

Identification of ligands for Listeria phage endolysins by biochemical and genetic analysis of cell wall components

Doctoral Thesis

Author(s):

Eugster, Marcel Reto

Publication date:

2011

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006543668>

Rights / license:

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

Diss. ETH No. 19448

IDENTIFICATION OF LIGANDS FOR *LISTERIA* PHAGE
ENDOLYSINS BY BIOCHEMICAL AND GENETIC ANALYSIS
OF CELL WALL COMPONENTS

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

MARCEL RETO EUGSTER

Dipl. Natw. ETH

born January 8, 1978

citizen of Altstätten SG, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin J. Loessner, examiner

Prof. Dr. Andreas Peschel, co-examiner

2011

SUMMARY

Listeria spp. are non-spore-forming, rod-shaped Gram-positive bacteria, which are widely distributed in the environment. The genus consists of eight species, of which *Listeria monocytogenes* is an opportunistic human pathogen, and the causative agent of listeriosis. The disease often results in meningitis, encephalitis, septicemia, and abortion, and is also associated with a high mortality rate. It mainly occurs in high-risk groups such as pregnant women, neonates, the elderly, and immunocompromised individuals. Outbreaks of listeriosis are primarily food-borne due to consumption of contaminated food, mostly milk and other dairy products, raw meat, fish products and vegetables. Therefore, the availability of specific and sensitive methods for detection and control of *L. monocytogenes* is essential for prevention of further occurrences of fatal food-borne infections.

Bacteriophages and their enzymes represent a rich source for development of novel practical applications in research, food science and microbial diagnostics. In particular, phage endolysins (Ply) have a great potential as effective antimicrobial agents, and can be used as specific tools in molecular biology, biotechnology and medicine. Bacteriophage-encoded endolysins are cell wall lytic enzymes produced at the end of the phage replication cycle. Endolysins of phages infecting Gram-positive bacteria show a modular organization of two separated functional domains, an N-terminal enzymatically active domain (EAD) and a C-terminal cell wall binding domain (CBD), which specifically targets the protein to the ligands in the bacterial cell wall.

To date, there is only limited information available on the binding ligands of phage endolysins on the surface of *Listeria* cells. The aim of this thesis was to identify ligands that are recognized by CBDs of various highly specific *Listeria* phage endolysins. This included the biochemical characterization of wall teichoic acids (WTA) and the analysis of their serovar-specific genetic background, since very little is known about the biosynthesis of these anionic carbohydrate-containing cell wall polymers in *Listeria*. WTAs are receiving more and more attention as they promote interactions with enzymes, phages or even host cells. All findings of this thesis are described in four independent manuscripts.

In the first manuscript, a novel strategy is reported that enables the compositional characterization of WTA monomers by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). The new method is based on the analysis of chemically degraded WTAs and

successfully illustrated by WTA analysis of four different *Listeria* strains differing in carbohydrate substituents of their polyribitol-phosphate chain. This approach provides a significant advance in the identification of serovar-specific carbohydrates in WTAs from diverse bacterial strains without the need for gas chromatography or NMR spectroscopy.

The second part of the thesis describes the specific lectin-like interaction of CBDP35 of *Listeria* phage endolysin PlyP35 with carbohydrate residues in WTAs. Biochemical analysis using competitive binding assays revealed that the specificity of CBDP35 is based upon selective targeting to *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) substituents in WTAs on the cell surface of *L. monocytogenes*. Furthermore, two genes – *Imo2549* and *Imo2550* – were found to be involved in GlcNAc decoration of WTAs of *L. monocytogenes* serovar 1/2a strain EGDe. Additionally, the lack of GlcNAc in WTAs of *L. monocytogenes* strain WSLC 1442 could be assigned to two base pair deletions in gene *Imo2550*, which result in the synthesis of a truncated protein.

The third part presents genetic and biochemical evidence that the complete lack of WTA carbohydrates in the unusual *L. monocytogenes* serovar 7 strain WSLC 1034 is simply based upon two point mutations. GlcNAc deficiency is caused by a mutation in gene *Imo2550*, whereas the lack of rhamnose arises from a base pair deletion in the serovar 1/2-specific gene *Imo1083*, which is part of the rhamnose biosynthesis pathway. Hence, it is conceivable that strain WSLC 1034 actually is a mutant originating from a serovar 1/2 background. An approach to complement strain WSLC 1034 with functional *Imo1083* and *Imo2550* resulted in serovar 1/2-like WTAs substituted by both rhamnose and GlcNAc.

The fourth and last part characterizes the attachment site of the CBDs of *Listeria* phage endolysins Ply118, Ply511 and PlyP40. These proteins specifically interact with the directly cross-linked A1 γ peptidoglycan type of *L. monocytogenes*, as verified by binding assays using Δ *tagO* WTA-deficient *Listeria* mutants. Sequence analysis revealed two functionally redundant TagO homologues in *L. monocytogenes*, designated as TagO1 and TagO2, as demonstrated by constructing single and conditional double deletion mutants. Peptidoglycan-binding ability of CBD118, CBD511 and CBDP40 was further confirmed by binding studies using *Escherichia coli* peptidoglycan of the same chemotype.

Overall, this work provides the basis for understanding the molecular mechanisms of CBD-cell wall interactions and potential applications of *Listeria* phage endolysins as antimicrobial agents.

ZUSAMMENFASSUNG

Listerien sind nicht-sporenbildende, stäbchenförmige Gram-positive Bakterien, welche in der Natur weit verbreitet sind. Die Gattung *Listeria* umfasst acht verschiedene Spezies, wovon *Listeria monocytogenes* als Verursacher der Listeriose zu den opportunistischen, humanpathogenen Krankheitserregern zählt. Häufig äussert sich die Krankheit in Form von Meningitis, Enzephalitis, Sepsis oder Fehlgeburten, verbunden mit hohen Mortalitätsraten. Zu den Risikogruppen zählen insbesondere schwangere Frauen, Neugeborene, ältere und immungeschwächte Menschen. Listeriose-Erkrankungen erfolgen hauptsächlich durch den Verzehr von kontaminierter Nahrung, meistens durch Milchprodukte, rohes Fleisch, Fischprodukte und Gemüse. Um tödlichen Infektionen durch kontaminierte Lebensmittel vorzubeugen, werden spezifische und sensitive Methoden für die Detektion und Kontrolle von *L. monocytogenes* benötigt.

Bakteriophagen und ihre Enzyme bieten zahlreiche Möglichkeiten für die Entwicklung nützlicher Anwendungen im Bereich der Forschung, der Lebensmittelwissenschaften und der mikrobiellen Diagnostik. Als wirkungsvolle Antimikrobiotika und spezifische Hilfsmittel in der Molekularbiologie, Biotechnologie und Medizin besitzen insbesondere Phagenendolysine (Ply) grosses Potential. Endolysine sind Phagen-kodierte Enzyme, welche die Zellwände lysieren und am Ende des Phagen-Vermehrungszyklus¹ produziert werden. Endolysine von Phagen, die Gram-positive Bakterien infizieren, sind modular aufgebaut und bestehen aus zwei separaten funktionellen Domänen. Am N-Terminus des Proteins befindet sich die enzymatisch aktive Domäne (EAD), am C-Terminus die Zellwand-bindende Domäne (CBD), welche spezifische Liganden in der bakteriellen Zellwand erkennt.

Bislang ist nur wenig bekannt über die Bindungsstellen von Phagen-Endolysinen auf der Zellwandoberfläche von Listerien. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Liganden zu identifizieren, an welche die CBDs verschiedener hochspezifischer Listerienphagen-Endolysine binden. Dies umfasste sowohl die biochemische Charakterisierung von Zellwand-Teichonsäuren, als auch die Untersuchung entsprechender Serovar-spezifischer Gene, da das Wissen über die Biosynthese der anionischen und kohlenhydrathaltigen Zellwandpolymere in Listerien beschränkt ist. Bedingt durch ihre Interaktionen mit Enzymen, Phagen oder Wirtszellen erlangen die Zellwand-Teichonsäuren immer mehr an Beachtung. Die Ergebnisse dieser Studien sind in vier unabhängigen Manuskripten beschrieben.

Manuskript 1 beschreibt eine neue Strategie zur Untersuchung der Zusammensetzung von Zellwand-Teichonsäure-Monomeren mittels Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS). Die neue Messmethode basiert auf der Analyse von chemisch zersetzten Zellwand-Teichonsäuren und wird anhand der Untersuchung von vier verschiedenen Listerien-Stämmen veranschaulicht, die sich in ihren Kohlenhydrat-Substituenten an den Untereinheiten der Polyribitol-Phosphate unterscheiden. Dieser neue analytische Ansatz stellt einen entscheidenden Fortschritt für die Identifizierung von Serovar-spezifischen Kohlenhydraten in Zellwand-Teichonsäuren diverser Bakterienstämme dar, wobei weder Gas-Chromatographie noch NMR-Spektroskopie erforderlich sind.

Der zweite Teil der Arbeit beschreibt die spezifische, Lektin-ähnliche Wechselwirkung der CBDP35 des Listerienphagen-Endolysins PlyP35 mit Kohlenhydrat-Substituenten in Zellwand-Teichonsäuren. Biochemische Analysen mittels kompetitiver Bindungsstudien ergaben, dass CBDP35 spezifisch und selektiv an die *N*-Acetylglucosamin-Reste (GlcNAc) der Zellwand-Teichonsäuren von *L. monocytogenes* bindet. Des Weiteren wurden im *L. monocytogenes* Serovar 1/2 Stamm EGDe zwei Gene (*Imo2549* and *Imo2550*) identifiziert, die an der Glykosylierung von Zellwand-Teichonsäuren mit GlcNAc beteiligt sind. Im *L. monocytogenes* Stamm WSLC 1442, der einen GlcNAc-defizienten Phänotyp besitzt, wurden ausserdem zwei Basenpaar-Deletionen im Gen *Imo2550* entdeckt, welche für das Fehlen dieses Kohlenhydrat-Restes verantwortlich sind.

Der dritte Teil liefert den genetischen und biochemischen Beweis, dass die Abwesenheit von Kohlenhydrat-Substituenten in den Zellwand-Teichonsäuren des *L. monocytogenes* Serovar 7 Stammes WSLC 1034 einzig und allein auf zwei Punktmutationen zurückzuführen ist. Das Fehlen von GlcNAc wird durch eine Mutation im Gen *Imo2550* verursacht, während das Fehlen von Rhamnose auf einer Basenpaar-Deletion im Serovar-1/2-spezifischen Gen *Imo1083* basiert, welches Teil des Biosynthese-Weges von Rhamnose ist. Deshalb ist davon auszugehen, dass WSLC 1034 eigentlich eine Mutante eines Serovar 1/2 Stammes ist. Die Komplementierung des Stammes WSLC 1034 mit den funktionellen Genen *Imo1083* und *Imo2250* führte zu Serovar-1/2-artigen Zellwand-Teichonsäuren, welche typischerweise mit Rhamnose und GlcNAc substituiert sind.

Der vierte und letzte Teil dieser Arbeit charakterisiert den Liganden, der von den CBDs der Listerienphagen-Endolysine Ply118, Ply511 und PlyP40 gebunden wird. Diese Proteine interagieren spezifisch mit dem Peptidoglykan-Typ A1 γ von *L. monocytogenes*, wie mittels

Bindungstests mit *Listeria* Δ *tagO*-Mutanten, welchen Zellwand-Teichonsäuren fehlen, bestätigt wurde. Sequenz-Analysen brachten zwei funktionell redundante Proteine in *L. monocytogenes* zum Vorschein, die homolog zu TagO sind und als TagO1 und TagO2 bezeichnet wurden. Mehrere Konstrukte mit Einzel- und Doppel-Deletionen bestätigten die Redundanz dieser Proteine. Bindungsstudien mit Peptidoglykan von *Escherichia coli*, welches ebenfalls zum Chemotyp A1 γ gehört, untermauerten die Fähigkeit der CBD118, CBD511 und CBDP40, ans Peptidoglykan zu binden.

Insgesamt schafft diese Arbeit eine Grundlage sowohl für ein besseres Verständnis der molekularen Wechselwirkungsmechanismen zwischen CBDs und Zellwänden, als auch für mögliche Anwendungen von Listerienphagen-Endolysinen als Antimikrobiotika.