

Molecular identification and applied genetics of propionibacteria

Doctoral Thesis

Author(s):

Dasen, Gottfried Heinrich

Publication date:

1998

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-002055677>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Molecular Identification and Applied Genetics of Propionibacteria

A dissertation submitted to the

**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
(ETHZ)**

for the degree of
Doctor of Technical Sciences

presented by

Gottfried Heinrich Dasen

Dipl. Lm.-Ing. ETH

born June 25, 1966

citizen of Dübendorf ZH and Täuffelen BE

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Michael Teuber, examiner

Prof. Dr. Alexander von Graevenitz, co-examiner

Dr. Leo Meile, co-examiner

Zürich, 1998

SUMMARY

Propionibacteria have been found so far mainly in dairy products and on the skin of humans and animals. Due to the absence of real selective media, the isolation and identification of propionibacteria is difficult and time consuming. Because both groups of propionibacteria are of a certain importance, either as dairy starter cultures or as potential pathogens, a faster identification process is necessary. In addition, correct identification is needed as a basis for further molecular studies with propionibacteria.

The taxonomic situation of the genus *Propionibacterium* was reevaluated by the construction of a phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of all type strains. When necessary, the complete 16S rDNA sequences were determined in this thesis (two classical and four medically relevant species) or existing database entries were completed. A rapid molecular method based on multiplex PCR (MPCR) was developed to determine whether unknown bacteria belong to the genus *Propionibacterium* or not. Briefly, DNA from a pure bacterial culture is isolated using a short method (mediated by SDS and Proteinase K) and amplified by MPCR. A specific gene probe for propionibacteria, *gd1* (5'-TGCTTTCGATACGGGTTGAC-3') is used in the MPCR assay. This probe hybridizes only with the 16S rDNA (*E. coli* positions 632-651, V4 variable region) of strains belonging to the genus *Propionibacterium*. Propionibacteria are present in an isolate when a specific 900-bp (basepairs) sized DNA fragment is amplified in the MPCR assay. When "foreign" bacteria (not belonging to the genus *Propionibacterium*) occur in the sample, a 1500-bp sized fragment is amplified. This fragment is used as an internal control; as a proof that the MPCR analysis was performed correctly, but that no detectable amounts of propionibacteria were present in a sample. For pure cultures of propionibacteria, the detection limit was at 2×10^3 cfu per ml in a broth culture.

The MPCR method can be further used for a rapid screening for propionibacteria in samples, e.g. in raw milk or in clinical specimens. Due to the simple sample preparation, a large number of new habitats can now be investigated rapidly for the presence (or absence) of propionibacteria.

After determining the genus of isolates, the next step is the identification to species level. In this thesis, a molecular approach using partial sequencing of the 16S rDNA genes of propionibacteria was selected. *Propionibacterium* isolates were classified to their corresponding species by comparing the obtained 16S rDNA sequences to existing database entries (e.g. GenEmbl). The whole analysis was performed within two days.

In addition, a method for the identification of *P. freudenreichii*, the most relevant classical species, was developed. By using the PCR-amplified 16S-23S rDNA intergenic spacer region of the *P. freudenreichii* type strain as hybridization probe, all strains of our collection belonging to this species were detected. The same principle is proposed in this thesis for the identification of all other strains of the genus but this was not further investigated.

The *P. freudenreichii* species has been separated by certain researchers into two subspecies (*freudenreichii* and *shermanii*). Neither the 16S nor the 23S rDNA sequences of the type strains of both subspecies differed significantly in their base compositions. Therefore the separation of *P. freudenreichii* into subspecies should be abandoned.

For the genetic analysis of propionibacteria, plasmids suitable as cloning vectors were isolated. These plasmids are needed for the development of a genetic system with propionibacteria. Two plasmids, pLME101 and pLME108 were selected and further analyzed.

From *P. freudenreichii* JS53 plasmid pLME101 (40-kb sized) was isolated and a restriction map was constructed. Partial sequences (approximately 3 kb) of pLME101 were obtained using shotgun cloning. For one sequence fragment, an amino acid sequence identity of 53.2% with a hypothetical protein from *Synechocystis* sp. was found.

The complete nucleotide sequence of plasmid pLME108 (2051 bp), isolated from *P. freudenreichii* DF2, was determined. Two putative protein coding regions, *orf2* and *rep*, were identified. *Orf2* has no significant homologies with already known protein sequences. The *rep* region shows 42.1% amino acid identity with the Rep protein of plasmid pAP1 from *Arcanobacterium pyogenes*. Specific amino acid motifs needed for a replication by the rolling circle (RC) mechanism were found on pLME108 and led to the conclusion that this plasmid also replicates by the RC mode.

A genetic system with propionibacteria requires the investigation of DNA transfer methods like electroporation and conjugation. Both techniques were tested for propionibacteria, but in no experiment transformants were obtained. Either the conditions and plasmids used in this thesis were not suitable or complete new approaches for the genetic modification of propionibacteria have to be established.

ZUSAMMENFASSUNG

Propionibakterien wurden vor allem aus Milchprodukten und von der Haut von Menschen und Tieren isoliert. Das Fehlen eines echten Selektivmediums erschwert und verzögert die Isolierung und Identifizierung von Propionibakterien. Von Bedeutung sind Propionibakterien entweder als Starterkulturen in der Milchtechnologie oder als potentielle Pathogene. Zu ihrer raschen Identifikation wird eine Methode benötigt, die im weiteren auch als Basis für molekulargenetische Arbeiten mit Propionibakterien dienen soll.

Die taxonomische Situation innerhalb des Genus *Propionibacterium* wurde durch die Konstruktion eines phylogenetischen Stammbaums reevaluiert, der auf den 16S rDNS Sequenzen aller Typstämme basiert. Falls notwendig wurden in dieser Arbeit komplette 16S rDNS Sequenzen bestimmt (für zwei Spezies der klassischen Propionibakterien, sowie für vier medizinisch relevante Spezies) oder bestehende Sequenzen komplettiert.

Es wurde eine molekularbiologische Schnellmethode basierend auf „multiplex PCR“ (MPCR) entwickelt, die es ermöglicht, die Zugehörigkeit unbekannter Bakterien zum Genus *Propionibacterium* zu bestimmen. DNS aus einer Reinkultur wird mit einer Schnellmethode isoliert (unter Verwendung von SDS und Proteinase K) und mittels MPCR vermehrt. Eine spezifische Gensonde für Propionibakterien, gd1 (5'-TGCTTTTCGATACGGGTTGAC-3') findet in dieser MPCR Methode Verwendung. Diese Sonde hybridisiert nur mit der 16S rDNS von Stämmen die zum Genus *Propionibacterium* gehören (*E. coli* Positionen 632-651 der V4-variablen Region). Propionibakterien sind in einer Probe vorhanden, wenn ein spezifisches DNS-Fragment einer Länge von 900 Basenpaaren (Bp) mit der MPCR Methode amplifiziert wird. Treten Fremdkeime, die nicht zum Genus *Propionibacterium* gehören, in einer Probe auf, so wird nur ein DNS-Fragment mit der Länge von 1500 Bp gebildet. Dieses Fragment dient der internen Kontrolle der Methode und gilt als Beweis dafür, dass der MPCR-Nachweis korrekt durchgeführt wurde, aber eben keine Propionibakterien in der Probe vorhanden waren. Die Nachweisgrenze für Reinkulturen von Propionibakterien lag bei 2×10^3 koloniebildenden Einheiten pro ml einer Flüssigkultur.

Im weiteren kann die MPCR-Methode für ein schnelles „Probenscreening“ eingesetzt werden, z.B. in Rohmilch oder in klinischen Isolaten. Da die Probenaufarbeitung sehr einfach ist, können viele verschiedene neue Habitate nun auf das Vorhandensein von Propionibakterien untersucht werden.

Der nächste Schritt nach der Bestimmung des Genus eines Isolates ist die Identifikation

bis auf Spezies-Ebene. In dieser Arbeit wurde ein molekularbiologisches Vorgehen ausgewählt, das auf der partiellen Sequenzierung der 16S rDNA Gene von Propionibakterien basiert. Durch Vergleichen der gewonnenen 16S rDNA Sequenzen mit existierenden Datenbankeinträgen (z.B. GenEmbl) wurden *Propionibacterium* Isolate den ihnen entsprechenden Spezies zugeordnet. Diese gesamte Analyse kann innerhalb zweier Tage durchgeführt werden.

Zusätzlich wurde eine Methode zur Identifikation des wichtigsten Vertreters der klassischen Spezies, *P. freudenreichii*, entwickelt. Durch Verwendung der mittels PCR vermehrten 16S-23S rDNA „Spacer-Region“ des Typstamms von *P. freudenreichii* als Hybridisierungs-Sonde konnten alle Stämme dieser Spezies aus unserer Laborstammesammlung korrekt identifiziert werden. Für die Identifikation aller anderen Stämme des Genus kann möglicherweise das gleiche Prinzip angewendet werden, dies wurde aber nicht weiter verfolgt.

Die Spezies *P. freudenreichii* wird von verschiedenen Forschern in zwei Subspezies aufgeteilt (*freudenreichii* und *shermanii*). Weder die 16S noch die 23S rDNA Sequenzen der Typstämme beider Subspezies unterschieden sich wesentlich in ihrer Basenzusammensetzung. Darum wird in dieser Arbeit vorgeschlagen, dass die Trennung von *P. freudenreichii* in zwei Subspezies fallen gelassen wird.

Um ein genetisches Arbeiten mit Propionibakterien zu ermöglichen, wurden als Erstes Plasmide zur Konstruktion von Klonierungsvektoren isoliert. Diese Plasmide werden zur Entwicklung eines genetischen Systems für Propionibakterien benötigt. Zwei Plasmide, pLME101 und pLME108 wurden in der Folge ausgewählt und näher untersucht.

Aus *P. freudenreichii* JS53 wurde das Plasmid pLME101 (40 kb) isoliert und eine Restriktionskarte erstellt. Teilsequenzen von pLME101 (ca. 3 kb) wurden durch „Shotgun Cloning“ gewonnen. Die Sequenz eines Fragments zeigte auf Aminosäureebene eine Identität von 53.2% mit einem hypothetischen Protein von *Synechocystis* sp.

Für das Plasmid pLME108 (2051 bp), isoliert aus *P. freudenreichii* DF2, wurde die vollständige Nukleotidsequenz bestimmt. Zwei möglicherweise für Proteine kodierende Regionen, *orf2* und *rep*, wurden identifiziert. *Orf2* weist keine grösseren Ähnlichkeiten mit bereits bekannte Proteinsequenzen auf, während die *rep* Region 42.1% Aminosäure-Identität mit dem Rep Protein des Plasmids pAP1 aus *Arcanobacterium pyogenes* aufweist. Spezielle Aminosäuremuster, die für die Replikation durch den „rolling circle“ (RC) Mechanismus benötigt werden, konnten innerhalb der *rep* Region des Plasmids pLME108

identifiziert werden. Dies führte zum Schluss, dass dieses Plasmid ebenfalls den RC-Mechanismus für seine Replikation verwendet.

Die Entwicklung eines genetischen Systems für Propionibakterien setzt im Weiteren die Untersuchung von DNS Transfermethoden wie Elektroporation und Konjugation voraus. Beide Techniken wurden mit Propionibakterien getestet, aber Transformanten konnten in keinem Experiment erzielt werden. Entweder waren die verwendeten Bedingungen und Plasmide in dieser Arbeit nicht geeignet oder vollständig neue Ansätze zur genetischen Modifikation von Propionibakterien müssen entwickelt werden.