

Genetic Engineering of *Listeria* Phages and Optimization of Phage Propagation Strains

A dissertation submitted to
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
Thomas Alexander Huber
Master of Science UZH
University of Zurich
born April 22, 1976
citizen of Mägenwil AG

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. M. J. Loessner, examiner
Prof. Dr. R. Stephan, co-examiner

1A. Summary

Fighting food pathogens is top on the agenda for all food manufacturers. However, while stringent health and safety measures help to tackle the problem, they don't stop the deadly food pathogens causing serious illness and thousands of deaths in the United States alone every year. The financial and reputational risks to manufacturers in terms of product recall and human tragedy necessitate a fundamental approach to bacterial control: eradicate the pathogens before food enters the chill chain and the consumer's table.

An effective answer to the control of *Listeria* in dairy processing lies in using nature's own weapons, bacteriophages. Phages are ubiquitous and are routinely consumed with all foodstuffs without any adverse impact on human health.

While LISTEX™ P100 (EBI Food Safety, Wageningen, The Netherlands) was the first bacteriophage product which was awarded GRAS status (Generally Recognised as Safe) by the FDA (Food & Drug Administration, USA) and USDA (US Department of Agriculture), several companies developed bacteriophage products against pathogenic bacteria in food. Bacteriophages, useful for this purpose, are characterized by a broad host range against pathogenic bacteria strains, and a virulent lifestyle. They may be applied as processing aid during the production of meat, cheese, fish, vegetables, fruit and other food products. These bacteriophages have no impact on the properties of the treated food product, and do not affect other bacteria, such as desired bacteria in starter cultures. Completing their life cycle they kill the target host cells and no residue or ecological footprint is left behind.

This study aimed to develop and improve tools for the phage propagation on an industrial level. The main goals were i) to improve propagation of bacteriophages with a broader host range, by means of genetic engineering, co-evolution experiments and propagation on highly resistant strains, ii) to construct a screening strain resistant against temperate phage A500, iii) to prevent false positive results in *Listeria* diagnostics by genetic engineering of phage propagation hosts, iv) to construct a luciferase reporter phage to detect viable *Staphylococcus* cells. The investigation included i) correlation between the host range of a phage and its propagation strain, ii) correlation between the host range of a phage (adsorption phenotype) and its genotype, iii) CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) in *Listeria* genomes, iv) transfection of *Listeria* cells with phage DNA, v) expression of the repressor gene of temperate *Listeria* phage A500.

1B. Zusammenfassung

Lebensmittelhersteller lassen keine Massnahme aus, gesundheitsgefährdende Mikroorganismen aus ihren Produkten fern zu halten. Während Gesundheits- und Sicherheitsrichtlinien helfen, das Problem einzudämmen, können Warenrückrufe und gehäuft auftretende Fälle von Infektionen und Intoxikationen trotzdem nicht ausgeschlossen werden. Alleine in den USA sterben jährlich tausende von Menschen durch den Konsum von kontaminierten Lebensmitteln. Um das Risiko solcher Tragödien, sowie von finanz- und rufschädigender Wirkung zu minimieren, müssen Krankheitserreger aus dem Lebensmittel entfernt werden, bevor dieses in die Kühlkette gelangt. Phagen sind prädestiniert für die Reduktion von Krankheitserregern in Lebensmitteln. Sie sind in der Natur weit verbreitet und werden täglich zusammen mit Lebensmitteln konsumiert, ohne sich nachteilig auf die Gesundheit auszuwirken. Listex™ P100, produziert von EBI Food Safety, Wageningen, Niederlande, war eines der ersten Phagenprodukte, welches als Zusatzstoff zur Bekämpfung von Listerien in Lebensmitteln zugelassen wurde. EBI Food Safety und weitere Firmen versuchen sich in dieser Marktlücke zu etablieren und verwenden ausschliesslich virulente Phagen mit breitem Wirtsspektrum, um die Übertragung von Genen von einem Wirtstamm auf den anderen zu verhindern. Ihre Produkte können zur biologischen Bekämpfung von Krankheitserregern bei der Herstellung von Fleisch, Fisch, Käse, Gemüse, Früchten und bei weiteren Erzeugnissen angewendet werden und haben keinen Einfluss auf das Lebensmittel selbst oder andere, im Lebensmittel erwünschte Bakterien, wie zum Beispiel Starterkulturen. Diese Arbeit hatte zum Ziel, Phagen, die zur Biokontrolle von Krankheitserregern in Lebensmitteln eingesetzt werden, sowie ihre entsprechenden Propagationsstämme zu verbessern. Die Hauptziele waren i) die Herstellung von Phagen mit breiterem Wirtsspektrum mittels genetischer Manipulation, Co-evolution und Propagation auf hochresistenten Stämmen, ii) die Konstruktion eines Screening-Stammes, resistent gegen Phage A500, iii) die Herstellung eines Propagationsstammes, der falsch-positive Resultate in diagnostischen Nachweisen verhindert, sowie iv) die Herstellung eines Luciferase Reporterphagen zur Detektion von lebenden *Staphylococcus*-Zellen. Dabei wurden i) der Zusammenhang zwischen Wirtsspektrum und Propagationsstamm, ii) der Zusammenhang zwischen Adsorptions-Phänotyp und Genotyp, iii) die CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) in *Listeria*-Genomen, iv) die Transformation von *Listeria*-Zellen mit Phagen-DNA und v) die Produktion des Repressorproteins des temperenten Phagen A500 untersucht.