



Doctoral Thesis

## Role of a Toxin-Antitoxin System in *L. monocytogenes*

**Author(s):**

Schmitter, Sibylle

**Publication Date:**

2014

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010361701> →

**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 NO. 22359

**Role of a Toxin-Antitoxin System in *L. monocytogenes***

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Sibylle Schmitter  
Master of Science (Technische Universität München)

born on 18.09.1984

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Martin J. Loessner*  
*Prof. Dr. Lars Fieseler*

2014

## II. SUMMARY

Toxin-antitoxin (TA) systems are small genetic elements, originally identified on plasmids. In general, these modules consist of two small genes encoding for a stable toxin and its labile counterpart. Plasmid-encoded TA modules contribute to plasmid maintenance by selective killing of plasmid free daughter cells. This process of post-segregational killing is based on differences in protein stability. After plasmid loss, the level of the degradation-prone antitoxin is reduced, which liberates the toxin. Depending on the TA system, important cellular processes are targeted which may result in cell death. Homologs to the several known plasmid-encoded TA systems can also be found in the chromosomes of bacteria and archaea, however, their distinct role remains elusive. Functions like the stabilization of conjugative transposons or temperate bacteriophages are obvious, however location of TA loci randomly distributed in the chromosome indicate a role despite the stabilization of integrated elements. Based on the observation that free-living bacteria generally contain much more TA modules than obligate intracellular organisms, it is strongly believed that TA loci are stress responsive elements representing an alternative survival strategy of bacterial populations under various conditions.

*Listeria monocytogenes* is a Gram positive, rod-shaped pathogenic bacterium well adapted to life in soil and in mammalian host cells. *Listeria* can survive diverse environmental stresses and due to their remarkable ability to adapt to and manipulate mammalian hosts for their requirements, *Listeria* has become an useful model organism to study host-pathogen interactions. The alternative sigma factor *sigB* is one of the key players for survival of the harsh environmental conditions to where *Listeria* is exposed. Within the *sigB* operon, a putative *mazEF*-like system was identified in *Listeria*. The location of the two genes within the *sigB* operon indicates a role in the stress response regulation. The aim of this thesis was to investigate and understand the role of this putative *mazEF*-like system in *L. monocytogenes* - programmed cell death inducer, stress modulator or selfish element – regarding its survival during stress exposure and pathogenicity.

Stringent and tight regulation of gene expression is a prerequisite for the investigation of gene function in bacteria. As controlled induction systems are rare in *Listeria* but essential for determination of the role of the putative *mazEF*-system, the TetR-regulatory system was adapted to *L. monocytogenes*. Stringency and induction ability was tested using *gfp* as a reporter molecule. Repression efficiency was found to be dependent on the amount of TetR present in the cell with 99% repression efficiency by using the synthetic promoter Pt<sub>17</sub>. Verification of the TetR-dependent regulatory efficiency intracellularly was performed using controlled expression of *actA* and

detection of *Listeria* movement within Ptk2 epithelial kidney cells. In contrast to other systems, fast and strong induction was also observed within eukaryotic cells. Obtained data thereby confirmed the applicability of the TetR system in *Listeria* and allowed further usage during the characterization of the TA system.

In the study conducted here, evidences for the functionality of the *mazEF*-like system in *Listeria* were provided. Both genes, *Imo0887* and *Imo0888* encoding the putative TA system, were found to be upstream of *sigB* and transcribed within a polycistronic operon including the alternative sigma factor. Tiling array analysis revealed that *sigB* was apparently not affected by the deletion of both genes. However, the TA loci seem to influence the *sigB* regulon, as 26 out of 54 putative *sigB* regulated genes were found to be suppressed in the mutant. Various experiments where *Listeria* and its mutants were exposed to stress however, could not assign a distinct role to the system. Detailed analysis of the role of the single genes was further performed using the TetR-regulatory system. Toxin induction was shown to induce persistence and increased survival during nutrient starvation in a *mazEF*-negativ background. Though, overexpression or deletion of genes does not reflect conditions found in nature where e.g. MazE is prone to be degraded specifically by proteases. Therefore, controlled gene regulation of *mazE* enabled us to create optimal conditions closer to the transcriptional or post-translational modifications by which MazE is regulated. Liberated MazF had several effects on growth and morphology but only exhibited moderate toxicity in *Listeria*. Following inactivation of the antitoxin gene, we could show that *mazE* is neither essential for survival nor affects pathogenicity of *L. monocytogenes*.

MazF was demonstrated to process RNA. A synthetic RNA oligonucleotide was designed and MS analysis was applied to determine the specific recognition site of MazF. The cleavage at UAC(A/C)U sequences could be verified. Beyond cleavage of mRNA, rRNA was also targeted by the toxin MazF. SPR analysis revealed strong binding affinities between the proteins which was further confirmed by inhibition of RNA degradation by co-incubation of MazE and MazF.

Phages are the natural enemies of bacteria and are enrolled in evolutionary processes. Infection by phages is one of the most likely “stress” bacteria are exposed to within their ecological niches. Studying the effect of *mazEF* on phage infection, we found that MazF has a remarkable impact on the infection ability of the temperate bacteriophage A118. Further studies revealed that MazF, due to its specific endoribonuclease activity, seem to intervene in A118 infection and regulation of lysogeny. Consequently, reconstruction of all mutants in a *L. monocytogenes* strain devoid of any prophages was performed to be able to exclude bias by the A118 like prophage present in EGDe.

Similar data were thereby obtained when compared to EGDe. Free MazF resulted in increased plaque forming ability of the temperate phages A118 and A006, whereas for the lytic phage P70,

reduced infectivity was observed. During screening of the WSLC1001 genome for phage regulatory elements, a type II CRISPR-cas system was identified, which contains several UAC(A/C)U cleavage sites. qPCR analysis revealed altered RNA levels of the CRISPR-associated endonuclease *csn1* gene in the presence of MazF. The data obtained provided evidence that MazF is able to modulate the expression of CRISPR elements by specific RNA cleavage. To verify if this could mediate changes in phage infection diverse CRISPR related deletion mutants were constructed. Altered regulation of *csn1* also resulted in significant fewer plaques for P70 compared to A118, where plaque formation was increased. These results are comparable with the data obtained when free MazF was present in the cell.

Overall, the results presented here provide insights into the role of the *mazEF*-like system in *Listeria* with respect to its survival in its natural environment. Connection of *mazEF* to the regulation of CRISPR elements further increases the complexity of networks TA modules are involved in. The versatility of TA modules is challenging, and much more research has to be performed to fully understand the importance of TA modules for bacteria.

### III. ZUSAMMENFASSUNG

Toxin-Antitoxin (TA) Systeme sind weitverbreitete Genelemente bestehend aus einem stabilen Toxin und seinem durch Protease leicht abbaubaren Antitoxin. Ursprünglich wurden TA Systeme auf Plasmiden entdeckt und sind verantwortlich für deren Stabilität in der Zelle. Kommt es während der Zellteilung zum Plasmidverlust, findet die Transkription beider Gene in der Zelle nicht länger statt. Durch den raschen, Protease-abhängigen Abbau des Antitoxins kommt es folglich zur Freisetzung des Toxins. Dieses kann entsprechend an seinen Zielmolekülen binden, essentielle zelluläre Prozesse stören und dadurch den Zelltod induzieren (post-segregational killing). Homologe zu Plasmid-basierenden TA Modulen wurden auch im Genom verschiedenster Bakterien und Archaeobakterien gefunden, jedoch ist die Rolle dieser nicht eindeutig definiert. Da die TA Systeme an verschiedenen Orten im Genom der Bakterien gefunden werden können, wird vermutet, dass sie neben der Stabilisierung von Transposon-Elementen oder Prophagen weitere Funktionen übernehmen. Die Tatsache dass freilebende Bakterien, welche sich entsprechend an ihre Umwelteinflüsse anpassen müssen eine höhere Anzahl an TA Systemen enthalten als obligate intrazelluläre Pathogene lässt die Vermutung zu, dass diese Systeme in der Stressantwort der Bakterien auf äussere Einflüsse involviert sind.

*Listeria monocytogenes* ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges, krankheitserregendes Bakterium und Auslöser von Listeriose. *L. monocytogenes* ist ubiquitär verbreitet und ausserordentlich gut an seine Umwelt angepasst. Seine Fähigkeit verschiedenste Stressbedingungen zu überleben sowie sich intrazellulär anzupassen und zu vermehren führte dazu, dass *L. monocytogenes* zu einem Modellorganismus für das Studium von Wirt-Pathogen Interaktion verwendet wird. Ein wichtiger Regulator für die Anpassung an veränderte Umwelteinflüsse ist der alternative sigma Faktor *sigB*. Die Analyse des *sigB* Operons in *L. monocytogenes* führte zur Identifizierung eines *mazEF*-ähnlichen TA Systems. Durch die Lokalisation innerhalb des *sigB* operons wird ein Einfluss auf die Stressantwort in *Listeria* vermutet. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des *mazEF*-ähnlichen TA Systems hinsichtlich seiner Eigenschaften bezüglich der Stressantwort und Pathogenität von *L. monocytogenes*.

Als Grundlage für die Untersuchung von speziell toxischen Genen und deren Einfluss auf die Zelle werden regulierbare und induzierbare Promotorsysteme benötigt. Nur eine geringe Anzahl solcher Systeme sind für Listerien bekannt und bieten die entsprechende regulatorische Effizienz. Auf Grund dessen wurde im ersten Teil der Arbeit das TetR-basierte Promotorsystem für Listerien etabliert. Mittels GFP als Reportermolekül wurde die Effizienz der Aktivierung und Repression des

Promoters untersucht. Die Stärke des detektieren Fluoreszenzsignals variierte abhängig von der Menge an TetR in der Zelle. Durch die Verwendung des starken synthetischen Pt<sub>17</sub> Promotors konnte so im Vergleich zum Rhamnose abhängigen Promotor P<sub>rha</sub> eine Repression von 99 % erreicht werden. Aktivierung durch die Zugabe von 0.4 µM Anhydrotetracycline (ATc) führte zu ausreichender Genexpression. Die Funktionalität des Promotorsystems, die Genexpression zu aktivieren und zu reprimieren, wurde zusätzlich in Zellkultur unter Verwendung der PtK2 Zelllinie getestet. Der Aktinnukleationsfaktor ActA, welcher die Bewegung von *L. monocytogenes* intrazellulär gewährleistet, fungierte hierbei als Reporter. Abhängig von TetR und der Menge an zugebenen ATc zur Aktivierung des Promotors konnte die Bildung von Aktinschweiften beobachtet werden. Ohne die Zugabe von ATc wurde keine Aktin rekrutiert, was die starke Repression des Promotors und dessen Funktionalität intrazellulär aufzeigt. Auf Grund der Eigenschaften und der Robustheit des TetR-basierten Genexpressionsystems konnte im Folgenden das *mazEF*-ähnliche TA System in Listerien untersucht werden.

Durch Genomvergleiche von *Listeria spp.* mit anderen Gram-positiven Organismen wie *B. subtilis* und *S. aureus* konnte ein *mazEF*-ähnliches System, codiert durch die Gene *Imo0887* und *Imo0888*, identifiziert werden. Beide Gene befinden sich innerhalb des *sigB* Operons und werden entsprechend polycistronisch mit *sigB* und seinen Regulatoren transkribiert. Tiling-Array Daten zeigten dass die Deletion beider Gene keinen Einfluss auf *sigB* hat, jedoch auf die Transkription verschiedenster Gene die durch *sigB* reguliert werden, verändert. Insgesamt 26 der 52 im *sigB* Regulon enthaltenen Gene werden durch die Deletion von *mazEF* herunterreguliert. Die Durchführung verschiedenster Versuche zur Bestimmung des Einflusses von *mazEF* auf die Stressantwort von Listerien jedoch zeigten keinen direkten Einfluss. Betrachtet man aber die Komplexität des Systems und die Vielzahl von Bedingungen denen Listerien ausgesetzt sein können, ist es möglich dass die entsprechende Voraussetzung für die Aktivierung und den Einfluss des *mazEF* Systems noch nicht getestet wurden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die einzelnen Proteine, MazE und MazF, aufgereinigt und auf ihre Funktionalität untersucht. MazF konnte als Endoribonuklease identifiziert werden, welche die spezifische Schnittstelle UAC(C/A)U erkennt und schneidet. Durch die Überproduktion von MazF in *L. monocytogenes* konnte nicht nur mRNA sondern auch rRNA als Zielmolekül identifiziert werden. Die Verwendung von Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie erlaubte weiterhin die Bestimmung einzelner Affinitätskonstanten und die Bestätigung der MazE/MazF Interaktion. Diese wurde zusätzlich noch in RNase-Inhibitions-Versuchen verifiziert.

Im letzten Teil der Arbeit wurde das *mazEF*-System noch in Bezug auf seinen Einfluss während der Phageninfektion untersucht. Betrachtet man die Vielzahl an Phagen in der natürlichen

Umgebung von Bakterien und die Wichtigkeit der entsprechenden Abwehrsysteme für das Überleben der Population, könnten entsprechende TA Systeme, ob durch Zelltod oder Dormanz, sicherlich in entsprechende Abwehrprozesse involviert sein.

Ein Überschuss von MazF führte zur erhöhten Plaquebildung des temperenten Phage A118. Um den Einfluss von MazF auf die Lysogenie von A118 zu untersuchen wurde WSLC1118 verwendet, welcher den intakten A118 trägt. Prophageninduktion durch Mitomycin C und zusätzliche Produktion von MazF hatte einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl Phagen im Überstand. Da *L. monocytogenes* EGDe einen A118-ähnlichen Phagen in seinem Genom trägt, wurden die weiteren Versuche in einem *L. monocytogenes* Stamm durchgeführt, welcher keine relevanten Prophagen beinhaltetete (WSLC1001).

Durch die Verwendung dieses Stammes konnte ausgeschlossen werden, dass vorhergehend beobachtete Phänotypen auf den integrierten Prophagen zurückzuführen sind. Die Deletion von *mazEF* beziehungsweise die Überexpression von *mazF* hatten auch hier signifikanten Einfluss auf die Infektiosität verschiedenster Phagen. Interessanterweise konnten abhängig vom Vermehrungszyklus des Phagen unterschiedliche Einflüsse detektiert werden. Durch Genomanalysen von WSLC1001 konnte ein Typ II CRISPR-cas System identifiziert werden, welches zusätzlich noch eine hohe Anzahl von MazF Erkennungssequenzen beinhaltetete. MazF Überproduktion führte zur signifikanten Verminderung der RNA level der CRISPR-associated Endoribonuklease *csn1*. Um die Annahme, dass die durch MazF verringerte CRISPR-Funktion einen Einfluss auf die Phageninfektion ausübt, zu bestätigen, wurden verschiedenste CRISPR-Mutanten hergestellt. Deletion oder die Herunterregulierung von *csn1* führte entsprechend der Hypothese zur verminderter Plaquebildung für Phage P70 und vermehrten Plaquebildung für A118. Zusammenfassend bietet diese Arbeit eine solide Grundlage für die weitere Untersuchung des *mazEF*-ähnlichen Systems in Listerien, besonders hinsichtlich dessen Einflusses auf die Infektiosität und Vermehrung verschiedenster Phagen. Die Verbindung von *mazEF* zu CRISPR Elementen ist nur ein weiterer Hinweis auf die Komplexität der TA Systeme und deren Bedeutung für das Überleben von Bakterien in ihrer natürlichen Umgebung.