

DISS ETH NO. 18524

**Glycoengineering and Glycomimicry: *Campylobacter jejuni* carbohydrate structures on
Salmonella enterica serovar Typhimurium**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

Presented by

KARIN CHRISTINE ILG

Diplom Biochemikerin, Universität Regensburg

Born on April 30th 1980

Citizen of the Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Markus Aebi, examiner

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt, co-examiner

Dr. Bernard Priem, co-examiner

2009

SUMMARY

Bacteria synthesise a large variety of saccharide containing structures: Capsular polysaccharides, peptidoglycan, lipopolysaccharides and lipooligosaccharides as well as glycoproteins with *N*- and *O*-linked glycomoieties. Many of these structures are present at the cell surface and therefore influence the interaction of the bacterium with its environment.

Two glycostructures of the human enteropathogen *Campylobacter jejuni* were in the focus of this thesis: On the one hand the heptasaccharide that is normally attached to proteins via an *N*-glycosidic linkage and that consists of GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,4-[Glc β 1,3]-GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,3-Bac- β 1, where Bac is bacillosamine (2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyglucopyranose), and on the other hand the ganglioside sugar epitopes that are present in *C. jejuni* lipooligosaccharide. Glycoengineering to produce *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) strains presenting the *C. jejuni* heptasaccharide or the GM3 sugar epitope on their cell surface was the main task of this thesis. Furthermore, we studied the influence of the altered cell surface glycostructures on the immunological properties of the engineered strains.

We first constructed an *S. Typhimurium* strain devoid of the polymeric O-antigen region of the lipopolysaccharide and we demonstrated that it shows less resistance towards complement-mediated killing and antimicrobial peptides than the wild type. We could also show that this strain is nearly immotile. In a cooperation with Wolf-Dietrich Hardt's group (Institute of Microbiology, ETH Zürich) we demonstrated that this strain can invade HeLa cells *in vitro*. It is also a potent inducer of colitis in streptomycin-treated mice while being attenuated in a co-infection experiment of mice with a wild type *S. Typhimurium* strain.

The O-antigen negative *S. Typhimurium* strain was used to present the *C. jejuni* heptasaccharide on the cell surface in a so-called lipid A display system. In this approach, the similarity between Wzy-dependent O-antigen biosynthesis and *C. jejuni* N-glycan biosynthesis is exploited for transfer of the *C. jejuni* heptasaccharide to *S. Typhimurium* lipid A core by the *S. Typhimurium* O-antigen ligase WaaL. Our data indicated a crosstalk in *S. Typhimurium* between the endogenous enterobacterial common antigen biosynthesis pathway and the heterologously expressed *C. jejuni* N-glycosylation machinery. We employed this interplay to increase display levels in the O-antigen negative *S. Typhimurium* strain. We further demonstrated that this interplay results in the transfer of a *C. jejuni* heptasaccharide containing a N-acetylglucosamine residue instead of bacillosamine at the reducing end. This change of the saccharide at the reducing end did not alter the immunogenicity of the heptasaccharide in mice.

The ganglioside sugar epitopes present in *C. jejuni* lipooligosaccharide are connected to the occurrence of the autoimmune disease Guillain-Barré-Syndrome. To provide further insights into the molecular basis of this disease, the ganglioside GM3 sugar epitope was displayed on engineered *S. Typhimurium* strains in the course of this thesis. A system developed by E. Yavuz (CERMAV Grenoble/ETH Zürich) employs a terminal glucose residue on a genetically truncated lipid A core as an acceptor for new oligosaccharide structures. We constructed a *S. Typhimurium* strain with a truncated lipid A core and were able to present the GM3 sugar epitope on the cell surface of *S. Typhimurium* by heterologous expression of glycosyltransferases from *Neisseria meningitidis* and *N. gonorrhoeae*, thereby providing a platform to study the influence of a GM3 sugar epitope on bacteria-host interactions.

ZUSAMMENFASSUNG

Bakterien synthetisieren eine Vielzahl saccharidhaltiger Strukturen: Kapselpolysaccharid, Peptidoglykan, Lipopolysaccharid und Lipooligosaccharid sowie Glykoproteine mit *N*- oder *O*-glykosidischer Bindung. Viele dieser Strukturen befinden sich auf der Zelloberfläche und beeinflussen daher die Interaktion des Bakteriums mit seiner Umwelt.

Zwei Zuckerstrukturen des menschlichen Enteropathogens *Campylobacter jejuni* standen im Zentrum dieser Dissertation: Zum einen das Heptasaccharid GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,4-[Glc β 1,3]-GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,3-Bac- β 1, welches normalerweise *N*-gebunden an Proteine vorliegt (Bac: Bacillosamine; 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyglucopyranose) und zum anderen die in den *C. jejuni* Lipooligosaccharidstrukturen vorkommenden Gangliosid-Zuckerepitope. Ziel war es, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) Stämme herzustellen, die das *C. jejuni* Heptasaccharid oder das GM3 Zuckerepitop auf ihrer Oberfläche tragen. Weiterhin wurde der Einfluss der veränderten Zelloberflächenstrukturen auf die immunologischen Eigenschaften der generierten Bakterienstämme untersucht.

Zuerst wurde ein *S. Typhimurium* Stamm generiert, der keine polymere O-antigen Region in seiner Lipopolysaccharidstruktur mehr besitzt. Wir konnten belegen, dass dieser Stamm eine geringere Resistenz gegenüber dem Komplementsystem und antimikrobiellen Peptiden besitzt sowie fast vollständig immotil ist. In einer Kooperation mit Wolf-Dietrich Hardts Arbeitsgruppe (Institut für Mikrobiologie, ETH Zürich) wiesen wir außerdem nach, dass dieser Stamm *in vitro* in HeLa Zellen eindringen und in Streptomycin-behandelten Mäusen eine Colitis auslösen kann. Jedoch erwies sich dieser Stamm bei einer Co-Infektion von Mäusen zusammen mit dem Wildtypstamm von abgeschwächter Infektionsfähigkeit.

Dieser O-antigen negative *S. Typhimurium* Stamm wurde genutzt, um in einem sogenannten *lipid A display* System das *C. jejuni* Heptasaccharid auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Dabei wird die Ähnlichkeit der Wzy-abhängigen O-antigen Biosynthese mit der *C. jejuni* N-Glykan Biosynthese zur Übertragung des *C. jejuni* Heptasaccharids durch die *S. Typhimurium* O-antigen Ligase WaaL auf die Lipid A Grundstruktur ausgenutzt. Wir wiesen nach, dass eine Interaktion zwischen der endogenen Biosynthese des *enterobacterial common antigen* und der heterolog exprimierten N-Glykosylierungsmaschinerie von *C. jejuni* stattfindet. Wir nutzten diese Interaktion zur Erhöhung der Menge des auf der Salmonellenoberfläche präsentierten *C. jejuni* Heptasaccharids. Zusätzlich wiesen wir nach, dass dieses Zusammenspiel zur Synthese eines Heptasaccharids mit N-Acetylglucosamin anstelle von Bacillosamin am reduzierenden Ende führte welches auf die Lipid A Grundstruktur übertragen wurde. Der Monosaccharidaustausch am reduzierenden Ende änderte jedoch nicht die Immunogenität des Heptasaccharids in Mäusen.

Die in den *C. jejuni* Lipooligosaccharidstrukturen vorkommenden Gangliosid-Zuckerepitope stehen in Zusammenhang mit der Autoimmunkrankheit Guillain-Barré Syndrom. Zur genaueren Untersuchung der molekularen Grundlagen dieser Krankheit wurde das Zuckerepitop des Gangliosids GM3 in dieser Arbeit auf der Oberfläche von *S. Typhimurium* präsentiert. Ein System, das von E. Yavuz (CERMAV Grenoble/Institut für Mikrobiologie, ETH Zürich) entwickelt wurde, nutzt eine terminale Glukose einer genetisch verkürzten lipid A Grundstruktur als Akzeptor für neue Oligosaccharidstrukturen. Wir generierten einen *S. Typhimurium* Stamm mit verkürzter Lipid A Grundstruktur und konnten durch heterologe Expression von Glykosyltransferasen aus *Neisseria meningitidis* und *N. gonorrhoeae* die Oligosaccharidstruktur des GM3 Zuckerepitops auf der *S. Typhimurium*-Zelloberfläche präsentieren. Dieser Stamm kann nun genutzt werden, um den Einfluss des GM3- Zuckerepitops auf die Interaktion zwischen Bakterien und Wirt zu untersuchen.