

Engineering of bacteriophage endolysins for the control and detection of bacterial pathogens

Doctoral Thesis

Author(s):

Eichenseher, Fritz

Publication date:

2011

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006992886>

Rights / license:

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

Diss. ETH No. 20079

ENGINEERING OF BACTERIOPHAGE ENDOLYSINS FOR THE CONTROL AND DETECTION OF BACTERIAL PATHOGENS

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
FRITZ EICHENSEHER
Diplom Lebensmittelingenieur (ETH)

born July 5, 1977

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin J. Loessner, examiner
Prof. Dr. Brigitte Berger, co-examiner

2011

ABSTRACT

Selected species of the Gram-positive genera *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, and *Staphylococcus* are the causative agents of a wide variety of diseases in humans and animals and are frequently implicated in food poisoning. Anthrax is caused by *Bacillus anthracis*, and *Bacillus cereus* is responsible for an emetic and diarrheal type of food poisoning. Major pathogenic species of the anaerobic, spore forming *Clostridium* genera include *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. tetanii*, and *C. perfringens*. The latter is associated with a variety of symptoms, ranging from myonecrosis (gas gangrene) and necrotic enteritis, to food poisoning and non-food borne gastrointestinal infections, and has a significant economic impact on the poultry industry. As the only human pathogenic member of the *Listeria* genus, *Listeria monocytogenes* is transmitted via contaminated foods and causes severe listeriosis symptoms including meningitis, encephalitis, and septicemia in susceptible people. The genus *Staphylococcus* comprises almost 50 species with several, mainly coagulase-positive severe human pathogens. As the most prominent pathogenic representative of this genus, *S. aureus* can cause a long list of illnesses including skin infections, pneumonia, meningitis, osteomyelitis, endocarditis, toxic shock syndrome, bacteremia, sepsis and food associated gastroenteritis. The emergence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains has become a major threat to human health and challenges current antibiotic therapy.

Bacteria-infecting viruses (bacteriophages, or phages) are the bacteria's natural enemies. Phages provide huge resources for the development of novel bacterial control and/or detection agents with applications in medicine, molecular biology, biotechnology, food technology, and research. At the end of the lytic cycle of bacteriophage propagation, the vast majority of phages achieve virion particle release from host cell cytosols by peptidoglycan degradation with specialized cell wall lytic enzymes termed phage lysins or endolysins. In Gram-positive bacterial species, the peptidoglycan is exposed to the environment allowing externally added endolysins access to their target and thus the development of its lytic killing effect on target bacteria. Endolysins are built of two or more individually folded domains with specialized functions that are usually encoded on a single polypeptide. The catalytic module responsible for cleavage of essential bonds in the peptidoglycan layer is mostly located at the N-terminal site of the protein and, if present, as a second catalytic domain in the central portion of the protein. Mostly C-terminal cell wall binding domain (CBD) functions in substrate recognition, high affinity binding, and enzyme immobilization on cell wall associated components. This modular structure allows the rational design and artificial creation of chimeric enzymes with (I) novel, tailor-made bactericidal properties or (II) novel and highly sophisticated bacterial detection properties useful in labeling and detection.

The present thesis describes the molecular engineering of endolysins with optimized properties for the control and detection of Gram-positive bacterial pathogens. First, we characterized a novel endolysin from *Staphylococcus* phage Φ 2638a. The Ply2638 enzyme and several engineered derivatives with domain deletions or substitutions from different origin indicated synergistic effects of multiple enzymatically active domains (EAD), and the requirement for cell binding properties. Lysis kinetics of Ply2638 and its derivatives were optimized according to pH, buffer salt concentration and catalytic metal-ion substitution. N-terminal supplementation with a CHAP11 domain shifted the pH optimum from physiological to slightly acid conditions and significantly increased catalytic activity. Up to 2.5 fold increase in lysis velocity was found after Mn^{2+} substitution for the residual Zn^{2+} . Duplication of the CBD accelerated lysis under several test conditions, including enhanced activities under basic conditions and at higher salt concentrations. A chimeric construct with Ply2638 endopeptidase domain substituted by a homologues domain from lysostaphin was found superior to unmodified Ply2638 at protein concentrations or 50 nM and higher. Both proteins were prepared for long-term storage by lyophilization without any loss of activity. Finally, the inactive recombinant lysin Ply3a regained activity following CBD substitution. We performed a comprehensive *in silico* analysis that enabled domain boundary prediction, facilitating precise chimeric protein construction. The cell wall binding domain of Ply2638 and a representative set of CBDs of seven other staphylococcal SH3b homologues domains (CBD11, CBD3a, CBDK, CBDP68, CBDTw, CBDWMY, and CBDHaemo) were fused to fluorescent reporter proteins and subjected to cell binding studies using fluorometric and microscopic techniques. Binding of all SH3_5 homologues domains was genus specific and independent of the presence of bacterial antibiotic resistances. No binding function was observed for CBD3a, the only domain with SH3_3 homology. Peptidoglycan together with an intact pentaglycine cross-bridge could be identified as CBD binding epitope and wall teichoic acids (WTA) were found to interfere with CBD binding. We found strong indications that non-covalent CBD-cell wall interactions are highly dependent on charge differences. Acidic pH values increased binding and binding affinities considerably, while increasing salt concentrations were found to attenuate CBD-cell wall interactions to a certain degree. Tandem and triple arrays of CBD2638 proteins strongly enhanced affinities to the staphylococcal cell wall, determined with surface plasmon resonance (SPR). Various engineered GFP-CBD proteins were covalently coated onto paramagnetic beads for CBD-magnetic separation (CBD-MS) applications. *Staphylococcus* cell immobilization and recovery from diluted mono-cultures using the CBD functionalized beads yielded rates of 80% and higher. The use of constructs with different affinities in combination with different fluorescence labels also enabled tracking of peptidoglycan during growth and cell division.

Another endolysin studied originates from bacteriophage Φ S9 and targets *C. perfringens*. Without exception, all 54 *C. perfringens* strains tested were found susceptible to the putative glycosylhydrolase PlyS9, with absolute specificity towards this species. The activity optimum was at 6.5, matching the pH of chicken intestinal tract contents, which suggests it an interesting enzyme for potential substitution of conventional antibiotics in poultry farming. Selected divalent metal-cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Mn^{2+}) enhanced activity in a concentration dependent manner, whereas other ions (Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , and Zn^{2+}) inactivated the enzyme. Truncations of either, the EAD or CBD, resulted in loss of activity, indicating that both domains are necessary for enzymatic activity. Binding studies of GFP-CBDS9 indicated that stringent specificity of PlyS9 is mediated by the presence of a *C. perfringens* specific CBD binding epitope. We measured an average of 1.3×10^6 CBDS9 binding sites per cell. The use of novel nano-sized magnetic bead (TurboBeads-Carboxy) for CBD-MS facilitated the specific immobilization and separation of more than 90% *S. aureus* and close to 100% *B. cereus* cells directly from growth medium. Approximately 70-80% *S. aureus* cells were recovered from artificially contaminated food suspensions. The technique allows easy sample preparation for subsequent molecular detection and quantification methods. For *Bacillus* CBD-MS, we used the novel endolysin CBD of *B. anthracis* phage Φ WPh. CBDWPh was characterized together with three other endolysin CBDs from *B. cereus* phages Φ CP-51, Φ CP-54, and Φ TP21-T. *In silico* homology analysis revealed unique CBD structures in all four CBDs that were accompanied by conserved amidase domains. GFP-fusions to each CBD indicated slightly different binding patterns on the surface of *B. cereus*. Recombinant GFP-CBD-CP-51 protein did not bind any of the strains tested. Full length endolysin PlyCP-51 was also found inactive under normal test conditions. PlyTP21-T and PlyWPh were both active on *B. cereus* cells, but suffered from cold-denaturation. The latter was successfully stabilized by freeze-drying, and had a narrow pH optimum between 7 and 8. Finally, we produced and characterized several novel endolysins and chimeric fusion proteins targeting *Listeria* species. The lysin of *Listeria* phage P70 represents a natural chimera of Ply500 and Ply511 *Listeria* endolysins. It features high residual activities under slightly acidic conditions. A series of chimeric proteins with EADs of various origins and broad binding range CBDP40 were constructed. *Listeria* Ply511 and the *Bacillus* Ply21-L amidase domains especially boosted activities at low protein concentrations. In conclusion, the results of this work demonstrate the potential of engineered lysins for applications as novel antibiotics, and as tools for immobilization, labeling, and diagnostics.

ZUSAMMENFASSUNG

Viele Gram-positive Bakterien wie Bacillen, Clostridien, Listerien und Staphylokokken sind tierische und menschliche Krankheitserreger und können teilweise ernsthafte Lebensmittelvergiftungen verursachen. So wird beispielsweise Milzbrand (Anthrax) von *Bacillus anthracis* hervorgerufen. Ein anderer *Bacillus* Stamm, *Bacillus cereus*, verursacht Lebensmittelvergiftungen, welche durch Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und/oder Durchfall gekennzeichnet sind. Zu den wichtigsten pathogenen Clostridienarten gehören der Botulismus Erreger *C. botulinum*, der Tetanus Erreger *C. tetanii*, der Durchfall Erreger *C. difficile* sowie *C. perfringens*. Eine Infektion mit *C. perfringens* kann sich in einer Vielzahl von Krankheitssymptomen äussern, wie z.B. Gasbrand, nekrotischen Darmentzündungen oder Lebensmittelvergiftungen. In der Geflügelhaltung wird der Erreger für beträchtliche ökonomische Verluste verantwortlich gemacht. *Listeria monocytogenes*, der einzige humanpathogene Vertreter der Listerien, verursacht Blutvergiftungen (allgemeine Sepsis), Gehirnentzündungen (Enzephalitis) und Hirnhautentzündungen (Meningitis). Die Gattung *Staphylococcus* umfasst beinahe 50 Arten, von denen einige Vertreter insbesondere die sogenannten "Koagulase positiven" Staphylokokken sehr schwerwiegende Infektionen verursachen können. Eine Infektion mit *S. aureus* kann zu schwerwiegende Entzündungen der Haut, der Hirnhaut, der Lunge, des Knochenmarks, und der Herzklappen führen. Weiter kann *S. aureus* das Toxische Schocksyndrom, Blutvergiftungen und durch Lebensmittel übertragene Magen-Darmerkrankungen hervorrufen. Durch den Erwerb von Resistenzen gegen mehrere wichtige Antibiotika sind Methicillin-Resistente *S. aureus* (MRSA) Stämme entstanden. Diese stellen eine besondere Gefahr für die menschliche Gesundheit dar, weil dadurch konventionelle Antibiotikatherapien oft wirkungslos geworden sind.

Viren, welche Bakterien infizieren werden Bakteriophagen (oder kurz "Phagen") genannt und sind die natürlichen Feinde der Bakterien. Phagen sind eine wichtige Ressource für die Entwicklung neuer Technologien zur Kontrolle und Detektion von bakteriellen Krankheitserregern. In der Medizin, der Molekularbiologie, der Biotechnologie, der Lebensmitteltechnologie und in der Forschung könnten Phagen-basierte Technologien zunehmend an Bedeutung gewinnen, beispielsweise durch die Anwendung von Endolysinen. Diese werden am Ende des lytischen Vermehrungszyklus von Bakteriophagen produziert um die Zellwand der Bakterien-Wirtszelle zu zersetzen. Das Zersetzen der bakteriellen Zellwand führt zum Platzen der Wirtszelle (Lyse) und damit zur Freisetzung der neu gebildeten Phagenpartikel. In Gram-positiven Bakterien ist die Peptidoglykanschicht der Zellwand direkt der unmittelbaren Umgebung ausgesetzt. Somit können Endolysine, auch wenn sie von aussen Bakterienzellen zugegeben werden, durch den Kontakt zur Peptidoglykanschicht ihre volle lytische Wirkung entfalten.

Endolysine sind aus mehreren, unabhängig voneinander gefalteten Domänen aufgebaut, welche normalerweise auf einem einzelnen Polypeptid-Strang kodiert sind. Die katalytische Einheit (enzymatisch aktive Domäne, EAD), welche essentielle Bindungen der Peptidoglykanschicht zerschneidet, liegt meist am Amino Ende des Proteins. Eine Zweite EAD kann zusätzlich auch noch in der Mitte des Endolysins liegen. Die Zellwand-bindende Domäne (CBD), welche am Carboxy Ende des Proteins liegt, bindet je nach Gattung, Art, oder sogar Stamm hochspezifisch an bestimmte Zellwandbestandteile. Durch die ausgesprochen starken Wechselwirkungen mit den speziellen Zellwandbestandteilen wird das Enzym (Endolysin) gebunden und immobilisiert.

Der modulare Aufbau der Endolysine mit unterschiedlichen Domänen (EAD und CBD) erlaubt die gezielte Herstellung von Fusionsproteinen. Dabei werden einzelne Endolysin-Domänen aus anderen Bakteriophagen ausgetauscht oder hinzugefügt. Derartige Fusionsproteine können mit verbesserten und/oder neuen massgeschneiderten keimtötenden Wirkungen ausgestattet sein, oder als neuartige Reagenzien für die bakterielle Detektion dienen.

In der vorliegenden Arbeit wird die molekulare Konstruktion von mit optimierten Eigenschaften zur Kontrolle und Detektion Gram-positiver Krankheitserreger geschildert. Zu Beginn geht es um die Beschreibung eines neuen Endolysins (Ply) des *Staphylococcus* Φ 2638a Phagen. Aus Ply2638 wurden verschiedene Fusionen dieses Proteins mit eliminierten, zusätzlichen, oder ausgetauschten Domänen konstruiert. Mehrere in einem Molekül vorhandene EADs zeigten dabei einen deutlich synergistischen Effekt in ihrer lytischen Wirkung. Weiter war die Lyseaktivität abhängig von einer funktionierenden Zellwandbindung durch CBDs. Die Lyse-Aktivitäten von Ply2638 und seinen Abkömmlingen wurden in Bezug auf pH-Wert, Salzkonzentration und durch Austausch geeigneter zweiwertiger Metall-Ionen optimiert. Die Fusion einer zusätzlichen Cystein-Histidin abhängiger Amidase/Peptidase Domäne (CHAP) vom Endolysin Ply11 an das Amino Ende von Ply2638 verschob das pH Optimum von physiologischen Bedingungen hin zum leicht sauren Bereich und verstärkte die Lyseaktivität beträchtlich. Eine bis zu zweieinhalbfache Aktivitätssteigerung der Lyse konnte durch den Metall-Ionen Austausch mit Mn^{2+} erreicht werden. Die Aneinanderreihung von zwei gleichen CBD Domänen beschleunigte die Lyse bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen, z.B. im basischen Bereich oder bei erhöhter Salzkonzentration. Ein Fusionsprotein, bei welchem eine EAD von Ply2638 durch eine homologe Endopeptidase Domäne von Lysostaphin ausgewechselt wurde, funktionierte besonders gut. Beide Proteine, das Fusionsprotein mit der Lysostaphin Domäne und Ply2638 wurden mittels Gefriertrocknung ohne Aktivitätseinbußen konserviert. Schlussendlich konnte am Beispiel des *Staphylokokkus* Phagen 3a Endolysins (Ply3a) gezeigt werden, dass durch den einfachen Austausch der CBD ein bisher inaktives Lysin

funktionsfähig gemacht werden konnte. Es ist eine umfassende *in silico* Analyse durchgeführt worden, welche eine Abschätzung der Domänen-Grenzen ermöglicht und dadurch die präzise Konstruktion von *Staphylococcus* Fusionsproteinen vereinfacht. Die CBD von Ply2638 zusammen mit sieben weiteren homologen *Staphylococcus* SH3_3 und SH3_5 Domänen (CBD11, CBD3a, CBDK, CBDP68, CBDTw, CBDWMY und CBDHaemo) wurden mit dem grün fluoreszierenden Reporterprotein GFP fusioniert und eine Reihe fluorometrischer und mikroskopischer Untersuchungen durchgeführt. Die Funktionsmuster aller Domänen mit SH3_5 Homologie waren Gattungsspezifisch und unabhängig vom Vorhandensein bakterieller Antibiotikaresistenzen. Der zelluläre Bestandteil an den die CBD bindet, wurde als die intakte Pentaglycin-Peptidbrücke des Peptidoglykan identifiziert. Teichonsäuren (WTA), die in der Zellwand verankert sind, machten hingegen einige Bindestellen für CBDs unzugänglich und verhinderten das Binden weiterer CBD-Moleküle. Es gibt Hinweise darauf, dass die nicht-kovalenten CBD-Zellwand Interaktionen stark von Ladungsdifferenzen zwischen der Zelloberfläche und den CBDs abhängen. Tiefe pH-Werte begünstigten diese nicht-kovalenten CBD-Zellwand Interaktionen und höhere Salzkonzentrationen schirmten die Interaktionen bis zu einem gewissen Grade ab. Einige künstliche Fusionsproteine mit verdoppelter und verdreifachter CBD2638 in linearer Abfolge zeigten bis zu 20.000-fach verstärkte Bindungsaffinitäten zu der bakteriellen Zellwand. Verschiedene GFP-CBD Fusionsproteine wurden als Überzug auf paramagnetische Partikel kovalent gebunden und als Anwendung für ein CBD-magnetisches Separationsverfahren (CBD-MS) verwendet. Mit Hilfe dieser funktionalisierten paramagnetischen Partikeln konnten 80% und mehr der Bakterien aus verdünnten Staphylokokken-Kulturen gebunden und anschließend separiert werden. Schliesslich konnte durch die Anwendung von CBDs mit unterschiedlichen Affinitäten in Kombination mit unterschiedlich farbig fluoreszierenden Reportermolekülen die Peptidoglycan-Neogenese während des Wachstums und der Zellteilung nachverfolgt werden.

Das Endolysin PlyS9 des *Clostridium perfringens* Phagen Φ S9 detektiert und tötet *C. perfringens*. Alle 54 getesteten *C. perfringens* Stämme wurden von PlyS9 lysiert. Bei dem Enzym handelt es sich wahrscheinlich um eine Glycosylhydrolase, die eine ausserordentlich hohe Spezifität für diese Bakterienart aufweist. Da das Lyseaktivitäts-maximum des Enzyms bei pH 6.5 liegt und das etwa dem pH des Darminhaltes von Geflügel entspricht, sind gute Voraussetzungen für eine mögliche Anwendung des Endolysins als Ersatz für konventionelle Antibiotikatherapie in der Geflügelzucht gegeben.

Bei dem Zusatz zweiwertiger Metall-Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+}) konnte die enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der Konzentration erhöht werden. Andere zweiwertige Metal-Ionen (Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+}) inaktivierten das Enzym hingegen vollständig. Die Eliminierung einer der beiden PlyS9 Domänen (EAD oder CBD) führte ebenso zur

Enzyminaktivierung, welches darauf hinweist, dass beide Domänen für die Aktivität notwendig sind. Weitere Studien mit GFP-CBDS9 Fusionsproteinen haben gezeigt, dass die strikte Spezifität von PlyS9 im Zusammenhang mit einem nicht bekannten *C. perfringens* spezifischem Oberflächenmolekül stehen muss. Die Anzahl der CBD Bindestellen auf einer durchschnittlichen Zelloberfläche beträgt 1.3×10^6 Liganden.

Durch die Verwendung neuartiger magnetischer Nano-Partikel in der CBD-MS Technologie konnten mehr als 90% *S. aureus* und beinahe 100% *B. cereus* Zellen direkt aus Nährmedien isoliert werden. Aus komplexen kontaminierten Lebensmittelproben konnten mit diesen CBD funktionalisierten magnetischen Nano-partikeln 70-80% *S. aureus* isoliert werden. Diese Technologie erlaubt ausserdem eine einfache Probenvorbereitung für nachfolgende molekulare Nachweis- und Quantifizierungsmethoden.

Für die *Bacillus* spezifische CBD-MS Anwendung wurden neue Endolysine des *B. anthracis* Phagen Φ WPh (CBDWPh) verwendet. CBDWPh wurde zusammen mit drei weiteren Endolysin CBDs der *B. cereus* Bakteriophagen Φ CP-51, Φ CP-54 und Φ TP21-T charakterisiert. Ein Vergleich der *Bacillus* Endolysine untereinander mit bereits bekannten Endolysinen deutete auf einzigartige Strukturen der vier CBDs hin, welche jeweils durch hoch konservierte Amidase-Domänen ergänzt werden. Fusionsproteine von GFP und jeder der vier CBDs zeigten auch im Versuch unterschiedliche Fluoreszenz-Intensitäten und leicht unterschiedliche Bindemuster auf der Zelloberfläche von *B. cereus*. Für das rekombinante Protein GFP-CBDCP-51 konnte allerdings keine Zellwandbindung gezeigt werden. Das Endolysin PlyCP-51 war unter normalen Testbedingungen ebenfalls nicht aktiv. PlyTP21-T und PlyWPh hatten zwar eine hohe Aktivität, zeigten aber bei Kälte-Exposition thermodynamische Instabilität. PlyWPh konnte durch Gefriertrocknung dennoch lagerfähig gemacht werden und zeigte ein enges Aktivitätsoptimum bei pH 7-8.

Weiter wurden neue *Listeria* Phagen-Endolysine und chimäre Fusionsproteine hergestellt und charakterisiert. Das Endolysin des *Listeria* Phagen P70 ist eine natürliche Chimäre aus den *Listeria* Endolysinen Ply500 und Ply511. Es zeichnete sich besonders durch eine relative hohe Restaktivität im leicht sauren pH Bereich aus. Eine Serie von Fusionsproteinen mit EADs unterschiedlichen Ursprungs kombiniert mit CBDP40 wurde konstruiert. Besonders die *Listeria* Ply511 und *Bacillus* Ply21-L Amidase-Domänen erhöhten die Aktivitäten bei tiefen Proteinkonzentrationen um ein Vielfaches.

Zusammenfassend kann mit dieser Arbeit das grosse Potential von modifizierten Endolysinen gezeigt werden: Einerseits in der Anwendung als neuartiges Antibiotikum und andererseits als Instrument für Bakterielle-Detektionsmethoden in diagnostischen Verfahren, sowie das Bereitstellen nützlicher Werkzeuge zur spezifische Markierung von Zelloberflächen in der Grundlagenforschung.