



Doctoral Thesis

DNA transformation of propionibacteria based on plasmids pLME106 and pLME108

Author(s):

Stierli, Melanie Patricia

Publication Date:

2002

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004304736> →

Rights / License:

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 14468

DNA Transformation of Propionibacteria Based on Plasmids pLME106 and pLME108

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
(ETHZ)

for the degree of
Doctor of Technical Sciences

presented by

Melanie Patricia Stierli

Dipl. Lm.-Ing. ETH

born November 10, 1973

citizen of Gebenstorf (AG)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Michael Teuber, examiner
Prof. Dr. Linda Thöny-Meyer, co-examiner
PD Dr. Leo Meile, co-examiner

Zurich, 2002

Summary

Propionibacteria have been used for a long time as dairy starter cultures mainly for the production of Swiss-type cheese. The need for a transformation system for propionibacteria has been expressed for quite a while. The improvement of genetic tools could help to make propionibacteria more important in biotechnological applications, as preservatives and producers of useful organic acids such as propionic and acetic acids. They could help to increase the productivity of the strains, change their nutrient requirements and confer resistance to phages. The aim of this thesis was the establishment of a transformation system for propionibacteria.

First of all, in order to gain a *Propionibacterium*-based replicon, the nucleotide sequence of the widespread plasmid pLME106 from *Propionibacterium jensenii* DF1 was determined. The sequence revealed 6868 basepairs (bp) and a G+C content of 65%. Ten open reading frames were proposed. Plasmid pLME106 was found to replicate by the theta replication system in which at least two open reading frames are involved, which revealed homology to the replication proteins of plasmid pLIM from a *Brevibacterium linens* strain. The region of the origin of replication was assumed to lay at least 500 bp upstream of the replication genes. With *ppnA*, the gene of propionicin SM1, the first function proposed for a *Propionibacterium* plasmid was detected on pLME106. High homology was also found for ORF6, which exhibited 49% identity with an invertase encoded on a *Rhodococcus* plasmid. For most of the remaining *orfs*, similarities to *orfs* of plasmids from *Corynebacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Bifidobacterium* sp., *Rhodococcus* sp. and *Mycobacterium* sp. were detected, all Gram-positive bacteria of the high G+C branch of the class *Actinobacteria*.

Together with plasmid pLME108, a *Propionibacterium freudenreichii* plasmid studied earlier in our laboratory, two interesting tools were at hand to fulfil the required task. When constructing vectors, it is important not to impair the replication of the plasmid by destroying the origin of replication. Therefore, the marker genes and the *E. coli* part were inserted at various sites. In addition, the choice of the right selective marker proved to be very important. The "low G+C" *cat* gene from *Staphylococcus aureus* and the rather "high G+C" *tet(W)* gene from a *Bifidobacterium* strain were chosen for our first vector constructions but did not lead to transformation of *Propionibacterium* and *Corynebacterium*. Finally, three effective and stable *Propionibacterium-E. coli* shuttle vectors were constructed. All of them contain the *cmx(A)* gene from *Corynebacterium striatum* plasmid pTP10 encoding a chloramphenicol efflux protein. Vector pMPS1 originates from pLME106 and has a size of 8.2 kb, the vectors pAMT1 and pAMT2 are 6.3 kb in size, and they are based on plasmid pLME108, which replicates by the rolling circle replication mechanism. The greatest difficulty in transforming *P. freudenreichii freudenreichii* DSM20271^T was to overcome the restriction/modification system of this strain. When vector DNA reisolated from *Propionibacterium* was used for the

transformation, the transformation efficiency increased to 10^7 - 10^9 transformants per μg of DNA, whereas with DNA from *E. coli* only 10^0 - 10^3 transformants were obtained. The three vectors were stably maintained in the *Propionibacterium* transformants, but obviously they induced a decreased growth rate of the transformants on solid medium.

Another plasmid construction, pMPS9, which differed from pMPS1 only in the orientation of the *cmx(A)* gene, was degenerated by the recipient strain. Still, chloramphenicol resistant *Propionibacterium* transformants were obtained, but the plasmids had lost at least the *E. coli* specific part. The examined degenerated plasmid pMPS9-D1 could be used as a *Propionibacterium* vector only, but it did not prove to be stable. These studies showed that the *Propionibacterium* replicon was functional in the *Propionibacterium* transformants but not in *E. coli*. Deletion experiments with pMPS1 and pAMT1 led to the same conclusion.

During investigation on additional functions encoded on *Propionibacterium* plasmids, we found that the orange or red colour of some *P. jensenii* strains could not be associated with the presence of plasmids. On the other hand, the orange or red colour was positively connected with the ability of β -hemolysis of these strains.

Zusammenfassung

In der Milchindustrie werden Propionsäurebakterien schon seit geraumer Zeit als Starterkulturen eingesetzt, hauptsächlich bei der Produktion von Emmentaler Käse. Die Forderung nach einem Gentransfersystem für diese Gattung von Bakterien wurde schon vor einiger Zeit geäußert. Die Entwicklung eines solchen Systems könnte bewirken, dass Propionsäurebakterien im Rahmen biotechnologischer Anwendungen eine wichtigere Rolle bekommen, sei es als Produzenten von Propion- und Essigsäure, oder sie könnten auch selber als Schutzkulturen direkt im Lebensmittel zum Einsatz kommen. Die Produktivität einzelner Stämme könnte verbessert und ihre Ernährungsbedürfnisse verändert werden. Auch könnte man ihnen eine Resistenz gegen Phagen verleihen. Das Ziel dieser Arbeit war, ein solches Transformationssystem für Propionsäurebakterien zu entwickeln.

Als erster Schritt wurde die Nukleotidsequenz des weitverbreiteten Plasmids pLME106 aus *Propionibacterium jensenii* DF1 bestimmt, mit dem Ziel, ein für Propionsäurebakterien spezifisches Replikon zu erhalten. Die Länge der gesamten Sequenz von pLME106 beträgt 6868 Basenpaare (bp) und der G+C Gehalt ist 65%. Zehn offene Leseraster (ORF) wurden identifiziert. Mindestens zwei ORFs sind an der Replikation beteiligt, welche Homologien zu den Replikationsproteinen des Plasmids pLIM aus einem *Brevibacterium linens* Stamm aufwiesen. Demnach ist ein Theta-Replikationssystem für die Replikation von pLME106 verantwortlich. Der Replikationsursprung wird mindestens 500 bp vor den Replikationsgenen vermutet. Mit dem Gen *ppnA*, welches für Propionicin SM1 codiert, konnte die erste Funktion auf einem Propionsäurebakterien-Plasmid identifiziert werden. Homologien wurden auch gefunden von ORF6 zu einer Invertase, die auf einem Plasmid codiert ist, welches aus einem *Rhodococcus* Stamm isoliert worden ist. Für die Mehrheit der übrigen Gene wurden Ähnlichkeiten zu Genen auf Plasmiden aus *Corynebacterium*-, *Brevibacterium*-, *Rhodococcus*- und *Mycobacterium* Stämmen entdeckt. All diese Bakteriengattungen gehören zur Gruppe der Bakterien mit einem hohen G+C Gehalt der Klasse *Actinobacteria*.

Die Resultate von pLME106 und pLME108, einem Plasmid aus *Propionibacterium freudenreichii*, welches in unserem Labor früher isoliert und untersucht worden war, boten nun optimale Voraussetzungen, um die in dieser Arbeit gestellte Aufgabe erfüllen zu können. Bei der Konstruktion von Vektoren wurde darauf geachtet, dass der Replikationsursprung nicht beschädigt wurde, indem die Selektionsmarker sowie die *E. coli*-Vektoren an diversen Stellen in die *Propionibacterium* Plasmide eingebaut wurden. Auch stellte sich die Wahl eines geeigneten Selektionsmarkers als ausserordentlich wichtig heraus. Das *cat* Gen aus *Staphylococcus aureus* mit einem tiefen G+C Gehalt, sowie das *tet(W)* Gen aus einem *Bifidobacterium* Stamm mit einem höheren G+C Gehalt kamen bei unseren ersten Vektor-Konstruktionen zum Einsatz. Die Transformation sowohl von Propionsäurebakterien als auch von Corynebakterien funktionierte mit diesen Vektoren jedoch nicht. Schliesslich gelang es

uns, drei effiziente und stabile *Propionibacterium-E. coli* Pendelvektoren zu konstruieren. Sie alle enthalten als Selektionsmarker *cmx(A)*, ein Gen von hohem G+C Gehalt, welches ein Chloramphenicol-Efflux-Protein codiert und von Plasmid pTP10 aus *Corynebacterium striatum* stammt. Der Vektor pMPS1 basiert auf Plasmid pLME106 und ist 8.2 kb gross. Die Vektoren pAMT1 und pAMT2 sind beide 6.3 kb gross und basieren auf pLME108. Als höchste Hürde, welche bei der Transformation von *P. freudenreichii freudenreichii* DSM20271^T zu meistern war, stellte sich das Restriktions- und Modifikationssystem dieses Stammes heraus. Wenn aus *E. coli* isolierte Vektoren-DNA für die Transformation verwendet wurde, so wurden 10^0 - 10^3 Transformanten pro μg eingesetzte DNA erhalten. Wurde hingegen Vektoren-DNA eingesetzt, die aus einem *Propionibacterium* Transformanten stammte, so wurden Transformationseffizienzen von 10^7 - 10^9 Transformanten pro μg DNA erreicht. Die drei Vektoren waren stabil in den *Propionibacterium* Transformanten, aber offensichtlich wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der Transformanten auf festem Medium herabgesetzt.

Die Plasmid-Konstruktion pMPS9, welche sich von pMPS1 nur in Bezug auf die Orientierung des *cmx(A)* Gens unterscheidet, wurde vom Empfängerstamm partiell abgebaut. Es wurden zwar immer noch Chloramphenicol-resistente *Propionibacterium* Transformanten erhalten, aber die degenerierten Plasmide hatten zumindest den *E. coli* spezifischen Anteil von pUC18 verloren. Das untersuchte Plasmid pMPS9-D1 konnte nur als Vektor für *Propionibacterium* eingesetzt werden, war jedoch nicht sehr stabil. Diese Erkenntnis, sowie Deletionsexperimente mit den erfolgreichen Vektoren pMPS1 und pAMT1 zeigten, dass die Replikone der *Propionibacterium* Plasmide pLME106 und pLME108 in den *Propionibacterium*-Transformanten repliziert wurden, nicht jedoch in *E. coli*.

Beim Versuch noch andere Funktionen zu entdecken, die auf Plasmiden aus Propionisäurebakterien codiert sein könnten, konnten wir die rote oder orange Farbe von einigen *P. jensenii* Stämmen nicht auf die Präsenz von Plasmiden zurückführen. Dafür entdeckten wir, dass die rote oder orange Farbe dieser Stämme positiv im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur β -Hämolyse stand.