

Im Original veröffentlicht unter:

**Heller, Knut; Neve, Horst: Superinfection exclusion und DNA-Injektion bei Siphoviridae-Phagen. Biospektrum : das Magazin für Biowissenschaften: Heft 1/2014 (Band: 20) S. 26-29**

**DOI: [10.1007/s12268-014-0401-x](https://doi.org/10.1007/s12268-014-0401-x)**

Dies ist das Autorenmanuskript.

Endfassung verfügbar unter: <http://link.springer.com/>

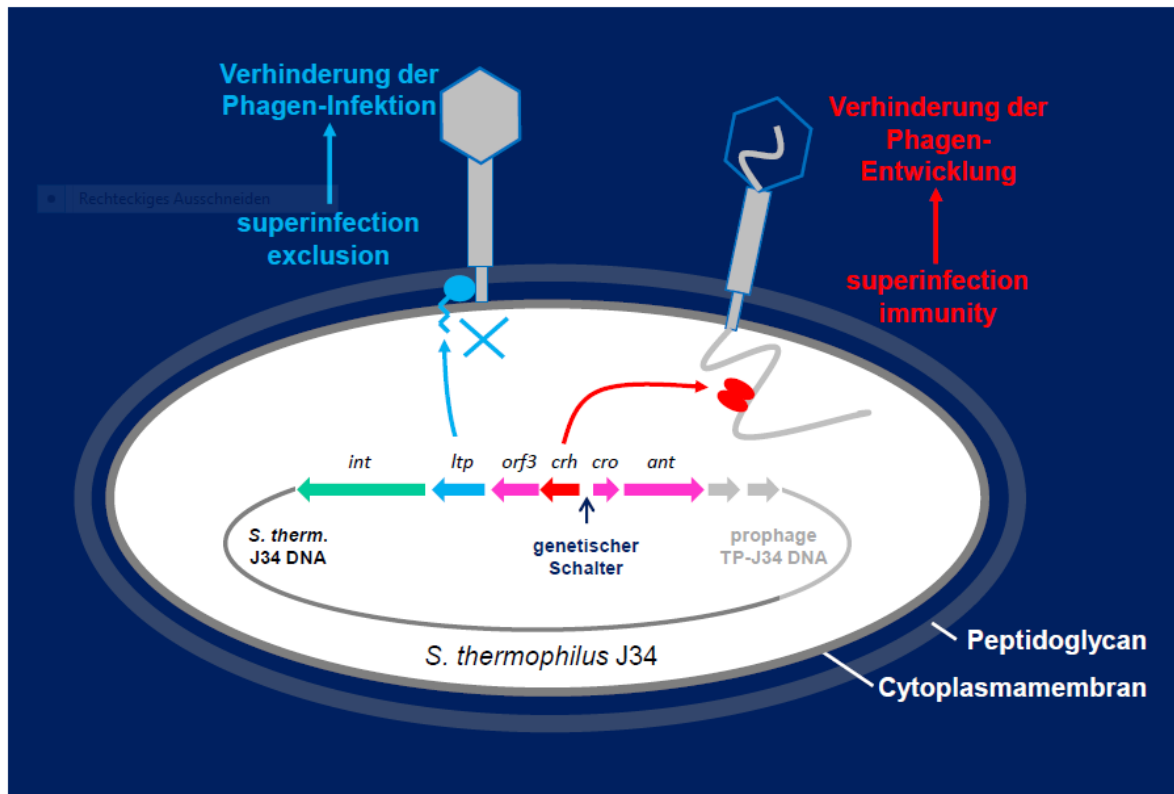
## Bakteriophagen-Infektion

### ***Superinfection exclusion* und DNA-Injektion bei Siphoviridae-Phagen**

Knut J. Heller and Horst Neve, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner-Institut (Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel), Kiel

Superinfection exclusion (SIE) is a mechanism by which a prophage residing in the genome of its host bacterium prevents infection of its host by other phages. During recent years, we have studied superinfection exclusion by prophage TP-J34. Its host is *Streptococcus thermophilus* J34, a bacterium applied as yoghurt starter. Here we present our data on identifying the SIE protein of TP-J34, its mode of action, X-ray structure, and target protein in the superinfecting phage.

- Phagen waren über viele Jahre vor allem als Schädlinge bekannt, die industrielle Lebensmittel-Fermentationen befallen. Zunehmend wird nun aber auch das Potenzial temperenter Phagen erkannt, Infektionen mit virulenten Phagen zu verhindern. Dieses Potenzial beruht auf der biologisch sinnvollen Eigenschaft der in das Wirtsgenom integrierten Prophagen, das Weiterleben der Wirtszelle sichern zu helfen. Die bekanntesten Mechanismen sind *superinfection exclusion* (SIE) und *superinfection immunity*. Während im Fall der *superinfection immunity* der Prophagen-Repressor die Phagen-Vermehrung nach Injektion der DNA hemmt [1], wird durch SIE bereits die Injektion der DNA blockiert [2], und zwar durch an die Zytoplasmamembran gebundene Proteine [3, 4]. Beide Mechanismen sind schematisch am Beispiel des temperenten *Streptococcus thermophilus*-Phagen TP-J34 in **Abbildung 1** dargestellt.



**Abbildung 1:** Lysogeniemodul des *Streptococcus thermophilus* Prophagen TP-J34 und schematische Darstellung der Superinfektion verhindernden Mechanismen *superinfection exclusion* (SIE) und *superinfection immunity*. SIE verhindert die Injektion der Phagen-DNA in die Zelle, während *superinfection immunity* die Vermehrung der Phagen nach DNA-Injektion hemmt. Die nicht im Text erwähnten Gene sind *int* (Integrase), *ant* (Antirepressor) und *orf3* (Regulator).

### Ltp verhindert die DNA-Injektion von Phagen

Das Lysogeniemodul des Phagen TP-J34 weist eine genetische Schalterregion auf, die zwischen den zwei divergent transkribierten Genen *crh* und *cro* liegt (**Abb. 1**, [5]). Das in einem Operon mit dem Repressor-Gen *crh* gelegene *ltp*-Gen codiert für ein auf der Außenseite der Cytoplasmamembran lokalisiertes Lipoprotein [3]. Es wird im lysogenen Zustand exprimiert und ist für SIE verantwortlich. Dieses wurde mittels Plasmid-codiertem Ltp gezeigt, das sowohl in *S. thermophilus* als auch in *Lactococcus lactis* die Vermehrung von Phagen behindert. Bei beiden Wirtsbakterien wies die fehlende Replikation der Phagen-DNA nach, dass die Injektion der Phagen-DNA verhindert wurde. Der Laktokokken-Phage P008 erwies sich dabei als der

empfindlichste aller getesteten Phagen: Die Plaquebildung verringerte sich bei ihm um einen Faktor von ca.  $10^8$  [3].

### *ltp*<sub>TP-J34</sub> gehört zur *moron*-Gen-Familie

Die Suche nach Ltp-ähnlichen Proteinen in Proteindatenbanken zeigt, dass Proteine der Ltp-Lipoprotein-Superfamilie verstreut über verschiedene bakterielle Taxa vorkommen. Dabei korreliert die Ähnlichkeit der verschiedenen Ltp-Proteine zueinander nicht mit der phylogenetischen Distanz der Wirtsbakterien (**Tab. 1**). Daraus lässt sich ableiten, dass die Ltp-codierenden Gene durch horizontalen Gentransfer verbreitet wurden. Das *ltp*<sub>TP-J34</sub> entspricht der Definition eines *moron*: Diese Bezeichnung tragen Gene, die ursprünglich nur als Insertion heterologer DNA aufgefallen waren („*more on*“), inzwischen aber als nützlich für den sie tragenden Wirt erkannt werden [6].

**Tab. 1:** Taxonomische Zuordnung von Proteinen mit größter Ähnlichkeit zu *ltp*<sub>TP-J34</sub>.  
<sup>1</sup>Für jede Gattung wurde jeweils nur das beste Resultat aufgenommen. Der Expect value (E-value) ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Sequenzen zufällig übereinstimmen. Je kleiner er ist, desto signifikanter ist die Übereinstimmung.

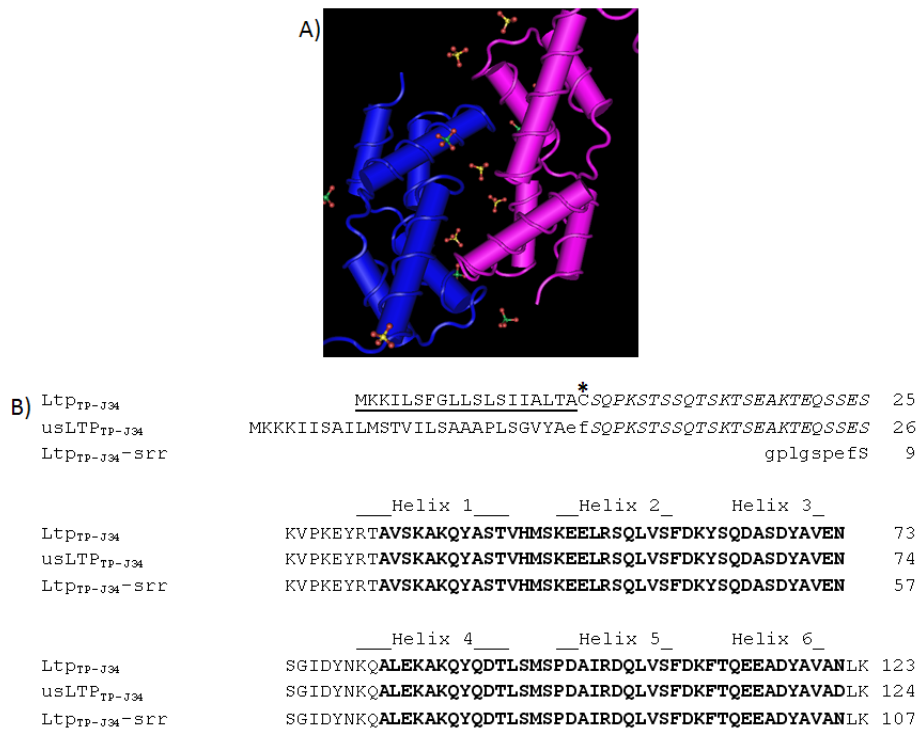
Gattung/Spezies	Ordnung	E-value <sup>2</sup>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillales</i>	1e-68
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillales</i>	1e-31
<i>Eggerthella sp.</i>	<i>Coriobacteriales</i>	6e-30
<i>Corynebacterium pyruviciproducens</i>	<i>Actinomycetales</i>	6e-28
<i>Slackia piriformis</i>	<i>Coriobacteriales</i>	6e-28
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	<i>Lactobacillales</i>	1e-25
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Clostridiales</i>	7e-25
<i>Leifsonia xyli</i>	<i>Actinomycetales</i>	1e-24
<i>Actinomyces sp.</i>	<i>Actinomycetales</i>	2e-24
<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Bacillales</i>	1e-23
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	<i>Bacillales</i>	2e-23
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Actinomycetales</i>	2e-23
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillales</i>	1e-22
<i>Lactobacillus zeae</i>	<i>Lactobacillales</i>	4e-22
<i>Lactococcus garviae</i>	<i>Lactobacillales</i>	7e-22

## **Sekretiertes lösliches Ltp<sub>TP-J34</sub> mit erweitertem Wirkungsbereich**

Zur leichteren Reinigung und funktionellen Charakterisierung des Ltp<sub>TP-J34</sub> wurde das Ltp-Derivat usLTP<sub>TP-J34</sub> konstruiert, bei dem die Signalsequenz und das für die Acylierung zum Lipoprotein notwendige Cystein an Position 1 des reifen Proteins durch die Sequenz des sekretierten Usp45-Proteins aus *L. lactis* ersetzt ist (**Abb. 2**). usLTP<sub>TP-J34</sub> hat verglichen mit Ltp<sub>TP-J34</sub> einen erweiterten Wirkungsbereich gegenüber Laktokokken-Phagen. Während Ltp<sub>TP-J34</sub> die bereits erwähnte starke Wirkung gegen den Phagen P008 (Spezies 936), aber praktisch keine Wirkung gegen die beiden Phagen P001 (Spezies c2) und P335 (Spezies P335) aufweist, ist usLTP<sub>TP-J34</sub> gegen alle drei Phagen gleichermaßen aktiv. Die Plaque-Bildung aller drei Phagen wird um mehr als neun Zehnerpotenzen reduziert [7]. Für diese starke Wirkung kommen – bei gleicher Expression - verschiedene Gründe in Frage: (1) Das lösliche usLtp kann sich gleichmäßig im „Periplasma“ verteilen, oder (2) in den Mureinsacculus diffundieren und sich somit in einem größeren Volumen verteilen. In beiden Fällen würde die Wahrscheinlichkeit zur Interaktion mit dem infizierenden Phagen erhöht werden. (3) Schließlich hat usLtp durch die fehlende Membran-Verankerung mehr Freiheitsgrade, um die zur Interaktion mit dem infizierenden Phagen notwendige Position im Raum einzunehmen. Bei diesen Überlegungen gilt es allerdings zu berücksichtigen, dass offensichtlich alle Proteine der Ltp-Lipoprotein-Superfamilie in der Zytoplasmamembran verankert sind. Welche biologischen Ursachen hierfür ausschlaggebend sein können, ist zurzeit noch unklar.

## **Die Ltp<sub>TP-J34</sub> Struktur spricht für ein Protein-bindendes Protein**

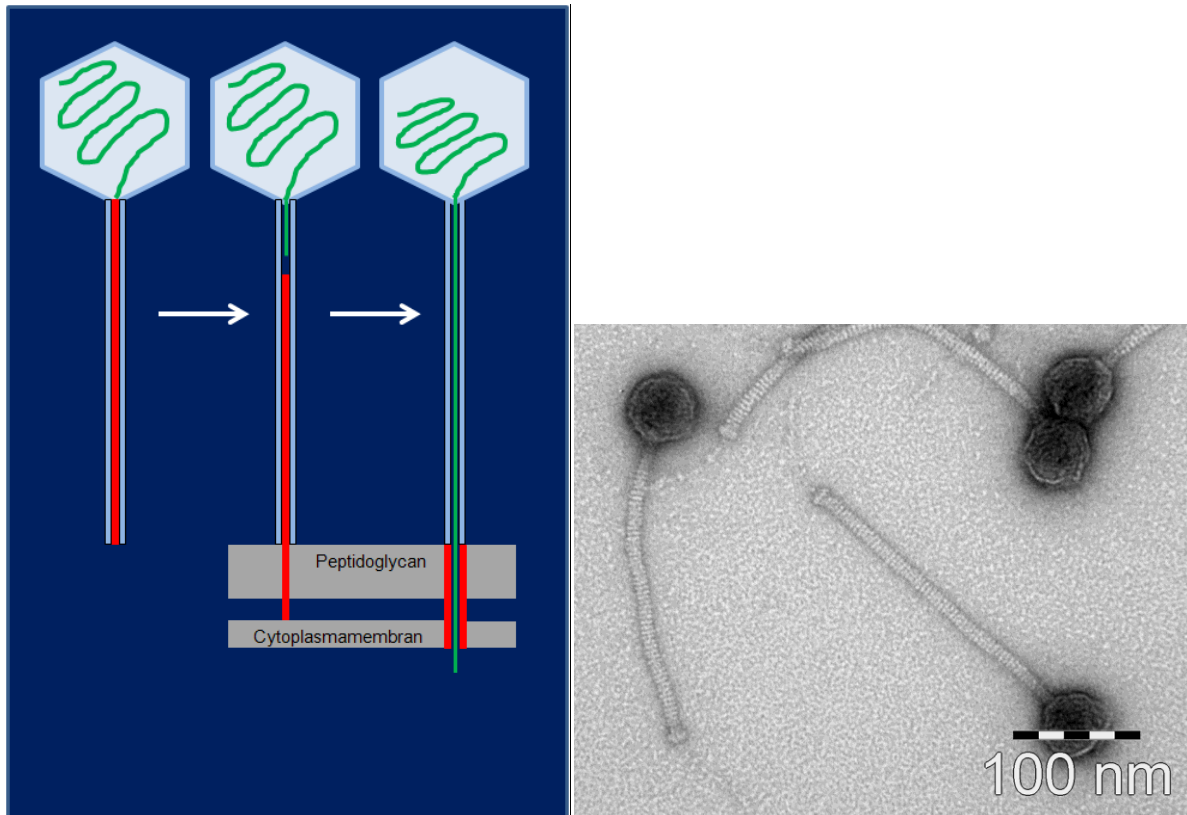
Als Zielstruktur des infizierenden Phagen, an die Ltp<sub>TP-J34</sub> bindet, scheint auf den ersten Blick die zu injizierende DNA in Frage zu kommen. Bei näherer Betrachtung ist dieses allerdings nicht sehr wahrscheinlich: Bevor die im Phagenkopf verpackte DNA in die Wirtszelle gelangen kann, muss bei den Phagen der *Siphoviridae*-Familie das *tape measure protein* (TMP) aus der Schwanzröhre herausgeschoben werden. Das TMP bestimmt wie ein Maßband die Schwanzlänge, indem die Schwanzröhre um dieses herum zusammengesetzt wird [8]. Nachdem TMP den Phagenschwanz verlassen hat, bildet es als multifunktionelles Protein [9] eine Pore in der Zytoplasmamembran, durch die die DNA die Membran passieren kann [10] (**Abb. 3**).



**Abb. 2: A**, Kristallstruktur des Ltp<sub>TP-J34-srr</sub> (A. Das Derivat [12] ist ein Dimer der aktiven Domäne des Ltp (Monomere: blau und lila; die kleinen freien Moleküle stellen Sulfat- und Phosphationen dar). Es wurde durch Expression als GST-Ltp Fusionsprotein gereinigt und mittels PreScission-Protease freigesetzt [7]. . **B**, Aminosäuresequenzen verschiedener Ltp<sub>TP-J34</sub>-Derivate. Die Signalsequenz ist unterstrichen, das im reifen Protein N-terminale, acylierte Cystein mit Sternchen gekennzeichnet, der unstrukturierte Spacerbereich kursiv und die Wiederholungssequenzen fett gedruckt. Kleine Buchstaben bezeichnen aufgrund der Klonierung eingefügte Nicht-Ltp-Aminosäuren.

Sinnvoll wäre es, wenn das TMP mit dem Schwanz verbunden bliebe. Dann könnte es die Schwanzröhre verlängern und einen durchgängigen Kanal vom Phagenkopf bis in das Zytoplasma schaffen. In einem solchen Fall wäre Ltp gar nicht in der Lage, an die DNA zu binden, da diese außerhalb des Zytoplasmas nicht frei vorliegen würde. Tatsächlich bestätigt die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Christian Cambillaus in Marseille aufgeklärte Röntgenstruktur der aktiven Domäne des LTP<sub>TP-J34</sub> [7], dass diese nicht für Bindung an DNA in Frage kommt (**Abb. 2**). Die aktive Domäne besteht aus zwei Wiederholungssequenzen, die jeweils aus drei Helices bestehen. Diese beiden Drei-Helix-Abschnitte und der zwischen ihnen

gebildete Winkel entsprechen sehr genau der Struktur des RecX-Proteins, das an DNA-gebundene RecA-Filamente bindet [11].



**Abb. 3:** Bedeutung des TMP (*tape measure protein*) für die DNA-Injektion der Bakteriophagen. **A**, Mechanismus der DNA-Injektion. Nach Bindung an den Rezeptor wird die DNA-Freisetzung aus dem Phagenkopf induziert. Dabei wird das TMP (rot) aus der Schwanzröhre herausgeschoben. Es inseriert sich in die Zytoplasmamembran und bildet dort die Pore, durch die die DNA (grün) in das Zytoplasma der Zelle gelangt. **B**, Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines typischen Siphoviridae Phagen.

### **Ltp<sub>TP-J34</sub> bindet an das *tape measure protein* des Phagen P008**

Zur Aufklärung der Zielstruktur des LTP<sub>TP-J34</sub> im infizierenden Phagen wurden sechs Mutanten des Phagen P008 unabhängig voneinander isoliert, die deutlich weniger empfindlich gegenüber LTP<sub>TP-J34</sub> waren: Statt um acht Zehnerpotenzen war die Plaquebildung lediglich um Faktoren zwischen 7 und 50 reduziert. Die Sequenzierung aller sechs Mutanten-Genome zeigte, dass mit Ausnahme einer 240 bp großen Deletion im TMP-codierenden Gen einer Mutante jeweils nur eine Mutation in jedem Genom vorlag, die einen einzelnen Aminosäure-Austausch im

TMP zur Folge hatte. Unter den sechs unabhängig voneinander isolierten Mutanten wurden nur zwei unterschiedliche Aminosäuren-Austausche beobachtet [7]. Beide betrafen – ebenso wie die Deletion – die potenziell Membran überspannenden Bereiche. Die Deletion hatte nur eine geringfügige Verbesserung der Resistenz gegenüber Ltp zur Folge, sie bestätigte allerdings die Funktion des TMP, da die entsprechende Mutante einen verkürzten Phagen-Schwanz aufwies.

### **Ltp – ein Werkzeug zur Untersuchung der Phagen-DNA-Injektion)**

Mit der Identifizierung des TMP als Zielprotein des Ltp ist ein wichtiger Schritt sowohl hin zum Verständnis der SIE als auch der DNA-Injektion nicht-kontraktiler *Siphoviridae*-Phagen gelungen. Bei verhinderter Insertion des TMP in die Zytoplasmamembran wird die DNA statt in die Zelle in das „Periplasma“ injiziert und dort abgebaut. Es bleiben aber noch viele Fragen zu klären: Wie inseriert das TMP in die Bakterienmembran, und welchen Anteil haben die Transmembranbereiche daran? Wie wirken sich die isolierten TMP-Mutationen auf die Wechselwirkung mit Ltp bzw. mit der Wirtsmembran aus? Warum führt die Deletion zweier potenziell Membran-überspannender Helices im TMP nicht zum Verlust der Infektionsfähigkeit des Phagen? Wie findet das TMP seinen Weg durch den Mureinsacculus zur Zytoplasmamembran? Proteine der Ltp-Familie können hier wichtige Werkzeuge zur Aufklärung der Mechanismen sein.

### **Danksagung**

Wir danken allen unseren an den Arbeiten zu Ltp beteiligten MitarbeiterInnen und Christian Cambillau und seinem Team für die gute Zusammenarbeit.

### **Literatur**

[1] Donnelly-Wu M K, Jacobs W R Jr, Hatfull G F (1993) Superinfection immunity of mycobacteriophage L5: applications for genetic transformation of mycobacteria. *Mol Microbiol* **7**:407-417



- [2] Susskind M M, Botstein D, Wright A (1974) Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. III. Failure of superinfecting phage DNA to enter *sieA*<sup>+</sup> lysogens. *Virology* 62:350-366
- [3] Sun X, Göhler A, Heller K J et al.(2006) The *ltp* gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 encodes a lipoprotein which is expressed during lysogeny. *Virology* 350:146-157
- [4] Mahony J, McGrath S, Fitzgerald G F et al. (2008) Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes. *Appl Environ Microbiol* 74:6206-6215
- [5] Neve H, Zenz K I, Desiere F et al. (1998) The lysogeny DNA module from the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage TP-J34: comparison with phage phiSfi21 and implications for the modular theory of phage evolution. *Virology* 241:61-72
- [6] Cumby N, Davidson A R, Maxwell K L. (2012). The moron comes of age. *Bacteriophage* 2:225-228
- [7] Bebeacua C, Lorenzo Fajardo J C, Blangy S et al. (2013) X-ray structure of a superinfection exclusion lipoprotein from phage TP-J34 and identification of the tape measure protein as its target. *Mol Microbiol* 89:152-165
- [8] Pedersen M, Østergaard S, Bresciani J et al. (2000) Mutational analysis of two structural genes of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1 involved in tail length determination and baseplate assembly. *Virology* 276:315-328
- [9] Boulanger P, Jacquot P, Plancon L et al. (2008) Phage T5 straight tail fiber is a multifunctional protein acting as a tape measure and carrying fusogenic and muralytic activities. *J Biol Chem* 283:13556-13564
- [10] Feucht A, Schmid A, Benz R et al. (1990) Pore formation associated with the tail-tip protein pb2 of bacteriophage T5. *J Biol Chem* 265:18561-18567
- [11] Yang C Y, Chin K H, Yang M T et al. (2009) Crystal structure of RecX: a potent regulatory protein of RecA from *Xanthomonas campestris*. *Proteins* 74:530-537
- [14] Madej T, Adress KJ, Fong JH, et al. (2012) MMDB: 3D structures and macromolecular interactions. *Nucleic Acids Res* 40:D461-D464

Kurzvita Knut J. Heller:

**1969-1977** Biologiestudium und Promotion, Universität Münster; **1978-1987**  
Postdoktorand und Habilitation (**1985**), Universität Tübingen; **1984**  
Forschungsaufenthalt an der University of Virginia, Charlottesville, USA; **1987-1991**  
Professor an der Universität Konstanz; seit **1992** Leiter Institut für Mikrobiologie,  
damalige Bundesanstalt für Milchforschung (heute: Institut für Mikrobiologie und  
Biotechnologie, Max Rubner-Institut), Kiel; seit 1993 Honorarprofessor Universität  
Kiel

Kurzvita Horst Neve

**1975-1985** Biologiestudium und Promotion, Universität Kiel; seit **1985**: Leiter der  
Arbeitsgruppe „Elektronenmikroskopie/Bakteriophagen“, damalige Bundesanstalt für  
Milchforschung (heute: Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner-  
Institut), Kiel; seit **1991**: Lehrbeauftragter an der Univ. Kiel; 9 Monate  
Forschungsaufenthalt (**1992-1993**) an der Kgl. Veterinär- und Landwirtschaftlichen  
Hochschule, Kopenhagen (heute: Universität Kopenhagen)

Korrespondenz-Adresse:

Prof. Dr. Knut Heller

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie

Max Rubner-Institut

Hermann-Weigmann-Str. 1

24103 Kiel

Tel: 0431-609 2340; Fax 0431-609 2306; Email: [knut.heller@mri.bund.de](mailto:knut.heller@mri.bund.de)

