



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Bacillus cereus spore and cell proteome dynamics

Gao, X.

Publication date
2022

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Gao, X. (2022). *Bacillus cereus spore and cell proteome dynamics*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

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), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, P.O. Box 19185, 1000 GD Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Summary

B. cereus is a ubiquitous foodborne pathogen, which has emerged as a threat to humans. It has been found in diverse types of food and is responsible for food-borne disease, diarrheal and emetic illnesses when food storage is improper. What makes it difficult to eliminate *B. cereus* from food is the formation of spores. Spores are formed when nutrients are exhausted and are highly resistant to harsh conditions. When the environment is favorable again, spores germinate and grow back to vegetative cells producing toxins during exponential growth. In this thesis, the spores of *B. cereus* have been investigated at the protein level from composition to processes of germination and outgrowth, aiming to provide fundamental information for a comprehensive understanding of *B. cereus* spores.

Chapter 1 provides a general introduction of the pathogeny of *B. cereus* and sporulation, as well as the function of each spore layer. The spore composition and germination processes are described in detail. The proteins with important functions in spore germination are summarized and how they mediate germination during different stages is described. The applications of 'omics' tools, especially proteomics, in spore research is summarized.

Chapter 2 describes the protein composition of the *B. cereus* spore inner membrane and compares it with the vegetative cell membrane, using the enrichment method developed for *B. subtilis* spore inner membrane study. Based on bioinformatics algorithms, the locations of identified and quantified vegetative cell membrane proteins and spore inner membrane proteins are predicted. Comparison of vegetative and spore membrane proteins showed there were 54 spore membrane specific and 308 cell membrane specific proteins. Functional characterization and quantification comparison showed that proteins in transporters, receptors and proteins related to cell division and motility are predominant in the cell membrane proteome. The spore inner membrane has specific expression of several germinant receptors and spore specific proteins, but also seems to show a preference towards the use of simple carbohydrates like glucose and fructose owing to only expressing transporters for these. These results demonstrate the differences in membrane proteome composition and the specifically required proteins in the inner membrane of *B. cereus* dormant spores to survive adverse conditions.

Chapter 3 reports *B. cereus* spore proteome dynamics during germination and outgrowth after response to L-alanine and inosine addition. The new

insights into germination and outgrowth molecular mechanisms are revealed by applying mass spectrometry combined with co-expression network analysis. We obtained a unique global proteomic view of germination and outgrowth processes of *B. cereus* spores with 2211 proteins identified and quantified from samples collected at 12 time-points. The comparison between samples collected at 0 min and the last time point shows that 457 proteins were spore predominant proteins and 284 proteins were vegetative cell predominant proteins, revealing the differentiation of protein composition in spores and vegetative cells. Proteins with vital functions in germination, such as germinant receptors (GRs), small acid soluble proteins (SASPs), coat proteins and exosporium proteins, are found to be degraded after germination, which is consistent with studies in *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. Germination and outgrowth dynamic proteome data is clustered into eight modules using co-expression network analysis. Each module is associated with different functions and exhibits distinct expression profiles. Module green with functions of transcription, translation and cell division shows an increase trend when germination just finishes. Module turquoise and yellow associated with protein synthesis and metabolism show an increased trend when outgrowth starts. Module black and red are associated with fatty acid metabolism. Germination related proteins are clustered into module blue and brown, the abundances of which decrease after finishing germination. In the module blue and brown, we are able to deduce several proteins that may be vital during germination. This study shows the protein dynamics during *B. cereus* spore germination and outgrowth for the first time and provides a global view for a deeper understanding of the organization of proteins during spore revival.

Chapter 4 investigates the differences of the spore proteome between a wild-type (WT) strain and genetically constructed strains. Mutant strains are made by introducing a plasmid that carries a fluorescent fusion protein of germinant receptor GerR or scaffold protein GerD, which were designed to visualize the germinosome in *B. cereus*. Proteomic analysis shows that overexpression of the target proteins has negligible effects on spore proteome. However, our findings suggest that introduction of a plasmid alone alters spore protein composition dramatically with 916 proteins significantly down-regulated and 379 proteins significantly up-regulated among 3551 identified proteins. Spore proteins with significant abundance changes are involved in signaling and metabolism. This shows that empty vector controls are more apt to compare changes to than WT when using plasmid based genetic tools. Researchers should keep in mind that molecular cloning techniques can alter more than their intended targets in a

biological system.

Chapter 5 describes the application of a new sample processing method, named single-pot, solid phase-enhanced sample-preparation (SP3), on spores and vegetative cells of *B. cereus*. Compared with the “one-pot” method which has been successfully applied in *B. subtilis*, *B. cereus* and *Peptoclostridium difficile* regarding to sporulation, germination and other research topics related to spores, SP3 protein clean-up method exhibits a similar performance in spore and vegetative cell proteome coverage and reproducibility. Moreover, SP3 has advantages in identification and quantification of membrane proteins. In conclusion, the SP3 protein clean-up method can be used in spore related researches and be a substitute of “one-pot” method.

In Chapter 6, the challenges in spore germination research and emerging technologies that can be applied on spore study in the future are discussed in detail.

Samenvatting

B. cereus is een alomtegenwoordige, door voedsel overgedragen ziekteverwekker, die een bedreiging voor de mens is geworden. Het is aangetroffen in diverse soorten voedsel en is verantwoordelijk voor door voedsel overgedragen ziekten, diarree en emetische aandoeningen wanneer voedsel onjuist wordt bewaard. Wat het moeilijk maakt *B. cereus* uit voedsel te verwijderen, is de vorming van sporen. Sporen worden gevormd wanneer voedingsstoffen uitgeput zijn en zijn zeer resistent tegen barre omstandigheden. Wanneer de omgeving weer gunstig is, ontkiemen de sporen en groeien weer uit tot vegetatieve cellen die tijdens exponentiële groei toxinen produceren. In dit proefschrift zijn de sporen van *B. cereus* onderzocht op eiwitniveau, van samenstelling tot processen van kieming en uitgroei, met als doel fundamentele informatie te verschaffen voor een volledig begrip van *B. cereus* sporen.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding over de pathogenese van *B. cereus* en sporulatie, en de functie van elke sporenlaag. De samenstelling van de sporen en de kiemprocessen worden in detail beschreven. De eiwitten met belangrijke functies in sporenkieming worden opgesomd en beschreven wordt hoe ze de kieming tijdens de verschillende stadia bemiddelen. De toepassingen van 'omics' tools, in het bijzonder proteomics, in sporenonderzoek wordt samengevat.

Hoofdstuk 2 beschrijft de eiwitsamenstelling van het spore binnenmembraan van *B. cereus* en vergelijkt deze met het vegetatieve celmembraan, gebruik makend van de verrijkmethode die ontwikkeld is voor *B. subtilis* spore binnenmembraan studie. Op basis van bio-informatica algoritmen worden de locaties van geïdentificeerde en gekwantificeerde vegetatieve celmembraan eiwitten en spore binnenmembraan eiwitten voorspeld. Vergelijking van vegetatieve en spore membraan eiwitten toonde aan dat er 54 spore membraan specifieke en 308 celmembraan specifieke eiwitten waren. Vergelijking van functionele karakterisering en kwantificering toonde aan dat eiwitten in transporters, receptoren en eiwitten gerelateerd aan celdeling en motiliteit overheersen in het celmembraan proteoom. Het spore binnenmembraan heeft specifieke expressie van verschillende kiemreceptoren en spore-specifieke eiwitten, maar lijkt ook een voorkeur te vertonen voor het gebruik van enkelvoudige koolhydraten zoals glucose en fructose, doordat alleen transporters hiervoor tot expressie komen. Deze resultaten tonen de verschillen aan in membraan proteoomsamenstelling en de specifiek benodigde eiwitten in het binnenmembraan van *B. cereus* slapende sporen om ongunstige

omstandigheden te overleven.

Hoofdstuk 3 rapporteert de proteoom dynamica van *B. cereus* sporen tijdens kieming en uitgroei na reactie op L-alanine en inosine toevoeging. De nieuwe inzichten in de moleculaire mechanismen van kieming en uitgroei worden geopenbaard door toepassing van massaspectrometrie gecombineerd met co-expressie netwerk analyse. We verkregen een uniek globaal proteoom beeld van de ontkiemings- en uitgroeiprocessen van *B. cereus* sporen met 2211 geïdentificeerde en gekwantificeerde eiwitten uit monsters verzameld op 12 tijdstippen. De vergelijking tussen monsters verzameld bij 0 min en het laatste tijdstip toont aan dat 457 eiwitten overheersend waren voor de sporen en 284 eiwitten overheersend voor de vegetatieve cellen, wat de differentiatie van de eiwitsamenstelling in sporen en vegetatieve cellen aantoont. Eiwitten met vitale functies in de kieming, zoals kiemreceptoren (GR's), kleine zuur oplosbare eiwitten (SASP's), manteleiwitten en exosporium-eiwitten, blijken na de kieming te worden afgebroken, hetgeen consistent is met studies in *Bacillus subtilis* en *Bacillus anthracis*. Ontkieming en uitgroei dynamische proteoom gegevens zijn geclusterd in acht modules met behulp van co-expressie netwerk analyse. Elke module is geassocieerd met verschillende functies en vertoont verschillende expressie profielen. Module groen met functies van transcriptie, translatie en celdeling vertoont een stijgende trend wanneer de kieming net eindigt. Module turquoise en geel geassocieerd met eiwitsynthese en metabolisme vertonen een verhoogde trend wanneer de uitgroei begint. Module zwart en rood zijn geassocieerd met vetzuurmetabolisme. Kiemkracht gerelateerde eiwitten zijn geclusterd in module blauw en bruin, waarvan de overvloed afneemt na het beëindigen van de kieming. In de module blauw en bruin kunnen we verschillende eiwitten afleiden die van vitaal belang kunnen zijn tijdens de ontkieming. Deze studie toont voor het eerst de eiwit dynamiek tijdens *B. cereus* spore kieming en uitgroei en geeft een globaal beeld voor een dieper begrip van de organisatie van eiwitten tijdens spore opwekking.

Hoofdstuk 4 onderzoekt de verschillen van het spore proteoom tussen een wild-type (WT) stam en genetisch gemuteerde stammen. Mutante stammen worden gemaakt door een plasmide te introduceren dat een fluorescerend fusie-eiwit draagt van de kiemreceptor GerR of het scaffold eiwit GerD, die ontworpen zijn om het kieminosoom in *B. cereus* te visualiseren. Proteoomanalyse toont aan dat overexpressie van de doeleiwitten een verwaarloosbaar effect heeft op het proteoom van de sporen. Onze bevindingen suggereren echter dat de introductie van een plasmide alleen de samenstelling van sporeneiwitten drastisch verandert, met 916 eiwitten

significant gedownreguleerd en 379 eiwitten significant up-gereguleerd onder de 3551 geïdentificeerde eiwitten. Spore eiwitten met significante veranderingen in abundantie zijn betrokken bij signalering en metabolisme. Dit toont aan dat lege vector controles meer geschikt zijn om veranderingen mee te vergelijken dan WT wanneer gebruik wordt gemaakt van op plasmiden gebaseerde genetische hulpmiddelen. Onderzoekers moeten in gedachten houden dat moleculaire kloneringstechnieken meer kunnen veranderen dan hun beoogde doelen in een biologisch systeem.

Hoofdstuk 5 beschrijft de toepassing van een nieuwe methode voor monsterverwerking, genaamd single-pot, solid phase-enhanced sample-preparation (SP3), op sporen en vegetatieve cellen van *B. cereus*. Vergeleken met de "one-pot" methode die met succes is toegepast op *B. subtilis*, *B. cereus* en *Peptoclostridium difficile* met betrekking tot sporulatie, kieming en andere onderzoeksthema's met betrekking tot sporen, vertoont de SP3 eiwitopschoningsmethode een vergelijkbare prestatie in spore en vegetatieve cel proteoomdekking en reproduceerbaarheid. Bovendien heeft SP3 voordelen bij de identificatie en kwantificering van membraaneiwitten. Concluderend, de SP3 eiwit clean-up methode kan worden gebruikt in sporen gerelateerde onderzoeken en een vervanging zijn van "one-pot" methode.

In hoofdstuk 6 worden de uitdagingen in sporenkiemonderzoek en opkomende technologieën die in de toekomst kunnen worden toegepast op sporenonderzoek in detail besproken.

List of publication

Gao X, Swarge BN, Dekker HL, Roseboom W, Brul S, Kramer G. The Membrane Proteome of Spores and Vegetative Cells of the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 19;22(22):12475. doi: 10.3390/ijms222212475.

Acknowledgements

Pursuing my Ph.D. degree in UvA is the most correct decision I ever made. Now, the odyssey comes to the finale. I am so grateful to all the people who have inspired and helped me throughout these years. Without your support and encouragement, I would never have been able to accomplish this trip.

Firstly, I would like to extend my sincere gratitude to Prof. Stanley Brul and Dr. Gertjan Kramer for providing me the great opportunity to work on spore and proteomics. I really appreciate your guidance, trust, encouragement, and immense knowledge. Without your support and patience in the last four years, it would have been impossible for me to finish this thesis. I would also like to thank dr. Leo de Koning for his guidance for me to step into proteomics field. Thanks also go to Prof. P. Setlow for the comments on introduction and discussion chapter. I am very grateful to the China Scholarship Council for the financial support.

I would like to thank my Ph.D. defense committee members: Prof. dr. Peter Setlow, Prof. dr. Tjakko Abee, Prof. dr. Mike Peck, Prof. dr. Benno ter Kuile, Dr. Tanneke den Blaauwen and Dr. Dave Speijer. It is a pleasure and honor to have you all in my committee.

Special thanks go to Yan Wang. We started the Ph.D. career together. I really enjoyed talking with Yan, about both scientific questions and daily-life problems. She always shared her opinions with me. Many thanks go to dr. Zhiwei Tu. Thank you for sharing with me your immense knowledge and always being patient no matter how stupid my questions are. Sincere thanks also go to dr. Wishwas R. Abhyankar and dr. Bhagyashree N. Swarge. Thank you for helping and teaching me about experiments and revising my thesis. I would also like to thanks Mr. Winfried Roseboom and Mr. Henk Dekker for helping me solve practical problems in the lab and teaching me about the experiments.

Next, I would like to thank all my other colleagues in MSB and MBMFS group: Gertien, Hans, Jan, Benno, Jeroen, Richard, Belinda, Margarita, Dennis, Jos, Marco, Meike, Linli Zheng, Juan Wen, Wei Du, Laura, Soraya, Marloes, Tania, Niels, Yan Wang, Pim, Raymond, Sacha, Lisa, Nienke, Wenxi Qi, Yixuan Huang, Shiqi Liu, Luyuan Nong, Taichi Chen, Tineke, Arend, Selin, Xinyu Wang. Thanks for your valuable advice and comments in group meetings and individual discussions, which helps a lot in my research work. Thanks all my students Rick, Charlene and Mike.

I would thank other friends: Yanni Wu, Yansong Feng, Dongdong Zheng, Dechao Wei, Anna, Wenyang Wu, Jiayun Fan, Wei Zeng. Thanks for keeping

me company. It is a great pleasure to meet you in Amsterdam.

Lastly, I would like to thank my family for their endless love and support.