



Doctoral Thesis

## Identifizierung und Anwendungen von Phagenproteinen zum Nachweis von *Listeria* spp

**Author(s):**

Kaps, Julia

**Publication Date:**

2010

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006139367> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 18877

**Identifizierung und Anwendungen von  
Phagenproteinen zum Nachweis von  
*Listeria* spp.**

Abhandlung  
zur Erlangung des Titels

DOKTORIN DER WISSENSCHAFTEN

der

ETH ZÜRICH

Vorgelegt von

JULIA KAPS  
Dipl. Biol. Univ., Universität Regensburg  
geboren am 23.11.1981  
in Regensburg, Deutschland

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Martin Loessner, Referent  
Dr. Stefan Miller, Koreferent

2010

## Zusammenfassung

Verursacher von Listeriose, einer schwerwiegenden humanen Infektion, ist *Listeria monocytogenes*. Diese Krankheit äussert sich bei immunsupprimierten Patienten mit Symptomen wie beispielsweise Sepsis, Meningitis oder Enzephalitis. *Listeria monocytogenes* wird hauptsächlich durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel übertragen. Daher muss zum Schutz des Verbrauchers eine mögliche Verunreinigung mit *Listeria* im Lebensmittel und Produktionsanlagen schnell erkannt werden. Dabei kann neben *Listeria*-spezifischen Antikörpern auch die spezifische Bindung von Bakteriophagen an ihren Wirt genutzt werden.

Zum einen können *Listeria* Zellen über Zellbindedomänen von Endolysinen (CBDs) gebunden werden. Die CBDs von *Listeria* Phagen wurden bereits mehrfach charakterisiert. Ausserdem wurde gezeigt, dass sie zum *Listeria* Nachweis verwendet werden können.

Zum anderen verwenden Phagen Bindeproteine zur Anheftung an den Wirt zu Beginn der Infektion. Diese Rezeptor Bindeproteine (RBPs) binden spezifisch an einen Liganden der Wirtsoberfläche und ermöglichen dem Phagen damit die Injektion seines Genoms in die Wirtszelle. Die RBPs von *Listeria* Phagen wurden zu Beginn dieser Arbeit noch nicht beschrieben. Daher sollen sie identifiziert, charakterisiert und ihr Einsatz zum *Listeria* Nachweis im Vergleich mit der CBD des *Listeria* Phagen A511 untersucht werden.

In dieser Arbeit konnten erfolgreich potentielle Bindeproteine der *Listeria* Phagen A006, A118, A500, A511, B025, B054, P35 und PSA identifiziert, exprimiert und charakterisiert werden. Darüber hinaus wurde ein Protein mit einer phagen-ähnlichen Sequenz aus *Listeria welshimeri* isoliert, welches sich ebenfalls als potentielles Bindeprotein herausstellte. Über Sequenzanalysen der jeweiligen Aminosäuresequenzen und den Vergleich der Bindespektren mit den jeweiligen Phagenwirtsspektren wurde festgestellt, dass es sich bei den identifizierten potentiellen Bindeproteinen aus A006, A511, B025, B054, P35, PSA und *Listeria welshimeri* vermutlich um die RBP Moleküle im Phagenviron handelt. Die identifizierten potentiellen Bindeproteine der Phagen A118 und A500 bilden dagegen vermutlich lytische Strukturproteine im Phagenviron.

Mit zwei der identifizierten RBPs (A006Gp17 und Lwe1237) werden unter anderem alle untersuchten *Listeria* Stämme der wichtigen human-pathogenen Serovare 1/2a,

1/2b und 4b gebunden. Zudem weisen sie bezüglich ihrer unspezifischen Wechselwirkungen und ihrer Genuspezifität bessere Eigenschaften für den *Listeria* Nachweis auf, als dies für die CBD511 der Fall ist.

Beim Vergleich mit einem RBP eines *E. coli* O157 spezifischen Phagen (Eco-O157), das beim *E. coli* O157 Nachweis im „enzym-linked fluorescent assay“ hervorragende Ergebnisse zeigte, ergaben die RBPs bei Verwendung als Fängermolekül ähnliche Bindestärken. Als Nachweismolekül deuten die Ergebnisse allerdings auf eine geringere Sensitivität hin als sie mit Eco-O157 erreicht wurde. Somit sind die RBPs im derzeitigen Zustand vermutlich eher als Fängermoleküle beim *Listeria* Nachweis geeignet.

Erste Untersuchungen zur Charakterisierung von A006Gp17 und Lwe1237 deuten darauf hin, dass sie, wie viele andere Proteine dieser Art, in nativer Form als SDS-resistente Homotrimere vorliegen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der N-Terminus von A006Gp17 nicht für die Bindung an die Bakterienoberfläche notwendig ist. Somit ist dieser Teil vermutlich für die Anheftung an den Phagen verantwortlich, wogegen C-terminal die Bindung an den Wirt stattfindet. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen zudem eine mögliche Beteiligung von Teichonsäuren an der Phagenadsorption an ihren Wirt.

## Summary

The causative agent of listeriosis, a severe human disease, is *Listeria monocytogenes*. In immunosuppressed patients this illness may cause sepsis, meningitis or encephalitis. *Listeria monocytogenes* is mainly transmitted via contaminated foods. In order to protect consumers from an infection with *Listeria*, it is important to test a contamination in food products as well as food manufacturing equipment within a short time. Therefore the specific binding of *Listeria* phage to its host can be used as an alternative for antibodies.

Binding proteins of phages are on the one hand cell wall binding domains from endolysins (CBD). CBDs from *Listeria* phages have already been described and can be used for detection of *Listeria* spp.

On the other hand, phages use a binding molecule for host recognition. These receptor binding proteins (RBPs) specifically attach to a ligand on the host surface. Following the attachment, the phage can inject its genome into the host. RBPs of *Listeria* phages have not been described in literature at the beginning of this work. Therefore these molecules should be identified, characterized and applied for *Listeria* detection in comparison with the CBD of *Listeria* phage A511.

Within this doctoral thesis potential binding proteins of the following phages were obtained: A006, A118, A500, A511, B025, B054, P35 and PSA. Furthermore, an additional protein with a phage-like sequence was isolated from *Listeria welshimeri* (Lwe1237) and was shown to be a potential binding protein as well. Sequence analysis and correlation between binding range and phage host range gave evidence that the identified proteins of A006, A511, B025, B054, P35, PSA and of *Listeria welshimeri* are RBPs in phageviroon. The binding proteins of phage A118 and A500 seems to show another function in phageviroon, these proteins are believed to be lytic structural proteins.

Two of the RBPs (A006gp17 and Lwe1237) recognized all tested strains of the most important human pathogenic serovars 1/2a, 1/2b and 4b. Furthermore, they exhibited less unspecific binding and a better genus specificity than CBD511.

Compared to a RBP from an *E. coli* specific phage (Eco-O157), with good results in *E. coli* O157 detection in "enzyme-linked fluorescent assay", both RBPs offered the same affinities when applied as capture molecules. However, as detection molecules

they seem to be less sensitive than Eco-O157. In the present state, A006Gp17 and Lwe1237 are probably only suited as capture molecules for *Listeria* detection.

First characterization of both RBPs gave evidence that these proteins are homotrimeric molecules in their native state, as it was shown for many RBPs of bacteriophages from Gram-negative and -positive bacteria. Additionally, it was shown that the N-terminal region of A006gp17 is not critical for binding properties. Therefore this part is probably responsible for adsorption of the protein to the base plate of the phage, whereas the binding region is built from the C-terminal part. Furthermore, in this doctoral thesis it was confirmed that teichoic acids play a critical role in phage adsorption.