

DISS. ETH NO. 29753

Assembly and release of virulence factors from a bacterial pathogen

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

presented by

Miki Hannah Feldmüller

M.Sc. ETH in Biology
ETH Zurich, Switzerland

born on 26.12.1993
citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Martin Pilhofer (examiner)
Prof. Dr. Martin Loessner (co-examiner)
Prof. Dr. Leo Eberl (co-examiner)

2023

Summary

Bacterial pathogens pose significant risk to the health of plants, animals and humans, thereby imposing substantial economic burden. Pathogens possess sophisticated mechanisms to evade the host immune defenses and to manipulate cellular machineries. Key players in mediating bacterial pathogenicity are virulence factors, which the pathogen produces to invade and subjugate their host.

Yersinia entomophaga is an insect pathogen with a broad range of hosts within the order of *Coleoptera*, *Lepidoptera* and *Orthoptera*. Central to its virulence is the tripartite Tc toxin YenTc, which induces oral toxicity, resulting in amber disease. Furthermore, Tc toxins are prevalent across a wide range of bacterial pathogens, affecting insect, plants and humans. Although their structure and intoxication mechanism are well-known, the precise site of their assembly and the release mechanism of these macromolecular complexes still remains elusive.

Within this thesis, I investigated the mechanisms of Tc toxin assembly and release from *Y. entomophaga* using an integrative multiscale imaging approach. By using light microscopy of a functional YenTc-sfGFP fusion strain, correlated cryo-light and cryo-electron tomography together with template matching, we revealed that YenTc is only expressed within a specific subpopulation of cells that are also “primed” with other potential virulence factors.

Furthermore, a phage-like lysis cassette (LC) comprising a holin, an endolysin and a two-component spanin was identified as essential for YenTc release via cell lysis. However, before resulting in complete cell lysis, the LC generates intermediate “ghost” cells, which become densely packed with assembled YenTc holotoxins, possibly serving as an assembly compartment.

A serendipitous observation during this study was the occurrence of filament bundles in intact Tc toxin expressing cells. Using a visual proteomics approach encompassing subtomogram averaging and proteomics, we identified the composition of these filaments as the metalloprotease M66/StcE, a proposed virulence factor of *Y. entomophaga*.

Based on these findings, we hypothesize, that *Yersinia entomophaga* primes a subpopulation of cells for full pathogenicity by expressing a repertoire of virulence factors, including YenTc and M66/StcE. Moreover, the stepwise assembly and subsequent release mechanism of Tc

toxin may have evolved as a strategy to minimize the number of cells that need to be sacrificed in order to mediate pathogenicity. The occurrence of similar lysis cassettes in diverse organisms indicates a conserved mechanism for the release of macromolecular complexes.

Zusammenfassung

Bakterielle Pathogene stellen ein erhebliches Risiko für die Gesundheit von Pflanzen, Tieren und Menschen dar und verursachen dadurch eine bedeutende Belastung für die Weltwirtschaft. Pathogene besitzen komplexe Mechanismen, um die Immunabwehr des Wirtes zu umgehen und zelluläre Maschinerien für ihre eigenen Zwecke auszunutzen. Eine wichtige Rolle in bakterieller Pathogenität sind Virulenzfaktoren, die vom Pathogen produziert werden um den Wirt zu infizieren.

Yersinia entomophaga ist ein Insektenpathogen mit einem breiten Wirtsspektrum innerhalb der Ordnungen *Coleoptera*, *Lepidoptera* and *Orthoptera*. Der Hauptauslöser der Virulenz dieses Bakterium ist das Tc Toxin YenTc, welches orale Toxizität und Mortalität auslöst. Tc Toxine kommen in einer Vielzahl von bakteriellen Pathogenen vor, die Insekten, Pflanzen und Menschen befallen. Obwohl ihre Struktur als auch der Intoxikationsmechanismus aufgeklärt sind, bleibt der Ort der Assemblierung und der Mechanismus der Freisetzung dieses makromolekularen Komplexes weiterhin rätselhaft.

In dieser Arbeit habe ich die Mechanismen der Tc Toxin Assemblierung und Freisetzung in *Yersinia entomophaga* mittels einer integrativen, multiskalierten Visualisierungsmethode untersucht. Mittels einer Kombination aus Lichtmikroskopie eines funktionalen YenTc-sfGFP Fusionsstamm, korrelativer Kryo-Licht und Elektronentomografie, sowie Template Matching zeigten wir, dass YenTc nur in einer spezifischen Subpopulation von Zellen exprimiert wird, die auch mit anderen potenziellen Virulenzfaktoren "geprimed" sind.

Des weiteren wurde eine Phagen-ähnliche Lyse-Kassette (LC) identifiziert, die aus einem Holin, einem Endolysin und einem Zwei-Komponenten Spanin besteht, und für die Freisetzung von YenTc durch Zellyse unerlässlich ist. Bevor es zu einer vollständigen Zellyse kam, erzeugte die LC intermediäre "Geister" Zellen, die mit assemblierten Tc Toxinen dicht gefüllt waren und möglicherweise als Assemblierungskompartiment dienen.

Eine zufällige Beobachtung während dieser Studie war das Auftreten von Bündeln aus Filamenten in intakten Tc Toxin exprimierenden Zellen. Unter Verwendung von visueller Proteomik, welche Subtomogram Averaging und Proteomik umfasste, identifizierten wir die Zusammensetzung dieser Filamente als Metalloprotease M66/StcE, ein bekannter Virulenzfaktor von *Y. entomophaga*.

Basierend auf diesen Erkenntnissen nehmen wir an, dass *Y. entomophaga* eine Subpopulation von Zellen für volle Pathogenität "primed", indem es ein Repertoire an Virulenzfaktoren exprimiert, einschliesslich YenTc und M66/StcE. Darüber hinaus könnte der schrittweise Assemblierungs- und Freisetzungsmechanismus von Tc Toxinen als Strategie entwickelt worden sein, um die Anzahl der Zellen zu minimieren die geopfert werden müssen, um volle Pathogenität zu entfalten. Das Auftreten der gleichen Lyse-Kassetten in verschiedenen Organismen weist auf einen konservierten Mechanismus für die Freisetzung von makromolekularen Komplexen hin.