

University of Groningen

Replication and maintenance of plasmids in *Bacillus subtilis*

Meijer, Wilhelmus Johannes Jozef

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1995

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Meijer, W. J. J. (1995). *Replication and maintenance of plasmids in Bacillus subtilis*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter X

Summary and general discussion

Summary and general discussion

Plasmids and their derived gene cloning and expression vectors play a prominent role in almost all areas of molecular genetics. A disadvantage, however, is the frequently observed high level of instability of plasmids, especially when they contain heterologous DNA. Two types of instability can be distinguished: structural and segregational instability. Structural instability refers to DNA rearrangements that result in structural alteration of the plasmid, mostly deletions. Segregational instability refers to the loss of the entire plasmid population from the cell under non-selective growth conditions. A major aim of the studies described in this thesis is to increase the understanding of the factors underlying segregational plasmid instability. For several reasons these studies were mainly performed in the Gram positive bacterium *Bacillus subtilis*. First, because *B. subtilis* is easily amenable to genetic analysis it is the best studied Gram positive prokaryote. Second, *B. subtilis* is a representative of an industrially important genus which is extensively used in fermentation processes. And third, *B. subtilis* is regarded as a non-pathogenic bacterium.

Faithful plasmid replication is a prerequisite for segregational plasmid stability. Therefore, a considerable part of this thesis deals with studies on plasmid replication in *B. subtilis*. Two plasmid replication mechanisms have been identified: (i), rolling-circle mechanism (RCM); and (ii), theta mechanism (TM). Whereas RCM is used by most small plasmids (< ~ 12 kb), all known larger plasmids replicate by the TM of replication. A major distinction between both types of replication is the generation of single stranded (ss) DNA replication intermediates

by the RCM only. Both types of replication mechanisms, and their relation to segregational plasmid stability, have been studied.

Chapter I of this thesis reviews (i) the current knowledge of the two known mechanisms of plasmid replication, (ii) additional systems that contribute to the stable inheritance of plasmids, and (iii) known factors causing segregational plasmid instability. In addition, this chapter specifically summarizes the current knowledge of *Bacillus* plasmids.

Whereas in chapter II through VII studies are described concerning plasmids that replicate according to the RCM, chapters VIII and IX describe studies concerning the *B. subtilis* theta plasmid pLS20.

Efficient conversion of ssDNA replication intermediates generated by RCM plasmids is initiated at specific plasmid regions that are characterized by their potential to form secondary structures. These regions are called single strand origins (SSOs). Although many RCM plasmids can replicate in several hosts, usually their SSO is functional only in their original host. The absence of a functional SSO causes inefficient ssDNA conversion which can affect segregational plasmid stability. In contrast to other RCM plasmids the broad host-range plasmid pMV158 carries two SSOs, one of the palA type and the other of the palU type. Plasmid pMV158 and derivatives thereof were used to study the functionality of the two SSOs in the Gram positive bacteria *Lactococcus lactis* (Chapter II) and *B. subtilis* (Chapter III). Whereas palA was shown to be

functional only in *L.lactis*, *palU* was functional in both species tested. In both organisms, accumulation of high amounts of ssDNA caused a severe decrease in plasmid maintenance, emphasizing the importance of a functional SSO for stable maintenance of RCM plasmids.

Interestingly, it was observed that pMV158 derivatives lacking a functional SSO accumulated far higher amounts of ssDNA in *B.subtilis* *recA* mutant strains than in isogenic wild type *recA* strains. This indicates that the *RecA* protein is involved in an alternative SSO-independent ssDNA conversion route of ss pMV158 DNA molecules. In Chapter IV studies are described concerning the analysis of this alternative ssDNA conversion pathway. In addition to *RecA*, the presence of a plasmid region encoding a small RNA transcript which is complementary to the ssDNA plasmid intermediates, drastically reduced ssDNA accumulation. These results indicate that *RecA* and the complementary RNA are involved in the alternative ssDNA conversion route. A model is proposed for this pathway, in which small RNA transcripts anneal to complementary ssDNA molecules in a *RecA*-stimulated way, resulting in the formation of an initiation complex for lagging strand synthesis.

In chapter V the construction and use of a special-purpose vector, pWM100, is described for the cloning of SSOs present on a set of representative *B.subtilis* RCM plasmids. These studies revealed that the SSOs of the RCM plasmids tested, and probably all other *B.subtilis* RCM plasmids, belong to two related families, denoted *palT1* and *palT2*. Both families of SSOs are highly efficient ssDNA conversion signals in *B.subtilis*.

Chapter VI describes the identification and characterization of a new structural module present on the cryptic *B.subtilis* plasmids pTA1015 and pTA1040. This module comprises two genes, one encoding a putative export protein and the

other encoding a functional type I signal peptidase.

Chapter VII reports the complete sequence determination of three cryptic *B.subtilis* RCM plasmids, pTA1015 (5.8 kb), pTA1040 (7.7 kb) and pTA1060 (8.7 kb) and the analysis of several of the identified genes. A major conclusion from these studies is that all three plasmids tested contain, in addition to the typical modules present on RCM plasmids, additional genes some of which are homologous to genes present on the *B.subtilis* chromosome.

Chapters VIII and IX describe studies concerning the endogenous *B.subtilis* theta plasmid pLS20. Chapter VIII describes the cloning, sequencing and characterization of the replicon of pLS20. The results revealed that the replication region of pLS20 does not encode a typical replication initiator protein and that replication is independent of the host encoded *Poll* protein. Together, these results indicate that pLS20 belongs to a new class of theta replicons. Chapter IX describes the identification and characterization of a new type of replication terminator which is located just outside of the replication region of pLS20. Especially two features of this replication terminator are novel: (i), it is the first replication terminator identified on a Gram positive plasmid; and (ii), it is the first bidirectionally functional replication terminator.

It has become evident that endogenous RCM plasmids are superior over non-native RCM plasmids regarding their segregational stability. Most likely, the superiority is the consequence of optimal adaptation of endogenous plasmids to their hosts. Apparently, the two related *palT* type SSOs are optimally adapted for *B.subtilis*, ensuring efficient conversion of the ssDNA replication intermediates which is shown to be a prerequisite for stable plasmid maintenance.

Summary

Theta replicating plasmids usually have superior structural stability and cloning properties compared to RCM plasmids. Like the RCM plasmids, it was expected that endogenous *B.subtilis* theta plasmids are adapted optimally to their host. This was a major argument to initiate the studies concerning pLS20. In contrast to the intact pLS20 plasmid the derived minireplicons are maintained unstably. This indicates that pLS20 contains stability functions located outside the region sufficient for replication. One of the obvious goals remaining is to clone and identify the putative stability system(s) present on pLS20.

Samenvatting en algemene discussie

Plasmiden komen voor in vele soorten bacteriën. Het zijn circulaire DNA moleculen die zich onafhankelijk van het chromosoom kunnen handhaven binnen een cel. Natuurlijk voorkomende plasmiden vormen de basis van klonerings en expressie vectoren gebruikt in de biotechnologie. Een nadeel is dat deze vectoren vaak een hoge mate van instabiliteit vertonen, met name wanneer ze heterologe DNA sequenties bevatten. Twee typen plasmide instabiliteit worden onderscheiden: structurele en segregatieve instabiliteit. Met structurele instabiliteit wordt herrangschikking van DNA aangeduid die leidt tot een structurele verandering van het plasmide, meestal waargenomen als deleties. Met segregatieve instabiliteit wordt het verloren gaan van de gehele plasmide populatie van een cel onder niet selectieve groei condities bedoeld. Een belangrijke doelstelling van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was een beter inzicht te verkrijgen in de factoren die ten grondslag liggen aan segregatieve plasmide instabiliteit. Het onderzoek werd voornamelijk uitgevoerd in de Gram positieve bacterie *Bacillus subtilis* vanwege de volgende redenen. Ten eerste, *B. subtilis* is een genetisch makkelijk te hanteren bacterie; dit organisme is in feite de best bestudeerde Gram positieve bacterie. Ten tweede is *B. subtilis* is een vertegenwoordiger van een industrieel belangrijk bacterieel geslacht, waarvan de leden veelvuldig worden gebruikt voor fermentatie processen. En ten derde, *B. subtilis* is een niet-pathogeen voor mens, dier en plant.

Stabiele plasmide handhaving vereist optimale plasmide replicatie. Vandaar dat onderzoek over plasmide replicatie in *B. subtilis* een aanzienlijk deel van dit proefschrift in beslag neemt. Twee verschillende mechanismen van plasmide replicatie zijn tot dusver waargenomen: (i) rolling circle mechanisme (RCM); en (ii) theta mechanisme (TM). Terwijl de meeste kleine plasmiden (< ~ 12 kb) repliceren via het RCM, repliceren alle bekende grotere plasmiden via het TM. Het RCM onderscheidt zich van het TM door de productie van enkelstrengs (es) DNA replicatie intermediären. Beide typen van replicatie mechanismen, en hun belang voor segregatieve stabiliteit zijn bestudeerd.

Hoofdstuk I van dit proefschrift beschrijft (i) de tot nu toe bekende aspecten van beide replicatiemechanismen, (ii) de additionele systemen die bijdragen aan stabiele plasmide handhaving, en (iii) de bekende factoren die leiden tot segregatieve plasmide instabiliteit. Bovendien geeft het een beknopte samenvatting van de huidige kennis van specifiek de *Bacillus* plasmiden.

Terwijl hoofdstuk II tot en met VII onderzoek betreft van plasmiden die repliceren via het RCM, worden in hoofdstuk VIII en IX de resultaten beschreven die met het *B. subtilis* theta replicerende plasmide pLS20 zijn verkregen.

Efficiënte omzetting van de esDNA replicatie intermediären, gegenereerd door RCM plasmiden, begint op specifieke gebieden van het plasmide die worden gekenmerkt door de mogelijkheid om secundaire structuren te vormen. Deze gebieden worden Single Strand Origins (SSOs) genoemd. Tenminste drie verschillende groepen van SSO kunnen worden onderscheiden op grond van DNA

sequentie homologieën. Hoewel vele RCM plasmiden kunnen repliceren in verschillende gastheren, is hun SSO meestal alleen functioneel in de oorspronkelijke gastheer. De afwezigheid van een functionele SSO leidt tot inefficiënte esDNA conversie die de stabiele handhaving van het plasmide in negatieve zin kan beïnvloeden. Het natuurlijk voorkomende plasmide pMV158 kan repliceren in een groot aantal gastheren. Dit plasmide onderscheidt zich van andere RCM plasmiden door de aanwezigheid van twee SSOs. Eén van de SSOs is van het palA-type de andere van het palU-type. Plasmide pMV158 en afgeleiden hiervan zijn gebruikt om de functionaliteit van beide SSOs te bepalen in de Gram positieve bacteriën *Lactococcus lactis* (hoofdstuk II) en *B.subtilis* (hoofdstuk III). Terwijl palA alleen functioneel bleek te zijn in *L.lactis*, was palU functioneel in beide organismen. Opeenhoping van grote hoeveelheden esDNA in de cel, leidde in beide organismen tot een sterke daling van de segregatieve stabiliteit van het plasmide. Deze resultaten onderstrepen het belang van de aanwezigheid van een functionele SSO voor de stabiele handhaving van RCM plasmiden.

Een interessante waarneming was dat pMV158 afgeleiden zonder functionele SSO, veel meer esDNA accumuleren in *B.subtilis recA* mutanten dan in isogene wild type *recA* stammen. Dit duidt erop dat het RecA eiwit betrokken is bij een alternatieve, SSO-onafhankelijke, esDNA omzettingroute van es pMV158 DNA moleculen. De analyse van deze alternatieve esDNA omzettingroute is beschreven in hoofdstuk IV. Behalve RecA bleek ook de aanwezigheid van een plasmide gebied, coderend voor een klein RNA transcript dat complementair is aan de esDNA plasmide intermediären, van grote invloed op de hoeveelheid geaccumuleerd esDNA. Deze resultaten hebben geleid tot een model voor de alternatieve esDNA

omzettingroute. In dit model, gepresenteerd in hoofdstuk IV, worden kleine RNA transcripten, via een RecA gemiddelde route gehybridiseerd op het esDNA, hetgeen resulteert in een initiatie complex voor de synthese van de ontbrekende DNA streng.

In hoofdstuk V is de constructie en het gebruik beschreven van de vector pWM100 die specifiek is ontworpen voor het kloneren en analyseren van SSOs. Met behulp van deze vector zijn de SSOs onderzocht van een set representatieve *B.subtilis* RCM plasmiden. De SSOs van de zes onderzochte RCM plasmiden, en de SSOs van waarschijnlijk alle andere *B.subtilis* RCM plasmiden, behoren tot twee verwante families die palT1 en palT2 zijn genoemd. Beide SSO families bleken zeer efficiënte esDNA omzettingssignalen in *B.subtilis* te zijn.

Hoofdstuk VI beschrijft de identificatie en karakterisatie van een nieuwe structurele module aanwezig op de cryptische *B.subtilis* plasmiden pTA1015 en pTA1040. Deze module bestaat uit twee genen. Eén gen specificeert een mogelijk export eiwit, het andere een functioneel type I signaal peptidase eiwit.

Hoofdstuk VII geeft de complete DNA sequentie van drie cryptische *B.subtilis* RCM plasmiden, pTA1015 (5.8 kb), pTA1040 (7.7 kb) and pTA1060 (8.7 kb), alsmede de analyse van verscheidene van de geïdentificeerde genen. Een belangrijke conclusie uit dit onderzoek is, dat naast de aanwezigheid van typische RCM modulen, alle drie onderzochte plasmiden additionele genen bevatten waarvan sommige een hoge mate van homologie vertonen met genen aanwezig op het chromosoom van *B.subtilis*.

Hoofdstuk VIII en IX beschrijven de analyse van het *B.subtilis* theta plasmide pLS20. Hoofdstuk VIII beschrijft de klonering, de sequentie bepaling en de karakterisering van het replicon van pLS20. In tegenstelling tot de meeste andere theta

plasmiden specificeert het minimale replicon van pLS20 geen typisch replicatie-initiatie eiwit. Bovendien is pLS20 replicatie onafhankelijk van de gastheer DNA polymerase I (PolI). Tesaamen duiden deze resultaten erop dat pLS20 behoort tot een nieuwe klasse van theta plasmiden. Hoofdstuk IX beschrijft de identificatie en karakterisatie van een nieuw type replicatie terminator die is gelocaliseerd op pLS20 vlak naast het gebied dat nodig is voor autonome replicatie. Met name twee eigenschappen van deze replicatie terminator, TerLS20, zijn nieuw: (i) het is de eerste replicatie terminator die is geïdentificeerd op een Gram positief plasmide, en (ii) in tegenstelling tot alle andere bekende prokaryote replicatie terminatoren is TerLS20 bidirectioneel functioneel.

Het is intussen duidelijk geworden dat natieve RCM plasmiden superieur zijn ten opzichte van niet natieve RCM plasmiden ten aanzien van hun segregatieve stabiliteit. Zeer waarschijnlijk is dit het gevolg van een optimale aanpassing van de endogene plasmiden aan hun gastheer. Klaarblijkelijk zijn ook de twee gerelateerde palT type SSO's optimaal aangepast aan *B.subtilis*, en verzekeren ze op die manier een efficiënte omzetting van de esDNA replicatie intermediären, essentieel voor stabiele plasmide handhaving. Theta replicerende plasmiden zijn structureel veelal stabiel en hebben betere klonerings eigenschappen dan RCM plasmiden. Evenals het geval is voor RCM plasmiden mag worden verwacht dat endogene *B.subtilis* theta plasmiden eveneens optimaal zijn aangepast aan hun gastheer en daardoor superieur zijn aan niet-natieve theta plasmiden. Dit was één van de belangrijkste redenen om pLS20 in het onderzoek te betrekken. De afgeleide miniplasmiden van pLS20 worden, in tegenstelling tot het intacte pLS20 plasmide, instabiel gehandhaafd onder niet selectieve groei omstandigheden. Dit doet

veronderstellen dat pLS20 stabiliteits-functies bevat die gelegen zijn buiten het replicatiegebied. Eén van de overblijvende onderzoeksdoelen is het kloneren en identificeren van deze mogelijke stabiliteitssystemen van pLS20.

