

Abstract

Multidrug resistant bacteria have become a major concern in both human and veterinary medicine. Due to the waning efficacy of many antibiotics, new antimicrobial agents are needed. Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by bacteria to kill other bacteria. Bacteriocins are typically membrane-active antimicrobials with a mechanism of action that differs from antibiotics and are therefore equally potent against antibiotic-resistant strains as their susceptible counterparts. Bacteriocins generally exhibit low toxicity, low bioaccumulation, and a narrow spectrum of inhibition, making them a promising alternative or supplement to antibiotics.

Papers I-IV focus on the discovery of novel bacteriocins. **Paper I** describes the discovery, purification, and initial characterization of a novel bacteriocin, ubericin K. In this study, samples of raw bovine milk were screened for the presence of bacteria producing bacteriocins inhibiting *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus dysgalactiae*, or *Staphylococcus aureus*. These species are implicated as the causative agents in bovine mastitis, and bacteriocins have previously been shown to be able to reduce the incidence of mastitis in dairy cows. Additionally, *S. aureus* and *E. faecalis* are opportunistic pathogens also in humans. In **Paper II**, a bacteriocin producer that inhibited a multidrug resistant strain of *E. faecium*, an emerging opportunistic human pathogen, was found. The bacteriocin named vagococcin T was identified as a two-peptide lantibiotic and shown to be active also against *Listeria monocytogenes* and *E. faecalis*. **Paper III** describes the techniques and methods used in our laboratory for purifying and identifying new bacteriocins and investigating their mode of action. In **Paper IV**, we show that leaderless bacteriocins can be engineered to change their target organism and potency. This was achieved by constructing a library of hybrid peptides consisting of the N- and C-terminal halves of saposin-like leaderless bacteriocins. We hypothesized that these peptides have N-terminal and C-terminal halves with distinct properties related to membrane insertion and the recognition of a molecular target. Using *in vitro* protein synthesis and spot-on-lawn assays, we identified novel peptides with a spectrum and potency that differed from the parental peptides. We believe that these hybrid bacteriocins are good candidates for future therapeutics and/or probes.

There are some major challenges to the clinical application of bacteriocins, such as their susceptibility against proteases, low solubility under physiological conditions, and rapid clearance from blood/plasma. An alternative to using bacteriocins as therapeutic agents is to use them as “molecular probes” for the detection of their target organism(s). For example, the bacteriocin enterocin K1 (EntK1) exhibits high potency only towards *E. faecium*, a specificity determined by a receptor protein, RseP, on target cells. The high potency is believed to be due to a high binding affinity to the receptor.

In **Paper V**, the interaction between EntK1 and its receptor, RseP, was studied in detail using sensitivity and binding experiments. In contrast to UbeK and VcnT, EntK1 is a small, unmodified, and leaderless bacteriocin ideally suited for synthetic production and chemical modification. In this study, we show that the binding of EntK1 to cells solely depends on RseP and that the spectrum of activity of EntK1 is due to the subtle sequence differences in RseP between species.

The potential of EntK1 as a diagnostic “probe” was also explored. Despite recent advances in clinical and diagnostic technologies, diagnosing a given infection is often time-consuming and complex. The diagnosis of an infection and identification of the causative microorganism can often only be obtained by molecular detection or traditional culture-based techniques. Because of this, infections are frequently treated blindly with broad-spectrum antibiotics. The unnecessary use of antibiotics is undesirable due to the spread of resistance and off-target killing of non-pathogenic (good) bacteria. Rapid and cost-effective diagnostic methods could reduce health costs and antibiotic use.

In **Paper VI**, we employed EntK1, which was chemically synthesized with an N-terminal fluorescent tag, to develop a flow cytometry-based detection method for *E. faecium*. The method was shown to be highly specific for *E. faecium*, which was detected with higher fluorescent signals than *S. aureus* and *E. coli*. Further, the detection method was evaluated on urine samples containing less than 10^5 CFU/ml of bacteria, the laboratory diagnostic criterium for a urinary tract infection. Samples containing *E. faecium* were positively identified and could be distinguished from samples containing *S. aureus* or *E. coli*. The work presents a proof of concept for using bacteriocins as specific probes for rapid detection and diagnosis.

Norsk sammendrag

Multiresistente bakterier er blitt et betydelig problem i både human- og veterinærmedisin. På grunn av redusert effekt av mange antibiotika, er det behov for nye antimikrobielle midler. Bakteriociner er ribosomalt-syntetiserte antimikrobielle peptider produsert av bakterier, for å drepe andre bakterier. Bakteriociner er typisk membran-aktive forbindelser med virkningsmekanismer som er forskjellig fra antibiotika. De er derfor like effektive mot multiresistente som antibiotika-sensitive bakterier. Bakteriociner generelt viser lav toksisitet, liten grad av opphoping i miljøet, og de har et smalt hemmingsspekter, Tilsammen gjør dette bakteriociner til et lovende alternativ eller supplement til antiobika.

Artikkel I-VI er fokusert på identifisering av nye bakteriociner. **Artikkel I** beskriver identifiseringen, isolering, og initiell karakterisering av et nytt bakteriocin som vi kaller ubericin K (UbeK). I denne studien ble prøver av upasteurisert melk undersøkt for tilstedeværelsen av bakteriocinproduserende bakterier som kunne hemme *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus dysgalactiae*, og *Staphylococcus aureus*. Dette er arter som forårsaker mastitt hos kyr, og bakteriociner har tidligere vært vist å kunne redusere forekomsten av slike infeksjoner. *S. aureus* og *E. faecalis* er også opportunistiske patogene bakterier hos mennesker. I **Artikkel II** ble det oppdaget en bakteriocinprodusent som hemmet en multiresistent stamme av *E. faecium*, en patogen som er et økende problem hos mennesker. Bakteriocinet, navngitt vagococcin T (VcnT), ble identifisert som et to-peptide lantibiotikum og vist å være aktiv mot *Listeria monocytogenes* og *E. faecalis*. **Artikkel III** beskriver de teknikkene og metodene som anvendes av vår forskningsgruppe for identifisering og karakterisering av nye bakteriociner. I **Artikkel IV** viser vi at lederløse bakteriociner kan konstrueres syntetisk til å endre målorganisme og antimikrobiell aktivitet. Dette ble muliggjort ved å lage et bibliotek av hybrid-bakteriociner som bestod av N- og C-terminale halvdelene til saposin-lignende lederløse bakteriociner. Vi antok at disse peptidene har N- og C-terminale halvdelene med distinkte funksjoner, relatert til membraninnsettelse og reseptor-gjenkjenning. Ved bruk av *in vitro* proteinsyntese og spot-on-lawn analyse, identifiserte vi nye peptider med hemmingsspektre og antimikrobiell aktivitet som var forskjellig fra bakteriocinene de er satt sammen av. Disse hybrid-bakteriocinene er gode kandidater for videre bruk til behandling eller diagnostikk.

Det er store utfordringer ved bruk av bakteriociner til behandling av infeksjoner, for eksempel høy sensitivitet mot proteaser, lav løselighet, og hyppig utskillelse fra blodet. Et alternativ til å bruke bakteriociner for behandling er å bruke dem som gjenkjennelsesmolekyler ("markører") for deteksjon av deres målorganisme. For eksempel viser bakteriocinet enterocin K1 (EntK1) god aktivitet bare mot *E. faecium*, en spesifisitet som kommer av et reseptor protein, RseP, på målorganismen. Den gode aktiviteten er antatt å være på grunn av en sterk binding mellom bakteriocinet og reseptoren.

I **Artikkel V** blir interaksjonen mellom bakteriocinet EntK1 og dens reseptorprotein RseP studert i detalj, ved bruk av sensitivitet og bindingsanalyser. I motsetning til UbeK og VcnT, er EntK1 et lite, umodifisert, og lederløst bakteriocin som enkelt kan syntetiseres og modifiseres. I tillegg så har EntK1 et veldig smalt hemmingspektrum hovedsakelig mot *E. faecium*. I denne studien viser vi at bindingen mellom EntK1 og målcellen bare er avhengig av RseP, og at hemmingspekteret kommer av sekvensforskjeller i RseP mellom arter.

Potensialet til EntK1 som et gjenkjennelsesmolekyl for deteksjon ble også utforsket. På tross av nylige utviklinger innen medisin og diagnose, er diagnostiseringen av infeksjoner ofte tidkrevende og vanskelig. Diagnose av en infeksjon og identifiseringen av den forårsakende mikroorganismen kan ofte bare gjøres ved bruk av molekylære metoder eller ved kultivering av mikroorganismen. På grunn av dette er infeksjoner ofte behandlet med bredspektret antibiotika uten å identifisere organismen. Unødvendig bruk av antibiotika er ikke ønskelig på grunn av spredningen av antibiotika-resistens og påvirkningen slike antibiotika-kurer har på den sunne tarmfloraen. Raske og kostnadseffektive diagnostiske metoder kan redusere bruken av antibiotika og byrden på helsevesenet.

I **Artikkel VI** utnyttet vi EntK1, som ble kjemisk syntetisert og modifisert med et fluorescent molekyl festet til N-terminus, til å utvikle en flowcytometri-basert analysemetode for deteksjon av *E. faecium*. Metoden ble vist å være veldig spesifikk for *E. faecium*, som kunne bli detektert med høyere fluorescens-signaler enn *S. aureus* og *E. coli*. Videre ble metoden testet på urinprøver som inneholdt mindre enn 10^5 CFU/ml bakterier, et mye brukt diagnostisk kriterium for urinveisinfeksjon. Urinprøver som inneholdt *E. faecium* ble identifisert, og det kunne skilles mellom prøver som inneholdt *E. faecium* og prøver med *S. aureus* eller *E. coli*. Dette arbeidet beviser konseptuelt hvordan bakteriociner kan brukes for rask deteksjon og diagnose.