

University of Groningen

Functional analysis of circular and linear bacteriocins of Gram-positive bacteria

Kemperman, Robèr Antoine

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:

2005

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

Citation for published version (APA):

Kemperman, R. A. (2005). *Functional analysis of circular and linear bacteriocins of Gram-positive bacteria*. 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 6

Summary & general discussion.

Samenvatting & algemene discussie.

SUMMARY & GENERAL DISCUSSION

Preservation methods such as drying and fermenting to store food products for longer periods of time have been used for centuries. Nowadays, people desire fresh and minimally processed food, to be prepared with minimal cooking. This sets new targets for the food industry, as such products can only contain a minimum of additives and at the same time need to have a shelf life that provides optimal consumer safety. One approach to accomplish this could be the addition of biological preservatives such as bacteriocins. Bacteriocins are antimicrobial peptides produced by bacteria that can kill or inhibit other bacteria. A few bacteriocins have already reached the stage of industrial application e.g. nisin and pediocin. New bacteriocins are identified on a regular basis and are studied to determine if they have novel properties that would make them desirable as preservative. Properties which are used to judge the effectiveness of bacteriocins as preservative are activity level, activity spectrum, biostability, and bioavailability.

Chapter one presents an overview of the known anti-microbial peptides produced by bacteria. Genome organization, action mechanism, bacteriocin immunity by the producer and bacteriocin resistance are discussed.

Chapter two describes the effects of amino acid changes on the activity of pediocin PA-1, produced by *Pediococcus acidilactici*. An inducible gene expression system for the production of pediocin PA-1 mutants with altered bactericidal activities was developed in *Lactococcus lactis*. In a twin-plasmid system the expression of the pediocin structural gene was effectively uncoupled from the genes that encode the pediocin secretion machinery. The secretion machinery (encoded by the *pedC* and *pedD* genes) is expressed under the control of a NaCl-inducible promoter. The effects on bacteriocin activity of amino acid changes at certain positions in the pediocin PA-1 molecule are discussed. Replacing the alanine residue at position 34 in pediocin PA-1 by a positively or negatively charged residue strongly reduces bacteriocin activity. Changing the aspartic acid residue at position 17 alters target cell specificity.

Chapter three describes the purification and (partial) amino acid sequencing of two novel antibacterial peptides which are active against the cheese spoilage bacterium *Clostridium tyrobutyricum*: closticin 574 and circularin A produced by *C. tyrobutyricum* ADRIAT 932 and *C. beijerinckii* ATCC 25752, respectively. Based on the obtained amino acid sequences the structural genes encoding closticin 574 and circularin A were identified. Closticin 574 is synthesized as a pre-proprotein of 309 amino acids that is possibly secreted via the general secretion pathway. After secretion it is likely to be hydrolyzed at an Asp-Pro site yielding a mature antimicrobial peptide of 82 amino acid residues. Circularin A is produced as a prepeptide of 72 amino acids. Cleavage between the third and fourth amino acid followed by a head-to-tail ligation between the

resulting N- terminus and C-terminus creates a circular antimicrobial peptide (Fig. 1). The occurrence of circular proteins is rare but not unprecedented: Enterocin AS-48, a homologue of circularin A produced by *Enterococcus faecalis* S-48 is also cyclic. Other examples of circular proteins are cyclotides (plant defense peptides) (1), the pilus proteins TrbC (*Escherichia coli*) and VirB2 (*Agrobacterium tumefaciens*) (2).

The identification of genes involved in the production of circularin A is described in Chapter four. Flanking the circularin A structural gene, a region of 12 kb containing 12 putative genes was identified and sequenced (Fig. 1). Genes in this region are organized in overlapping open reading frames, which is indicative of translational coupling. Upon heterologous expression of circularin A in *E. faecalis*, five genes, i.e. *cirABCDE*, were identified to be minimally required for bacteriocin production and secretion. *CirA* is the structural gene and *cirE* confers immunity towards circularin A. *CirBD* is the putative transporter, which also confers partial resistance, and *CirC* putatively harbors the circularization activity, either alone or in concert with *CirBD*. Deletion of either of the three genes *cirBCD* prevents bacteriocin production. Upstream of *cirA*, four genes are present: *cfgRK* encode a two-component system, *cfg01* encodes a protein with homology to *AgrB*, a membrane protein involved in post-translational modification of an auto-inducing quorum-sensing peptide (6) and *cfg02* encodes a protein lacking any homology with proteins in the available databases. Downstream of the minimal region three genes (*cirGHI*) were identified, of which the function has not yet been clarified. Homologues (*BacGHI*) of the encoded proteins *CirGHI* are involved in increasing the expression of enterocin AS-48 (4), while other homologues (*LolCDE*) are involved in removing lipid-modified proteins from the membrane of *E. coli* (5). Heterologous expression of circularin A was initially attempted in *L. lactis* but this proved to be unsuccessful due to a deleterious effect of *cirB*. When *cirB* is omitted from the minimally required region the remainder can be introduced in *L. lactis*, but as expected, does not lead to circularin A production in this host.

Other novel putative circular bacteriocins are described in Chapter 5. This was achieved by surveying genome databases for translation products with homology to *CirC*. *CirC* was used instead of *CirA*, as small peptides are less likely to yield homologies and have a tendency to be under-estimated in automatically annotated genome sequences, depending on the ORF-size cutoff used in the annotation procedure. Three novel bacteriocin coding regions were identified on the basis of *CirC* homologs and subsequent studies of the chromosomal region: one in each of four *Staphylococcus aureus* strains (Mu50, N315, MW2 and 467), one in the chromosome of *Geobacillus stearothermophilus* DSM13240 and one in the chromosome of *Oenococcus oeni* PSU-1. Functions of genes in these regions are assigned on the basis of homologies of the encoded proteins to those in the *CirA* encoding region. The

probable head-to-tail ligation sites of the novel putative bacteriocins are predicted on the basis of homology to known circular bacteriocins.

A working model

Based on the presented results a working model for circularin A production is proposed (Fig. 1). Information on the possible function of proteins encoded by genes outside the minimal bacteriocin region is limited but homology to known biological systems was used to build the model.

Based on the homology of Cfg01 to AgrB and the presence of a two-component system in the vicinity of the structural bacteriocin gene, a fact that often is noticed in bacteriocin coding regions, circularin A expression is proposed to be regulated as follows. Cfg02, the hypothetical precursor for a signaling peptide, is processed and secreted by Cfg01 to yield a mature signaling peptide activating the two component system CfgRK by binding to CfgK (Fig. 1).

In this model, the CirA precursor peptide is thought to be secreted by CirBD and circularized by CirC either separately or together with CirBD. CirE confers immunity to the bacteriocin-producing cell. CirE is thought to act outside of the cell based on its structural homology to Pepl, the immunity protein for the non-circular bacteriocin pep5 (3). Circularin A has a charge distribution that is similar to many other bacteriocins suggesting that the circularin A mode of action is similar to that of many bacteriocins, namely receptor-facilitated pore formation. The mechanism of immunity, unknown for Pep5 and many other immunity proteins, provided by CirE could perhaps be receptor shielding or blockage of pore formation by CirA. The homology of CirGHI to LolCDE suggests that these proteins could be involved in removal of the produced bacteriocin from the cytoplasmic membrane. Bacteriocins such as circularin A have, just as the lipid-modified proteins secreted by LolCDE, affinity for membranes. Removal of bacteriocins from the membrane could reduce the exposure of the producer cell to its own bacteriocin and allow it to produce higher levels of bacteriocin. Indeed, a decrease in enterocin AS-48 production is observed when the CirGHI homologues BacGHI are deleted (4). Alternatively, CirGHI could be involved in removing the immunity protein from the membrane, making it more readily available. This would increase immunity, allowing for higher production levels (Fig. 1). The immunity protein has two predicted transmembrane helices and, most probably, has affinity for the cytoplasmic membrane. The working mechanism behind the resistance provided by CirBD is probably the removal of the mature bacteriocin from the membrane.

An interesting challenge for future work is to confirm or disprove aspects of the working model presented here and elucidate in particular the mode of action of CirA, the mechanism behind immunity, the regulation of CirA production and secretion and, most definitely, the bacteriocin circularization mechanism.

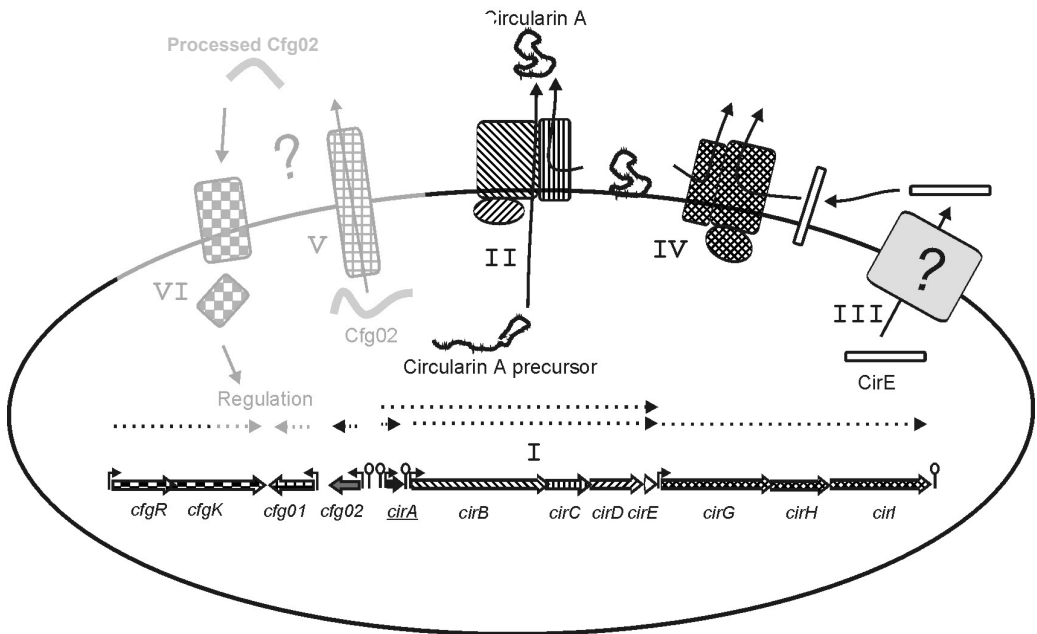


Figure 1: Hypothetical model for circularin A production, immunity and regulation. Proteins and corresponding genes are shaded identically except for CirA and Cfg02. The CirA structural gene is underlined. I), Transcription of genes encoding the circularin A production machinery; genes are indicated by thick arrows, lollipops indicate regions of dyad-symmetry, thin arrows are putative promoter sites and dotted arrows represent putative transcription products. II), Secretion and circularization of circularin A. III), Secretion of CirE by an unknown pathway. IV), Increased immunity by pumping out of a peptide with membrane affinity, circularin A and/or CirE. V), Processing and secretion of the precursor signaling peptide Cfg02 by Cfg01. VI), Regulation of gene expression through binding of Cfg02 to CfgK.

Figuur 1: Hypothesisch model van circularin A productie, immuniteit en regulatie. Eiwitten en de corresponderende genen hebben een identiek patroon behalve CirA en Cfg02. Het CirA structurele gen is onderstreept. I), Transcriptie van genen die coderen voor de circularin A productie; genen zijn aangeduid met breede pijlen, gebieden met dyad-symmetrie worden weergegeven door lollies, smalle pijlen zijn mogelijke promotor gebieden en gestippelde pijlen geven mogelijke translatie producten weer. II), Secretie en circularisatie van circularin A. III), Secretie van CirE langs een onbekende route. IV), Verhoogde immuniteit door het verwijderen van een peptide met membraan affiniteit, circularin A en/of CirE. V), Modificatie en secretie van het signal peptide Cfg02 door Cfg01. VI), Regulatie van gen expressie door binding van Cfg02 aan CfgK.

SAMENVATTING & ALGEMENE DISCUSSIE

Conserverings methoden zoals drogen en fermenteren worden al sinds mensenheugenis gebruikt. Vandaag de dag verlangt men verse kant-en-klaar maaltijden die snel klaar te maken zijn. Dit is een nieuwe uitdaging voor de voedingmiddelenindustrie omdat dit soort producten slechts weinig conserveringsmiddelen mogen bevatten en tegelijkertijd een houdbaarheid moeten hebben die het gemak van de consument dient. Eén manier om dit te bereiken is het toevoegen van biologische conserveringsmiddelen zoals bacteriocines. Bacteriocines zijn antibacteriële peptiden die geproduceerd worden door bacteriën en die de groei van andere bacteriën remmen of die andere bacteriën doden. Enkele bacteriocines worden nu al gebruikt als conserveringsmiddel in voedsel bv. nisine en pediocine. Nieuwe bacteriocines worden met een zekere regelmaat geïdentificeerd en zijn het onderwerp van verdere studie om te bepalen of zij nuttige eigenschappen hebben waardoor ze als conserveringsmiddel in aanmerking zonder kunnen komen. Eigenschappen waar het daarbij omgaat zijn dan het activiteitsniveau, activiteitsspectrum, de stabiliteit en de beschikbaarheid van het peptide.

Hoofdstuk één geeft een overzicht van de anti-bacteriële peptiden die door bacteriën geproduceerd worden. De organisatie van de genen, het werkingsmechanisme, de producer immuniteit en resistentie tegen het bacteriocine zijn onderwerpen die aan bod komen.

In hoofdstuk twee wordt beschreven wat het effect is van aminozuur substituties in pediocine PA-1, een bacteriocine geproduceerd door *Pediococcus acidilactici*. Een induceerbaar gen-expressiesysteem is ontwikkeld voor de expressie van pediocine PA-1 mutanten in *Lactococcus lactis*. Met behulp van twee plasmiden is de expressie van het structurele pediocine gen losgekoppeld van de genen die coderen voor het secretie apparaat (*pedC* en *pedD*). De genen voor dit secretie apparaat zijn gekloneerd achter een zout-induceerbare promotor zodat de expressie gereguleerd kan worden. De effecten van veranderingen in de aminozuurvolgorde van pediocin PA-1 op bepaalde posities wordt besproken. Als de alanine op positie 34 van pediocine PA-1 vervangen wordt door een positief of negatief geladen aminozuur dan verliest het bacteriocine een groot deel van zijn activiteit. Het veranderen van de aspartaat op positie 17 verandert de specificiteit van het bacteriocine.

In hoofdstuk drie wordt beschreven hoe twee nieuwe bacteriocines zijn gezuiverd en hoe een gedeeltelijke aminozuursequentie is bepaald. De twee gezuiverde bacteriocines, closticin 574 gemaakt door *Clostridium tyrobutyricum* ADRIAT 932 en circularin A geproduceerd door *C. beijerinckii* ATCC 25752, zijn actief tegen *C. tyrobutyricum*, een bacterie die verantwoordelijk is voor kaasbederf in de vorm van boterzuurgisting. Op basis van de gedeeltelijke aminozuursequentie is de volgorde van

de bijbehorende genen bepaald. Closticin 574 wordt geproduceerd als een pre-pro-eiwit van 309 aminozuren dat mogelijkgevoors gesecreteerd wordt via de algemene Secretieroute. Na secretie wordt het waarschijnlijk gehydrolyseerd bij een Asp-Pro binding waarbij het mature anti-microbiële peptide van 82 aminozuren vrijkomt. Circularin A wordt geproduceerd als een prepeptide van 72 aminozuren. Het mature bacteriocine van 69 aminozuren wordt gevormd na verwijdering van drie N-terminale aminozuren en ligatie tussen de resulterende N- en C-terminus. Circulaire eiwitten zijn zeldzaam maar dit is niet de eerste keer dat een circulair eiwit beschreven is. Enterocin AS-48, geproduceerd door *Enterococcus faecalis* S-48, is ook een cyclisch bacteriocine en de cyclotiden (anti-bacteriële eiwitten van plantaardige afkomst), het pilus eiwit TrbC (*Escherichia coli*) en VirB2 (*Agrobacterium tumefaciens*) zijn ook voorbeelden van circulaire eiwitten.

In hoofdstuk vier wordt de indentificatie van de genen die betrokken zijn bij circularin A productie beschreven. Rondom het circularin A structurele gen is de sequentie bepaald van in totaal 12 kb aan DNA. Deze regio bevat 12 gedeeltelijk overlappende genen. De overlap duidt op de mogelijkheid van gekoppelde genexpressie. Voor bacteriocine productie in *E. faecalis* zijn vijf van de twaalf genen noodzakelijk (*cirABCDE*). *CirA* is het structurele gen en *cirE* geeft immuniteit aan de producerende cel. *CirBD* is zeer waarschijnlijk de transporter, die voor een deel ook resistentie tegen *CirA* geeft. *CirC* is zeer waarschijnlijk, alleen of samen met *CirBD*, verantwoordelijk voor de circularizatie van het bacteriocine. Deletie van één van de drie genen *cirBCD* zorgt ervoor dat er geen bacteriocine geproduceerd wordt. Aan de stroomopwaarts van *cirA* zijn vier genen geïdentificeerd: *cfgRK* codeert voor een twee-componenten system, *cfg01* codeert voor een eiwit met homologie met *AgrB*, een membraaneiwit dat betrokken is bij de modificatie van een auto-inducerend quorumsensing peptide, en *cfg02* dat codeert voor een eiwit zonder enige homologie met andere eiwitten. Stroomafwaarts van *cirE* zijn nog drie genen geïdentificeerd (*cirGHI*) waarvan de functie nog niet bekend is. Homologen (BacGHI) van de eiwitten die door die drie genen gecodeerd worden verhogen de expressie van enterocin AS-48 terwijl andere homologe eiwitten (LoICDE) lipide gemodificeerde eiwitten uit de membraan van *E. coli* halen. Expressie van circularin A in *Lactococcus lactis* lukt niet naar later bleek tengevolge van *cirB*. Als *cirB* uit de minimale bacteriocine regio wordt gelaten dan kan de rest (*cirACDE*) in *L. lactis* worden gekloneerd zonder dat dit overigens leidt tot productie van actief bacteriocine, natuurlijk.

Andere nieuwe en mogelijk circulaire bacteriocines worden beschreven in hoofdstuk 5. In genoom databanken werd gezocht naar eiwitten die homologo zijn aan *CirC*. *CirC* werd gebruikt inplaats van *CirA* omdat kleine peptiden zoals *CirA* minder snel een positief resultaat opleveren en omdat kleine peptiden, afhankelijk van de gekozen minimale ORF grootte, ondervertegenwoordigd zijn in automatisch

geannoteerde genomen. Op basis van homologie met CirC en chromosomale overeenkomsten, zijn drie nieuwe bacteriocine coderende regio's geïdentificeerd: in het genoom van *Staphylococcus aureus* (stammen Mu50, N315, MW2 en 467), in dat van *Geobacillus stearothermophilus* DSM13240 en in het genoom van *Oenococcus oeni* PSU-1. De functies van de genen in de verschillende gebieden zijn toegekend op basis van homologie van de gespecificeerde eiwitten met de eiwitten gecodeerd door de *cirA* regio. De mogelijke ligatieplaatsen van N- en C-termini zijn voorspeld op basis van de homologie tussen de circulaire bacteriocines.

Een hypothetisch model

Op basis van de resultaten kan een werkmodel gemaakt worden dat de productie van circularin A beschrijft (Fig. 1). De informatie over de mogelijke functie van eiwitten die gecodeerd worden door genen die buiten het minimale bacteriocine specificerende gebied liggen is beperkt maar de homologie met bekende biologische systemen is gebruikt om het model op te zetten.

Op basis van de homologie tussen Cfh01 en AgrB, in combinatie met de aanwezigheid van een twee-componenten systeem, systemen die regelmatig betrokken zijn bij bacteriocine genexpressie, wordt de expressie van circularin A mogelijk als volgt geregeld. Cfg02 wordt gemodificeerd en gesecreteerd door Cfg01. Het mature Cfg02 activeert door binding aan CfgK het twee-componenten systeem. Vervolgens wordt *cirA* tot expressie gebracht. Het CirA pro-eiwit wordt door CirBD gesecreteerd en door CirC, alleen of samen met CirBD, gecirculariseerd nadat N-terminaal 3 aminozuren zijn afgeknipt. Op basis van de structurele homologie tussen CirE en Peps, het eiwit dat immuniteit geeft tegen het bacteriocin pep5, wordt verwacht dat CirE buiten de cel actief is. Circularin A heeft een ladingsverdeling over het molecuul die vergelijkbaar is met de ladingsverdeling over andere bacteriocines. Dit suggereert dat CirA een met die bacteriocines vergelijkbaar werkingsmechanisme heeft namelijk het maken van gaten in de membraan. Het werkingsmechanisme van het immuniteitseiwit is dan mogelijk het afschermen van een receptor voor CirA of de blokkade van vorming van gaten in de membraan. Bacteriocines hebben, net als eiwitten met een lipidemodificatie zoals die die onder andere gesecreteerd worden door LolCDE, een hoge affiniteit voor de membraan. Het mogelijke verwijderen van CirA uit de membraan door de LolCDE homologen CirGHI zou de blootstelling van de producerende cel aan zijn eigen bacteriocine verminderen waardoor een hoger productie niveau bereikt zou kunnen worden. Deze mogelijkheid wordt ondersteund door de waarneming dat enterocin AS-48 expressie vermindert als de CirGHI homologen BacGHI worden verwijderd. Anderszins kan het ook zo zijn dat CirGHI immuniteitseiwitten uit de membraan halen en daardoor weer beschikbaar maken, hetgeen de immuniteit zou verhogen en tot hogere bacteriocine productie zou kunnen leiden. De verklaring van

de gedeeltelijke resistentie die wordt veroorzaakt door CirBD zou kunnen zijn dat deze eiwitten het bacteriocine uit de celmembraan pompen.

Voor de toekomst zijn er nog vele uitdagingen blijven liggen. Zoals het bewijzen of falcifiseren van het model zoals dat hier gepresenteerd is, het bacteriocine werkingsmechanisme, de werking van de immuniteit, de regulatie van de productie van CirA, maar vooral ook de opheldering van het circularisatiemechanisme zijn boeiende onderdelen.

REFERENCES

1. **Craik, D. J.** 2001. Plant cyclotides: circular, knotted peptide toxins. *Toxicon* **39**:1809-1813.
2. **Eisenbrandt, R., M. Kalkum, E. M. Lai, R. Lurz, C. I. Kado, and E. Lanka.** 1999. Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J.Biol.Chem.* **274**:22548-22555.
3. **Hoffmann, A., T. Schneider, U. Pag, and H. G. Sahl.** 2004. Localization and functional analysis of Pepl, the immunity peptide of Pep5-producing *Staphylococcus epidermidis* strain 5. *Appl.Environ.Microbiol.* **70**:3263-3271.
4. **Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto, and Y. Ike.** 1997. Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J.Bacteriol.* **179**:7843-7855.
5. **Yakushi, T., K. Masuda, S. Narita, S. Matsuyama, and H. Tokuda.** 2000. A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nat.Cell Biol.* **2**:212-218.
6. **Zhang, L., J. Lin, and G. Ji.** 2004. Membrane anchoring of the AgrD N-terminal amphipathic region is required for its processing to produce a quorum-sensing pheromone in *Staphylococcus aureus*. *J.Biol.Chem.* **279**:19448-19456.

