

DISS. ETH NO. 18884

Mycobacterial lipoproteins are triacylated and *Mycobacterium tuberculosis* Ppm1 prevents phagosome maturation

A dissertation submitted to the

ETH ZÜRICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

ANDREAS TSCHUMI

Dipl. Natw. ETH

born July 5th, 1979

citizen of Wolfisberg BE, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Markus Aebi, examiner

Prof. Dr. Hubert Hilbi, co-examiner

Prof. Dr. Peter Sander, co-examiner

2010

Summary

Tuberculosis is an infectious disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* that claims about 1.8 million lives annually, and one third of the world's population is infected with this bacterium. Therefore, tuberculosis is the second most frequent cause of death related to infectious diseases. Due to the slow growth of *M. tuberculosis* the therapy lasts at least six month but also the growing amount of antibiotic resistant bacteria and bacteria resistant to almost every available drug pose severe problems. Thus, not only new anti-tuberculosis drugs but also new potential drug targets need to be identified. Possible candidates are the *M. tuberculosis* lipoproteins.

Mycobacterial lipoproteins are secreted and immunomodulatory proteins. They are post-translationally modified at the +1 cysteine of a consensus sequence termed lipobox motif. The modifications are consecutively mediated by three enzymes: 1) formation of a thioether linkage between the conserved cysteine residue and a diacylglycerol catalyzed by phosphatidylglycerol:pre-lipoprotein diacylglycerol transferase (Lgt), 2) cleavage of the N-terminal signal peptide by the lipoprotein signal peptidase/signal peptidase II (LspA), and 3) in the case of Gram-negative bacteria, aminoacylation of the N-terminal cysteine residue by phospholipid:apolipoprotein *N*-acyltransferase (Lnt). It has been shown that the mycobacterial cell envelope resembles that of Gram-negative bacteria although mycobacteria belong to the group of Gram-positive bacteria. Therefore, it is hypothesized that mycobacterial lipoproteins may be *N*-acylated but so far, this has not been proven. Aim of this study is to characterize the modifications of mycobacterial lipoproteins with the focus of potential *N*-acylation and its role in the virulence of *M. tuberculosis*.

Isogenic knock-out mutants in the genes homologous to *Escherichia coli* Lnt have been generated in *M. tuberculosis* and in the non-pathogenic *M. smegmatis* strain. Using *M. tuberculosis* lipoprotein LppX, heterologously expressed in *M. smegmatis*, we showed that mycobacterial lipoproteins are *N*-acylated besides being modified by Lgt and LspA. We identified *lnt* ORF's responsible for the aminoacylation of LppX. In *M. tuberculosis* the *lnt* gene is fused to the *ppm1* gene and builds a two domain protein. Ppm1 is known to be involved in the synthesis of substrates used for the biosynthesis of the cell wall glycoprotein lipoarabinomannan. In mice infection experiments, only an *M. tuberculosis* $\Delta ppm1$ mutant showed reduced CFU levels after 3 weeks post infection, whereas the *M. tuberculosis* Δlnt mutant showed no significant difference to mice infected with the wildtype strain. Applying subcellular fractionation techniques on *M. smegmatis* strains expressing the *M. tuberculosis*

lipoprotein Mpt83 we investigated the impact of the *N*-acylation on transport of lipoproteins. In the wildtype strain we localized Mpt83 in the cell wall, whereas in the *M. smegmatis* *lnt::aph* mutant, Mpt83 was found to be localised in the cytoplasmic membrane. This indicates that *N*-acylation is a prerequisite for lipoprotein transport to the cell wall in mycobacteria.

Zusammenfassung

Tuberkulose ist eine bakterielle Infektionskrankheit, die durch das Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* verursacht wird. Sie fordert jährlich ungefähr 1.8 Millionen Todesfälle. Ein Drittel der Weltbevölkerung ist infiziert mit dem Tuberkulose-Erreger. Damit ist die Tuberkulose die 2. häufigste Todesursache unter den Infektionskrankheiten. Ein grosses Problem der Tuberkulose-Therapie bereitet das langsame Wachstum des Bakteriums, durch das eine Therapiedauer von sechs Monaten unabdingbar wird, und die immer grösser werdende Zahl von Bakterien, die nicht nur resistent gegen die herkömmlichen Medikamente sind sondern zusätzlich gegenüber fast allen vorhandenen Antibiotika. Deshalb ist es eminent wichtig nicht nur neue Medikamente sondern auch neue Angriffsziele für neue Medikamente zu finden. Einen potentiellen Pool an Angriffszielen bilden die Lipoproteine von *M. tuberculosis*.

Mykobakterielle Lipoproteine sind post-translational modifizierte, sekretierte und immunomodulierende Proteine. Eine Gemeinsamkeit der Lipoproteine ist das Vorhandensein einer Konsensus-Sequenz, die Lipobox, welche aus vier Aminosäuren besteht. An der post-translationalen Modifikation sind Pre-prolipoprotein Diacylglyceryltransferase (Lgt) und die Lipoprotein Signal Peptidase (LspA) beteiligt. In Gram-negativen aber nicht in Gram-positiven Bakterien folgt noch eine dritte Modifikation, katalysiert durch die Apolipoprotein *N*-Acyltransferase (Lnt). Lgt überträgt ein Diacylglycerol an das universell konservierte +1 Cystein, LspA schneidet das Signalpeptid ab und Lnt überträgt eine Fettsäure an die freie Aminogruppe des Cysteins. Da die mykobakterielle Zellwand funktionell einer Gram-negativen Zellwand ähnelt, obwohl Mykobakterien zu den Gram-positiven Bakterien gezählt werden, vermuteten wir, dass mykobakterielle Lipoproteine ähnlich wie in Gram-negativen Bakterien prozessiert werden. Dies konnte aber bislang nie gezeigt werden. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung und Charakterisierung des Lipoproteinstoffwechsels in Mykobakterien und die Untersuchung ihres Einflusses auf die Virulenz, wobei der Schwerpunkt auf das *lnt* Gen gesetzt wurde.

Das Gen mit der höchsten Homologie zum *lnt* von *Escherichia coli* wurde in *M. smegmatis* und *M. tuberculosis* durch gezielten Genaustausch deletiert. Untersuchungen mit dem *M. tuberculosis* Lipoprotein LppX, heterolog exprimiert in dem apathogenen Modell-Organismus *M. smegmatis* zeigte, dass Lipoproteine in Mykobakterien dreifach acyliert sind. Das als *lnt* identifizierte Gen codiert für ein Enzym, welches eine Fettsäure auf die primäre Aminogruppe des universell konservierten Cysteins überträgt. In *M. tuberculosis* ist das *lnt* Gen mit dem

ppm1 Gen fusioniert, ein Gen verantwortlich für die Generierung des Zellwand Glykolipids Lipoarabinomannan. Eine *M. tuberculosis* Δ *lnt* Mutante zeigte keine Virulenzattenuation in aerogen infizierten Mäusen. Dies zeigt, dass *Lnt* in *M. tuberculosis* keinen Einfluss auf die Virulenz des Bakteriums hat. Die Deletion beider Domänen des Proteins, sprich *Lnt* und *Ppm1*, aber bewirkte eine Verminderung der Koloniebildenden Einheiten in diesem Virulenzmodell. Mittels subzellulärer Fraktionierung eines weiteren heterolog exprimierten *M. tuberculosis* Lipoproteins, *Mpt83*, wurde der Einfluss der N-Acylierung auf den Transport von Lipoproteinen untersucht. Im *M. smegmatis* Wildtyp Stamm wurde *Mpt83* in der Zellwand lokalisiert, wohingegen in der *Lnt* Mutante das *Mpt83* in der Zytoplasmatischen Membran gefunden wurde. Dies zeigt, dass die *Lnt* Modifikation eine Voraussetzung für den Transport von Lipoproteinen in die Zellwand des Bakteriums ist.