhu, a to v rozmezí od 2 do 375.

Termín Cas je zkratkou pro výraz "*CRISPR associated proteins*", který označuje heterologní skupinu proteinů, které obsahují různé funkční domény typické například pro nukleázy, helicázy, proteiny vázající nukleovou kyselinu a podobně (Horvath a Barrangou, 2010). Specifická role jednotlivých Cas proteinů se liší, neboť se účastní různých fází CRISPRové rezistence. Geny proteinů Cas byly detekovány pouze v genomech, které obsahují CRISPRové repetice, počet těchto genů se pohybuje v rozmezí od 4 do 20 (Barrangou a kol., 2007) a jsou vždy umístěny ve stejné pozici vzhledem k lokusu CRISPR. Repetice CRISPR a geny kódující Cas proteiny jsou od sebe odděleny zaváděcí sekvencí, pro niž je typické vysoké zastoupení AT bazí a o níž se předpokládá, že je transkripčním promotorem CRISPR regionu (Lillestøl a kol., 2006).

CRISPR/Cas systém představuje prokaryotickou formu získané imunity, která se v bakterii vytváří po předchozím setkání s příslušnými bakteriálními viry. Mezerníková (spacerová) DNA pak tyto fágy rozpozná a deaktivuje je způsobem analogickým s mechanismem RNA interference v eukaryotických organismech. Jeden bakteriální genom může obsahovat až 18 CRISPR lokusů, což zřejmě buňce poskytuje rezistenci vůči rozdílným fágům (Horvath a Barrangou, 2010). Avšak i v tomto případě může bakteriofág uniknout obrannému mechanismu, neboť fágová DNA s mutací v sekvenci, z níž byl mezerník odvozen, získává odolnost k danému CRISPR/Cas systému.

Závěr

V podstatě neexistují žádné kultury bakterií mléčného kvašení, které by byly zcela odolné vůči fágové infekci. Dokonce i u nových kultur, které se zavádějí do mlékárenského průmyslu a vykazují bakteriofágovou rezistenci, jsou po určité době jejich používání fágy obvykle detekovány. Strategie rotace kyslíkových kultur, která je běžným technologickým opatřením proti šíření bakteriofágů, vyžaduje výběr kmenů odolných vůči široké škále fágů. Rychlá rotace většího počtu kmenů kyslíkových kultur na daném provozu však ovlivňuje koevoluci fágů a bakterií a paradoxně přispívá ke zvýšení diverzity a výskytu bakteriofágů v prostředí mlékárny (Heap a Lawrence, 1977).

Stále podrobnější znalosti o životním cyklu bakteriofágů a rostoucí počet jejich celogenomových sekvenčních analýz vede k vývoji nových genových modifikací obranných systémů, které se v přírodě nevyskytují. Molekulární techniky umožňují úpravy bakteriálních kmenů, které narušují přichycení, průnik do bakterie, eventuálně aktivitu

genů životně důležitých pro vývoj bakteriofágů. Cílem takových zásahů jsou zejména proteiny fágové replikace či jiné replikační faktory. Mnohé studie naznačují, že konstruované systémy mohou poskytnout bakteriím účinnou ochranu proti infekci a do budoucna lze očekávat bezpečný vývoj geneticky pozměněných bakterií mléčného kvašení s dlouhodobou odolností proti široké škále bakteriofágů.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou Ministerstva zemědělství ČR, Národní agentury pro zemědělský výzkum, v rámci řešení projektu č. QJ1510338 v programu KUS. Článek byl podpořen i v rámci Strategie AV21 (Program Potravin pro budoucnost, 2017) a projektu EXCELLENCE CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000460 OP RDE.

Seznam literatury

- BARRANGOU R., FREMAUX C., DEVEAU H., RICHARDS M., BOYVAL P., MOINEAU S., ROMERO D.A., HORVATH P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315, s. 1709-1712.
- BLUMENTHAL R.M., CHENG X. (2002): Restriction-modification systems. Ve: STREIPE U.N., YASBIN R.E. (edit.): *Modern microbial genetics* (2. vyd.), (pp. 177-226). New York, USA, Wiley.
- COFFEY A., ROSS R.P. (2002): Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie Leeuwenhoek*, 82, s. 303-21.
- FORDE A., FITZGERALD G.F. (2003): Molecular organization of exopolysaccharide (EPS) encoding genes on the lactococcal bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658. *Plasmid*, 49, s. 130-42.
- HEAP H.A., LAWRENCE R.C. (1977): The contribution of starter strains to the level of phage infection in a commercial cheese factor. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 12, s. 213.
- HORVATH P., BARRANGOU P. (2010): CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea. *Science*, 327, s. 167-170.
- CHOPIN M.C., CHOPIN A., BIDNENKO E. (2005): Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8, s. 473-479.
- LILLESTØL R.K., SHAH S.A., BRÜGGER K., REDDER P., PHAN H., CHRISTIANSEN J., GARRETT R.A. (2006): CRISPR families of crenarchaeal genus *Sulfolobus*: bidirectional transcription and dynamic properties. *Mol. Microbiol.*, 72, s. 259-272.
- MAHONY J., MCGRATH S., FITZGERALD G.F., VAN SINDEREN D. (2008): Identification and characterization of lactococcal-phage-carried superinfection exclusion genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, s. 6206-15.
- SEEGERS J.F., VAN SINDEREN D., FITZGERALD G.F. (2000): 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, s. 435-443.
- SMITH M.A., READ C.M., KNEALE G.G. (2001): Domain structure and subunit interactions in the type I DNA methyltransferase M. EcoR124I. *J. Mol. Biol.*, 314, s. 41-50.
- SUN X., GÖHLER A., HELLER K.J., NEVE H. (2006): The *ltp* gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 confers superinfection exclusion to *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. *Virology*, 350, s. 146-57.
- 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, s. 139-144.
- VENTURA M., CANCHAYA C., PRIDMORE R.D., BRÜSSOW H. (2004): The prophages of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533: comparative genomics and transcription analysis. *Virology*, 320, s. 229-242.
- WILSON, G.G., MURRAY, N.E. (1991): Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet.*, 25, s. 585-627.

Kontaktní adresa: Ing. Jan Kopečný, DrSc.,
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.,
Videňská 1083, 142 20 Praha 4, kopecnj@iagp.cas.cz

Přijato do tisku: 20. 6. 2017

Lektorováno: 15. 7. 2017