


Engineering of peptidoglycan hydrolases for the treatment of localized *Staphylococcus aureus* infections

Doctoral Thesis

Author(s):

Keller, Anja 

Publication date:

2022

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000562052>

DISS. ETH NO. 28244

**ENGINEERING OF PEPTIDOGLYCAN HYDROLASES FOR
THE TREATMENT OF LOCALIZED *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* INFECTIONS**

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

presented by

ANJA PATRICIA KELLER

MSc (Microbiology and Immunology), ETH Zurich
born on 16.05.1992

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin J. Loessner
Prof. Dr. Annelies Zinkernagel
PD Dr. Mathias Schmelcher

2022

III. SUMMARY

The Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* is a human commensal, colonizing roughly 30% of the human population, residing mainly in the upper respiratory tract and on the skin. *S. aureus* is a significant human health-care concern, as the opportunistic pathogen is one of the leading causes of both systemic and local bacterial infections that can affect almost every part of the body, including bacteraemia, osteomyelitis, infective endocarditis and skin and soft tissue infections. Moreover, *S. aureus* is a causative agent of bovine mastitis, which is considered one of the most economically devastating diseases in the dairy sector. Treatment of most *S. aureus* infections depends on the systemic application of antibiotics, yet the ability of the pathogen to invade a variety of host cells (e.g. osteoblasts and bovine mammary gland cells) and to rapidly acquire resistance against antibiotics are key features contributing to therapeutic failure. Additionally, systemic application of therapeutics results in low concentrations at local infection sites due to their general distribution throughout the organism. Thus, novel antimicrobials and therapeutic approaches that efficiently target extra- and intracellular *S. aureus* and infected tissues are urgently needed. Peptidoglycan hydrolases (PGHs) constitute such a novel class of antimicrobials. While they are naturally produced by a variety of organisms including bacteriophages and bacteria, their potential as antimicrobials stems from their common capability to efficiently cleave the bacterial cell wall causing rapid cell lysis. This is especially useful in applications against Gram-positive bacteria such as *S. aureus*, as their peptidoglycan moieties are exposed to the environment. Further advantages of PGHs, especially the bacteriophage-derived endolysins, include high target specificity, activity that is independent of the metabolic state of the bacterial target, and their resilience to resistance formation, since they cleave highly conserved cell wall targets. In this thesis, two manuscripts are presented with the common focus of engineering of chimeric peptidoglycan hydrolases to further their potential as novel antimicrobial therapeutics. In Manuscript I, a targeted approach for the treatment of staphylococcal osteomyelitis was explored, based on the combination of highly active PGHs and cell-penetrating homing peptides (CPHP). CPHPs are small peptide moieties characterized by their tropism to specific tissues upon systemic administration and their ability to translocate an associated cargo molecule into target cells. Here, CPHPs with specificity for murine osteoblasts were identified via a cell culture-based phage display, followed by next generation sequencing. Further, the cell-line specific targeting and internalization of a covalently linked-protein into murine osteoblasts by ten CPHP candidates was assessed using fluorescence microscopy. One of these CPHP candidates

- HGDWT - mediated tissue-specific accumulation of an associated PGH in bones upon intravenous application, thus confirming its status as an osteotropic CPHP. Moreover, a pool of parental and chimeric PGHs that had previously shown high staphylolytic potential in human serum and under intracellular conditions was screened for constructs with high activity in murine serum, leading to the selection of three PGHs: LST, M23LST(L)_SH3b2638 and CHAPGH15_SH3bAle1. Finally, the selected PGHs were C-terminally modified with two osteotropic CPHPs and their therapeutic efficacy was assessed in a murine model of staphylococcal osteomyelitis. Our findings show that the modification of PGHs with tissue-specific CPHPs improved the accumulation of the therapeutic in the target tissue, which translated to an increased treatment efficacy *in vivo*. Thus, the herein proposed approach presents a viable method for the treatment of localized infections upon systemic administration that could be extended to a variety of other microbial pathogens and infectious diseases.

Manuscript II focuses on the identification of PGHs with potential as therapeutics against staphylococcal bovine mastitis. This application poses further hurdles, as the presence of residual milk components can negatively influence the activity of PGHs in a treatment setting. Thus, a library of eighty PGHs was screened for constructs with high activity against the mastitis isolate *S. aureus* Newbould 305 in raw bovine milk, and the activity of twelve potential candidates was subsequently characterized in time kill assays. Several potential PGHs with high activity in milk emerged from this screening, including the bacteriocins LST and ALE-1, and the chimeric PGHs M23LST(L)_SH3b2638 and CHAPGH15_SH3bAle1. These enzymes showed activity against a variety of *S. aureus* mastitis isolates and the MRSA strain USA300. Further, synergistic activity using a combination of CHAPGH15_SH3bAle1 and LST was observed in milk. Since the ability of *S. aureus* to invade mammary gland cells is associated with chronic infections and treatment failure, four PGHs (LST, M23LST(L)_SH3b2638, CHAPK_SH3bLST and CHAPGH15_SH3bAle1) were modified with the cell-penetrating peptide TAT. All CPP-modified PGHs showed significantly enhanced intracellular eradication of *S. aureus* in bovine mammary alveolar cells.

The work presented in this thesis addresses two challenges that are encountered upon therapeutic application of PGHs, one being the occurrence of intracellular persisters residing within host cells, the other being the inefficient accumulation of therapeutics at local infection sites upon systemic application, resulting in low treatment efficacies. The herein presented findings highlight the potential of PGH engineering with functional peptides to increase treatment efficacies, and the

targeted treatment approach further advances the translation of PGH therapeutics into a clinical application.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Staphylococcus aureus ist ein Gram-positives Bakterium, das etwa 30% der menschlichen Bevölkerung besiedelt. Als opportunistischer Erreger ist *S. aureus* jedoch ein Hauptverursacher von systemischen und lokalen bakteriellen Infektionen, und stellt dadurch ein erhebliches Problem für die menschliche Gesundheit dar. Während solche Infektionen in allen Geweben und Organen auftreten können, werden vor allem die Bakteriämie, Osteomyelitis, infektiöse Endokarditis sowie Haut- und Weichteilinfektionen mit *S. aureus* in Verbindung gebracht. Außerdem ist *S. aureus* einer der häufigsten Erreger der Rindermastitis, die als eine der wirtschaftlich verheerendsten Krankheiten im Milchsektor gilt. Die Behandlung der meisten durch *S. aureus* verursachten Infektionen ist stark abhängig von der systemischen Verabreichung von Antibiotika. Allerdings tragen die weite Verbreitung und Akkumulierung von Antibiotikaresistenz wesentlich dazu bei, dass etablierte Antibiotikatherapien nicht mehr wirksam sind. Ein zusätzlich erschwerender Faktor bildet die Fähigkeit von *S. aureus* eine Vielzahl von Wirtszellen (z. B. Osteoblasten und Rindermilchdrüsenzellen) zu infizieren. Die systemische Verabreichung von Therapeutika ist aufgrund ihrer Distribution im gesamten Organismus oft nicht effektiv gegen Bakterien in lokalen Infektionsherden. Daher werden dringend neue antimikrobielle Mittel und therapeutische Ansätze benötigt, die hohe Effizienz gegen extra- und intrazelluläre *S. aureus* in lokalen Infektionsherden zeigen. Eine neue Gruppe mit hohem antimikrobiellem Potenzial bilden die Peptidoglykan Hydrolasen (PGHs). Diese Enzyme werden natürlicher Weise von einer Vielzahl von Organismen produziert, etwa Bakteriophagen und Bakterien. Peptidoglykan Hydrolasen schneiden spezifische Bindungen im bakteriellen Peptidoglykan, welches den Grossteil der Zellwandmasse in Gram-positiven Bakterien ausmacht. Dadurch wird die Stabilität der Zellwand erheblich geschwächt, und die bakterielle Zelle durch den internen Turgor zerstört. PGHs sind daher besonders nützlich in der Anwendung gegen Gram-positive Bakterien, zu denen auch *S. aureus* gehört, da die Zellwand direkt der Umgebung ausgesetzt ist. Zu den weiteren Vorteilen der PGHs zählen ihre hohe Spezifität und ihre Unabhängigkeit gegenüber dem Stoffwechselzustand des Bakteriums. Weiter sind PGHs relativ unempfindlich gegenüber Resistenzbildung, da ihre Substrate in der Zellwand stark konserviert sind. In dieser Arbeit werden zwei Manuskripte präsentiert, deren gemeinsamer Schwerpunkt auf der Modifizierung von chimären PGHs liegt, um ihr Potenzial als antimikrobielle Therapeutika zu maximieren. In Manuskript I wurde ein neuer Ansatz für die Behandlung von Osteomyelitis untersucht, welcher auf der Kombination von hochaktiven PGHs und Zellpenetrierenden, gewebespezifischen Peptiden (CPHP) beruht. CPHPs sind kurze Peptide, welche

sich dadurch auszeichnen, dass sie sich nach systemischer Verabreichung in spezifischen Geweben anreichern und in der Lage sind, die Aufnahme eines assoziiertes Frachtmolekül in Zielzellen zu vermitteln. CPHPs mit Spezifität für Maus-Osteoblasten wurden mit Hilfe eines Phagen-Displays identifiziert. Weiter wurde die zelllinienspezifische Bindung und Internalisierung von zehn CPHP-Kandidaten mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Einer dieser CPHP-Kandidaten - HGDWT - vermittelte nach intravenöser Verabreichung eine gewebespezifische Akkumulation eines assoziierten PGH in Knochen und bestätigte damit seinen Status als osteotropes Peptid. Aus einer Sammlung von natürlichen und chimären PGHs wurden Konstrukte mit hoher Aktivität in Mausserum selektioniert: LST, M23LST(L)_SH3b2638 und CHAPGH15_SH3bAle1. Diese wurden C-terminal mit einem CPHP versehen und anschliessend in einem Mausmodell für Osteomyelitis auf ihre therapeutische Wirksamkeit untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Modifizierung von PGHs mit gewebespezifischen CPHPs die Anreicherung des Therapeutikums im Zielgewebe verbessert, was sich wiederum in einer erhöhten Behandlungswirksamkeit *in vivo* niederschlägt. Somit stellt der hier vorgeschlagene Ansatz eine wirksame Methode für die Behandlung lokaler Infektionen nach systemischer Verabreichung dar, welche potenziell für eine Vielzahl weiterer mikrobieller Erreger und Krankheiten angewendet werden könnte.

Manuskript II konzentriert sich auf die Identifizierung von PGHs, welche als Therapeutika gegen Rindermastitis in Frage kommen. Diese Anwendung birgt weitere Hürden, da die Aktivität von PGHs durch das Vorhandensein von Restmilchbestandteilen im Euter negativ beeinflusst werden kann. Daher wurde eine Sammlung von achtzig PGHs auf Konstrukte mit hoher Aktivität gegen das Mastitis-Isolat *S. aureus* Newbould 305 in Rohmilch untersucht, und die Aktivität von zwölf potenziellen Kandidaten wurde anschliessend in Time-Kill-Assays charakterisiert. Basierend auf diesem Screening wurden mehrere potenzielle PGHs mit hoher Aktivität in Milch gefunden, einschliesslich der Bakteriozine LST und ALE-1, sowie der chimären PGHs M23LST(L)_SH3b2638 und CHAPGH15_SH3bAle1. Diese Enzyme zeigten Aktivität gegen eine Vielzahl von Mastitis-Isolaten. Darüber hinaus wurde synergistische Aktivität zwischen der Kombination CHAPGH15_SH3bAle1 und LST in Milch gezeigt. *S. aureus* hat die Fähigkeit Milchdrüsenzellen zu infizieren, was mit chronischen Infektionen und Behandlungsversagen in Verbindung gebracht wird. Um solche intrazellulären Bakterien erfolgreich zu behandeln, wurden vier PGHs (LST, M23LST(L)_SH3b2638, CHAPK_SH3bLST und CHAPGH15_SH3bAle1) mit dem Zell-penetrierenden Peptid TAT modifiziert. Dieses Peptid vermittelt die Translokation eines assoziierten Proteins in eine Vielzahl verschiedener Zellen. Mit CPP-modifizierten PGHs zeigte

sich eine signifikant verbesserte intrazelluläre Eradikation von *S. aureus* in einer Euterepithel-Zelllinie.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Manuskripte befassen sich mit zwei konkreten Hürden, welche bei der therapeutischen Anwendung von PGHs auftreten können. Zum einen ist dies das Auftreten intrazellulärer Bakterien, welche von Therapeutika schwer zu erreichen sind. Zum anderen entsteht durch die systemische Verabreichung von Therapeutika ein Verdünnungseffekt, was in einer ungenügenden Anreicherung an lokalen Infektionsstellen resultieren kann. Dies wiederum hat Auswirkungen auf die Behandlungseffizienz, da zu tiefe Konzentration möglicherweise nicht ausreichen, um die Infektion zu eliminieren. Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstreichen das Potenzial von modifizierten PGHs als neue Therapeutika gegen *S. aureus*, und der untersuchte gewebespezifische Behandlungsansatz bringt deren Translation in die klinische Anwendung weiter voran.