

Summary

Characterization and *in vitro* engineering of exopolysaccharide (EPS) depolymerases originated from *Klebsiella* phages

This dissertation is focused on depolymerases encoded by *Klebsiella* phages and the triangular relationship between their specificity, bacterial capsular serotype and phage host spectrum. Since antibiotic treatment options of multidrug-resistance *K. pneumoniae* infections are limited, new alternative methods of therapy are highly urgent. Undeniably, the polysaccharide capsule is the most important virulence factor of *Klebsiella* species, protecting the bacterial cell against chemicals and unfavourable conditions including antibiotics and the host immune response. Therefore, the capsule is an appealing target candidate for new alternative therapies against *K. pneumoniae* infections. One of such agents might be phage-encoded depolymerases. These enzymes degrade the bacterial polysaccharide capsule with high specificity to the distinct capsule variants and have antivirulent potential. Although depolymerases do not kill the bacterium, they can disarm *K. pneumoniae* by capsule degradation and sensitize them to chemical and physical agents, immune mechanisms thus reducing their virulence.

The first goal in this project was to localize, produce and characterise depolymerases encoded by *Klebsiella* phages KP32, KP34, KP36 and SU503. Depolymerases are located in receptor binding proteins (RBPs) of phages. Applying *in silico* analysis we selected seven putative enzymatically active proteins for experimental verification. Capsule degrading activity of five predicted depolymerases (KP32gp37, KP32gp38, KP34p57, KP36gp50 and SU503gp54) was confirmed with a spot assay and zymography. The native oligomeric state as well as the predominant secondary structure and their stability at different physico-chemical conditions were determined using Multi Angle Light Scattering (MALS), Circular Dichroism spectroscopy (CD) and spot tests, respectively. For the remaining two RBPs, KP34p49 and SU503gp46, enzymatic activity was not detected.

The second goal of this project was an extensive *in silico* analysis of RBPs encoded by *Klebsiella* phages deposited in GenBank and to model the RBP organisation of *Klebsiella* phages with depolymerase activity. We discovered that RBPs of *Klebsiella*

phages can be divided into a conserved N-terminal anchor domain and a highly diverse, enzymatic central and C-terminal domain. The high variety of enzymatic domains corresponds to the capsular serotype diversity of *K. pneumoniae*. In the same time the conserved anchor enables RBPs assembly to the virion, even when the enzymatic part is modified by horizontal gene transfer. Phages possessing two full RBPs, or a full version of only one RBP, while the second is truncated, are proposed to assemble their RBPs to the virion through an anchor-branched system. Intermediate non-enzymatic RBPs are proposed to be attachment points for other RBPs with depolymerase activity. Secondary RBPs have short conserved peptides at their N-terminus to attach the interchangeable enzymatic part to the intermediate protein. Moreover, in the branching point, a T4gp10-like domain is present as a crucial element for signal transduction from reversible adsorption to irreversible adsorption and DNA ejection.

In the third part of this thesis we mimic horizontal transfer of gene fragments encoding depolymerase domains. Horizontal transfer is the evolutionary driving force to modify RBPs in order to change the phage host spectrum. We generated a set of chimeric depolymerases composed of N-terminal anchors and the remaining, enzymatic parts of the proteins, according to the preceding *in silico* predictions. Protein fusions were obtained using the VersaTile method. The activity and specificity of the chimeric variants were further verified on a collection of *K. pneumoniae* strains possessing different capsule serotypes. The chimeric proteins remain active despite possessing non-cognate N-terminal anchors. Moreover, the chimeric depolymerases always exhibit the specificity assigned to the enzymatic part, confirming the non-enzymatic role of the respective anchors. The described chimeric depolymerases were subsequently transferred from protein level into phage level. We were using the genome of phage K11, a representative of KP32viruses, as chassis to alter RBPs with the yeast-based phage engineering platform. The introduced genome modifications resulted in a phage host range switch from K11 capsular specificity to K3 and K63 specificity in generated phages.

In this dissertation we elaborated the triangular relationship between depolymerase specificity, capsular serotype and phage host spectrum for *Klebsiella* phages. Domain-based build-up of depolymerases gives an opportunity for creation of phages “sur mesure” with predestined bacterial target. That could lead to the development of a new

generation of phage therapy: more effective, well characterised, safe and more controllable, with the modification of appropriately chosen RBP domains to allow the desired host range switch of a well characterised and safe scaffold phage.

30.01.2018 Agnieszka Lefke

Streszczenie

Charakterystyka i inżynieria *in vitro* depolimeraz egzopolisacharydów (EPS) pochodzących z bakteriofagów specyficznych wobec *Klebsiella*

Tematem niniejszej pracy doktorskiej są depolimerazy kodowane przez fagi *Klebsiella*, w tym także zależność pomiędzy specyficznością depolimeraz względem bakteryjnego serotypu kapsularnego oraz zasięgiem gospodarzy faga. Ze względu na intensywny rozwój antybiotykooporności wśród pałeczek *K. pneumoniae*, poszukiwanie alternatywnych metod leczenia infekcji wywoływanych przez szczepy wielooporne stało się sprawą priorytetową. Polisacharydowa otoczka stanowi niezaprzeczalnie najważniejszy czynnik wirulencji pałeczek *Klebsiella*, tworząc barierę ochronną zarówno przed działaniem czynników chemicznych, w tym antybiotyków, jak i przed mechanizmami odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Z tego też powodu otoczka jest idealnym celem dla nowych alternatywnych terapii w zwalczaniu infekcji wywoływanych przez szczepy *K. pneumoniae*. Jedną z potencjalnych możliwości może być zastosowanie depolimeraz pochodzenia fagowego. Są to enzymy o wysokiej specyficzności względem typów kapsularnych i dużej efektywności degradacji polisacharydów, co przekłada się na skuteczne redukcje wirulencji bakterii. Pomimo iż depolimerazy nie zabijają bakterii, zniszczenie otoczki bakteryjnej *K. pneumoniae* prowadzi do uwrażliwienia komórki bakteryjnej na działanie czynników fizycznych i chemicznych, oraz na mechanizmy układu immunologicznego takie jak kaskada dopełniacza, czy fagocytoza.

Pierwszym celem projektu była lokalizacja, produkcja i charakterystyka depolimeraz kodowanych przez fagi *Klebsiella*: KP32, KP34, KP36 i SU503. Z zastosowaniem analizy *in silico*, wytypowanych zostało siedem białek tworzących receptor binding proteins (RBPs), jako potencjalnie posiadających aktywność enzymatyczną. Białka te zostały przygotowane w formie białek rekombinowanych i poddane weryfikacji eksperymentalnej. Aktywność enzymatyczna pięciu białek (KP32gp37, KP32gp38, KP34p57, KP36gp50 i SU503gp54) została potwierdzona z zastosowaniem testu spot i zymografii. Nie wykryto aktywności enzymatycznej pozostałych dwóch białek RBP: KP34p49 i SU503gp46. Określono również formę oligomeryczną z zastosowaniem odpowiednio MALS (Multi Angle Light Scattering) i spektroskopii CD (Circular Dichroism). Potwierdzono postać trimeryczną białek natywnych z dominującą β -helix

w strukturze drugorzędowej. Oznaczono także stabilność białek w różnych warunkach temperatury i pH.

Drugim celem projektu było przeprowadzenie obszernej analizy *in silico* genów kodujących RBP u fagów *Klebsiella*. Badaniami objęto zdeponowane w bazie GenBank 59 fagów. W wyniku analiz zostały stworzone modele organizacji RBP o aktywności depolimeraz. Odkryto, że RBP fagów *Klebsiella* mają budowę domenową z konserwatywną N-terminalną domeną zakotwiczącą białko w wirionie i wysoce zmienną domeną środkowo-C-terminalną. Wysoka zmienność domen enzymatycznych odpowiada różnorodności typów kapsularnych *K. pneumoniae*. Konserwatywne domeny N-terminalne umożliwiają przyłączenie RBP do wirionu nawet jeśli fragment enzymatyczny uległ modyfikacji na skutek horyzontalnego transferu genów. Fagi posiadające dwa rodzaje RBP, lub pełną wersję RBP tylko jednego rodzaju, podczas gdy drugie zostało zredukowane, tworzą strukturę rozgałęzioną przyłączoną do wirionu przez jedno białko zakotwiczące. Drugie RBP przyłącza się do RBP kotwiczącego poprzez krótki konserwatywny peptyd. Kluczowym elementem występującym w białku kotwiczącym do wirionu jest obecność domeny T4gp10-podobnej, która stanowi miejsce adhezji dla krótkiego peptydu konserwatywnego drugiego RBP. Domena ta pełni również funkcję w przekazywaniu sygnału do adsorpcji nieodwracalnej i możliwości wstrzyknięcia DNA do komórki bakteryjnej.

Trzecim celem projektu było upozorowanie horyzontalnego transferu genów (HTG) kodujących domeny depolimeraz, jako że HTG stanowi siłę ewolucyjną prowadzącą do modyfikacji RBP i w konsekwencji poszerzenia zasięgu bakteryjnych gospodarzy. Stworzona została seria depolimeraz chimerycznych/fuzyjnych złożonych z N-terminalnej domeny zakotwiczącej i domeny enzymatycznej, zlokalizowanych z zastosowaniem wcześniejszych analiz *in silico*. Białka fuzyjne otrzymano z zastosowaniem metody VersaTile. Aktywność i specyficzność otrzymanych białek zostały zweryfikowane na kolekcji szczepów *K. pneumoniae* o zdefiniowanym serotypie otoczkowym. Powstałe chimery zachowały aktywność pomimo połączenia z obcą (pochodzącą z innego faga) N-terminalną domeną zakotwiczącą. Ponadto, depolimerazy chimeryczne zawsze wykazywały aktywność przypisaną domenie enzymatycznej, co potwierdziło nieenzymatyczny charakter N-terminalnych domen zakotwiczących. W kolejnym etapie doświadczeń, utworzone depolimerazy chimeryczne zostały zintegrowane z wirionem w celu wytworzenia fagów

modyfikowanych. Zastosowano Phage Engineering Platform opartą na systemie naprawczym drożdży oraz genom faga K11, należącego do KP32viruses, jako model do modyfikacji RBP. Wprowadzone modyfikacje genomu w rejonie kodującym RBP skutkowały zmianą zasięgu litycznego uzyskanego faga ze szczepu o serotypie K11 na serotypy K3 i K63.

W niniejszej rozprawie doktorskiej zbadano korelację pomiędzy specyficnością depolimeraz, serotypem otoczkowym i zasięgiem gospodarzy fagów *Klebsiella*. Domenowa budowa depolimeraz daje możliwość tworzenia fagów „szytych na miarę”, specyficznych względem określonego patogenu. Wskazuje to na możliwość rozwoju terapii fagowej nowej generacji: bardziej efektywnej, dobrze scharakteryzowanej, bezpiecznej i w pełni kontrolowanej, w której modyfikacja odpowiednio wybranych domen RBP pozwala na zmianę zasięgu specyficzności faga wzorcowego (modelowego).

30.01.2018 *Agnieszka Łaska*