

DISS. ETH NO. 29062

**Synthetic Biology for Genetically Engineered Bacteriophages to
Target Infectious Diseases**

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

presented by

Jonas Michael Fernbach

M. Sc. ETH UZH in Computational Biology and Bioinformatics

born on 12.02.1992

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin J. Loessner

Dr. Samuel Kilcher

Dr. Alexander Harms

2023

Abstract

The widespread, global availability and use of antibiotics has led to a drastic increase in the number of antimicrobial resistant pathogens. The "golden age of antibiotics" from which humans have prospered for almost a century is in jeopardy. To avoid falling back into an era where even small infections can spread uncontrollably and lead to severe illness or death, there is an urgent need for alternative antimicrobials.

Bacterial viruses, also termed bacteriophages, or simply phages, are vastly abundant in nature and pose an ideal alternative due to their ability to effectively infect and kill their bacterial hosts. Although naturally occurring phages have been successfully employed as therapeutics, genetically engineered phages have received increased attention in recent years, as many pitfalls associated with naturally occurring phages can be overcome, thereby increasing their potential for clinical use.

In **Manuscript I**, we review state-of-the-art bacteriophage engineering methodologies, applications thereof, and discuss the outlook into the future of phage therapy, particularly in the context of machine learning-driven computational methods.

Staphylococcus aureus is a major human pathogen and, due to emergence of numerous strains exhibiting antibiotic resistance, even to last-line treatment options, novel antimicrobials are urgently needed. Although most suitable for phage therapy, the genetic engineering of large, lytic *S. aureus* phages with broad host range has so far proved difficult using conventional engineering methods. In **Manuscript II**, we use an homologous recombination-based and CRISPR Cas9 counterselection-assisted approach to engineer the large, lytic, *S. aureus*-infecting *Kayvirus* K. We used this novel method to integrate a bioluminescent reporter payload into the phage genome, thereby facilitating rapid detection of a large range of *S. aureus* strains, including a selection of vancomycin resistant

clinical isolates. Our engineered phage proved highly efficient both *in vitro* as well as in complex matrices such as human whole blood and bovine raw milk.

As mentioned previously, one conventional method of genetically engineering phages is using a synthetic biology approach including assembly of synthetic phage genome fragments and subsequent reactivation in a suitable host organism. This can prove challenging, particularly for Gram-positive species such as *S. aureus*, where introduced exogenous DNA is met by wide array of intracellular defense mechanisms. In **Manuscript III**, we describe a detailed protocol for the development of cell-wall deficient L-form bacteria, which are capable of taking up large DNA molecules via simple chemical transformation. We demonstrate the conversion to the L-form state for three different Gram-positive species, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* and *Staphylococcus xylosum*, and demonstrate their ability to reactivate various different phage genomes, even across the genus barrier.

Computational methods are already an essential part of modern science and likely will continue to be an integral component for driving forward advances in biological research, particularly in genetic engineering. In **Manuscript IV** we developed a machine learning-based method for predicting transcriptional promoters from primary phage sequence data. We used the same bioluminescent payload from **Manuscript II**, to experimentally validate our approach. We demonstrate that the accurate prediction of payload expression levels, based on the location of insertion sites behind promoters with various predicted expression strengths, is indeed possible. This has great potential for future applications to control the expression levels of effector payloads integrated into the phage backbone.

One approach for enhancing phage efficacy for therapeutic applications is the genetic arming with antimicrobial effector payloads. In **Manuscript V**, we screened a large selection of payload gene candidates, which had previously been shown to exhibit bactericidal activity against *S. aureus*, for their suitability as effector payloads in K. Although we failed to obtain viable phages for the majority of payload genes, we succeeded in devel-

oping two engineered phages containing the protein toxin MazF and the short-leaderless bacteriocin Lacticin Q as a genetic payload, respectively. Both phages showed significantly enhanced *in vitro* killing efficiency on a selection of *S. aureus* hosts when compared to the wildtype phage.

With this thesis, I hope to have brought insight and advances into the field of phage engineering, specifically in the context of *S. aureus*-targeted applications. By demonstrating different approaches based on phage type and intended modification, we show that phage engineering has great potential for developing modified phages with enhanced properties directed towards future therapeutic applications. Overall, phage engineering and therapy shows great promise to mitigate the effects of the globally emerging antibiotic resistance crisis, and has the potential to be a major therapeutic in future times.

Zusammenfassung

Die weit verbreitete, weltweite Verfügbarkeit und Verwendung von Antibiotika hat zu einem drastischen Anstieg der Zahl antimikrobiell resistenter Krankheitserreger geführt. Das "goldene Zeitalter der Antibiotika", von dem die Menschen fast ein Jahrhundert lang profitiert haben, ist in Gefahr. Um einen Rückfall in eine Ära zu vermeiden, in der sich selbst kleine Infektionen unkontrolliert ausbreiten und zu schweren Erkrankungen oder zum Tod führen können, besteht dringender Bedarf an alternativen antimikrobiellen Mitteln.

Bakterielle Viren, auch Bakteriophagen oder einfach Phagen genannt, kommen in der Natur in großer Zahl vor und stellen aufgrund ihrer Fähigkeit, ihre bakteriellen Wirte wirksam zu infizieren und abzutöten, eine ideale Alternative dar. Obwohl natürlich vorkommende Phagen bereits erfolgreich als Therapeutika eingesetzt wurden, haben gentechnisch hergestellte Phagen in den letzten Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen, da viele Probleme, die mit natürlich vorkommenden Phagen verbunden sind, überwunden werden können, was ihr Potenzial für den klinischen Einsatz erhöht.

In **Manuskript I** geben wir einen Überblick über den Stand der Technik bei der Entwicklung von Bakteriophagen und deren Anwendungen und diskutieren einen Ausblick auf die Zukunft der Phagentherapie, insbesondere im Zusammenhang mit maschinellem Lernen.

Staphylococcus aureus ist ein wichtiger Krankheitserreger des Menschen, und aufgrund des Auftretens zahlreicher Stämme, die eine Antibiotikaresistenz aufweisen, selbst gegen die letzten Behandlungsmöglichkeiten, werden dringend neue Antimikrobiotika benötigt. Obwohl sie für die Phagentherapie bestens geeignet sind, hat sich die gentechnische Herstellung großer, lytischer *S. aureus*-Phagen mit breitem Wirtsspektrum

mit herkömmlichen Methoden bisher als schwierig erwiesen. In **Manuskript II** verwenden wir einen auf homologer Rekombination basierenden und durch CRISPR Cas9 unterstützten Ansatz, um den großen, lytischen, *S. aureus*-infizierenden *Kayvirus* K zu entwickeln. Wir haben diese neuartige Methode verwendet, um eine biolumineszente Reporter-Nutzlast in das Phagen genom zu integrieren und dadurch eine schnelle Erkennung einer Vielzahl von *S. aureus*-Stämmen zu ermöglichen, einschließlich einer Auswahl von Vancomycin-resistenten klinischen Isolaten. Die von uns entwickelten Phagen erwiesen sich sowohl *in vitro* als auch in komplexen Matrizen wie menschlichem Vollblut und Rinderrohmlch als äußerst effizient.

Wie bereits erwähnt, besteht eine herkömmliche Methode zur gentechnischen Veränderung von Phagen in der Verwendung eines synthetischen biologischen Ansatzes, der die Zusammenstellung synthetischer Phagen genomfragmente und die anschließende Reaktivierung in einem geeigneten Wirtsorganismus umfasst. Dies kann sich als Herausforderung erweisen, insbesondere bei Gram-positiven Arten wie *S. aureus*, wo die eingebrachte exogene DNA auf eine Vielzahl von intrazellulären Abwehrmechanismen trifft. In **Manuskript III** beschreiben wir ein detailliertes Protokoll für die Entwicklung von L-Form Bakterien, welche keine Zellwand aufweisen und die in der Lage sind, große DNA-Moleküle durch einfache chemische Transformation aufzunehmen. Wir demonstrieren die Umwandlung in die L-Form für drei verschiedene Gram-positive Arten, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* und *Staphylococcus xylosus*, und zeigen ihre Fähigkeit, verschiedene Phagen genome zu reaktivieren, sogar über die Gattungsgrenze hinweg.

Computergestützte Methoden sind bereits ein wesentlicher Bestandteil der modernen Wissenschaft und werden wahrscheinlich auch in Zukunft ein wesentlicher Bestandteil sein, um Fortschritte in der biologischen Forschung, insbesondere in der Gentechnik, voranzutreiben. In **Manuskript IV** haben wir eine auf maschinellem Lernen basierende Methode zur Vorhersage von Transkriptionspromotoren aus primären Phagen sequenzdaten entwickelt. Wir verwendeten dieselbe biolumineszente Nutzlast aus **Manuskript**

II, um unseren Ansatz experimentell zu validieren. Wir zeigen, dass eine genaue Vorhersage der Expressionsstärke der Nutzlast auf der Grundlage der Position von Insertionsstellen hinter Promotoren mit verschiedenen vorhergesagten Expressionsstärken tatsächlich möglich ist. Dies birgt ein großes Potenzial für künftige Anwendungen zur Kontrolle der Expressionsniveaus von in das Phagenrückgrat integrierten Effektornutzlasten.

Ein Ansatz zur Steigerung der Wirksamkeit von Phagen für therapeutische Anwendungen ist die genetische Bewaffnung mit antimikrobiellen Effektor-Nutzlasten. In **Manuskript V** haben wir eine große Auswahl von Genen, welche für Nutzlasten kodieren die zuvor eine bakterizide Aktivität gegen *S. aureus* gezeigt hatten, auf ihre Eignung als Effektor-Nutzlasten in K untersucht. Obwohl wir für die meisten Nutzlastgene keine lebensfähigen Phagen erhalten konnten, gelang es uns, zwei Phagen zu entwickeln, die das Proteintoxin MazF bzw. das kurzkettige Bakteriozin Lacticin Q als genetische Nutzlast enthalten. Beide Phagen zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Phagen eine deutlich verbesserte *in vitro* Tötungseffizienz bei einer Auswahl von *S. aureus*-Wirten.

Mit dieser Arbeit hoffe ich, Einblicke und Fortschritte auf dem Gebiet des Phagen-Engineerings erzielt zu haben, insbesondere im Zusammenhang mit gezielten Anwendungen gegen *S. aureus*. Durch die Demonstration verschiedener Ansätze auf der Grundlage des Phagentyps und der beabsichtigten Modifikation zeigen wir, dass Phagen-Engineering ein großes Potenzial für die Entwicklung modifizierter Phagen mit verbesserten Eigenschaften für zukünftige therapeutische Anwendungen hat. Insgesamt sind Phagen-Engineering und Phagentherapie sehr vielversprechend, um die Auswirkungen der sich weltweit abzeichnenden Krise der Antibiotikaresistenz abzumildern, und haben das Potenzial, in Zukunft ein wichtiges therapeutisches Mittel zu sein.