



Doctoral Thesis

## Proteotype-based Decoding of Signaling Networks Underlying Pathogenesis

**Author(s):**

Novy, Karel

**Publication Date:**

2015

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010590495> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 22796

***PROTEOTYPE-BASED DECODING OF SIGNALING  
NETWORKS UNDERLYING PATHOGENESIS***

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

presented by  
*KAREL NOVY*

*MSc Biotechnology, ETH ZURICH*

born on 12.06.1980

citizen of  
*Corsier-sur-Vevey VD, Switzerland*

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Ruedi Aebersold, examiner*  
*Prof Dr. Bernd Wollscheid, co-examiner*  
*Dr. Jason Mercer, co-examiner*

2015

## Summary

Most pathogens rely on host organisms for their replication and spread. During this opportunistic lifecycle, pathogens are challenged by numerous defense mechanisms deployed by the host. Under such selective pressure, pathogens have evolved subtle mechanisms to bypass the host's responses and to take advantage of the host molecular machinery. Over the course of the past decades, our (molecular) understanding of pathogens and their lifecycles has greatly improved. Nevertheless, viral pandemics, food and waterborne illnesses remain and multi-resistant bacterial pathogens are (re-)emerging. The methodologies applied in the past - mainly focusing on single genes or proteins - have been instrumental in providing basic molecular information about the molecular interplay between hosts and pathogens. A recent conceptual shift towards systems biology approaches may provide now the opportunity to gain a more comprehensive understanding of the molecular mechanism underlying pathogenesis, potentially providing new targets and strategies for drug development.

In this thesis I focused on the system-wide investigation of signaling mechanisms and pathogenesis of two pathogens - the prototype poxvirus vaccinia and the food-borne bacterium *Listeria monocytogenes*.

Quantitative mass spectrometry (MS)-based proteomic technologies enable now the unbiased and comprehensive characterization of the proteotype - the acute state of the proteome. Proteotype information can bridge the gap in understanding the genotype phenotype transition. In the context of this thesis I can show specifically how information generated on the proteotype level can provide direct mechanistic insights into the assembly process of vaccinia virus and the entry mechanism of *Listeria Monocytogenes*.

Virus entry is an important stage towards infection, however in order to spread the infection progeny virions need to be assembled and released. Therefore we investigated the vaccinia virus assembly process and the impact of the viral F10 kinase and the viral H1 phosphatase. Both dual specificity enzymes were reported to be required at selected stages during vaccinia morphogenesis, but their functional mode of action was not known. By using a phosphoproteomic strategy in combination with F10 and H1 inducible viruses,

we defined the F10/H1 viral phosphorylation-network. Through a detailed functional analysis of two newly identified substrates, the I7 protease required for proteolytic processing during virion maturation, and the viral early transcription factor, A7, I could show that virion morphogenesis and the transcriptional competence of newly assembled virions are directly dependent on reversible phosphorylation of S134 in I7 and Y367 in A7. These findings establish the molecular mode of action and a key role of F10/H1 in dynamic phospho-regulation during multiple stages of infectious poxvirus assembly.

*Listeria monocytogenes* has the impressive and disease-causing ability to cross three significant barriers in humans, namely the intestinal barrier, the blood-brain barrier and the fetoplacental barrier. Entry of *Listeria* into cells is mediated by the bacterial surface proteins internalin (Inl) A and B by interaction and activation of the human cell surface adhesion proteins E-cadherin and the hepatocyte growth factor receptor (MET), respectively. We investigated the InlB-dependent entry pathway of *Listeria monocytogenes* by quantitative surfaceome profiling of HeLa cells upon perturbation with soluble InlB. Despite the fact that this entry pathway was thought to be well characterized, we found that the lysosomal-associated membrane protein (LAMP-1) was enriched on the surface of cells treated with InlB. Treatment of cells with the secreted *Listeria* toxin LLO further demonstrated a more pronounced relocalization of LAMP-1 and microscopy studies revealed that LAMP-1 co-localizes with the invading bacteria on the plasma membrane. These findings suggest that the pore-forming toxin LLO, to a larger extent, and the bacterial surface protein InlB, to a lesser extent, induce the membrane repair mechanism of the host cell and these events are required for *Listeria* internalization. While internalization is promoted through the recruitment of LAMP-1-positive late endosomal/lysosomal compartments to the site of entry, the subsequent LLO-dependent escape of *Listeria* from the internalized compartment is hampered.

These molecular findings highlight a critical and delicate borderline between molecular strategies to hijack cellular machineries to invade host cells, and cellular functions designed to control infection by intracellular pathogens.

In conclusion, in this thesis a systems biology approach was taken to uncover the mechanisms underlying specific stages of pathogenesis induced by vaccinia virus and *Listeria monocytogenes*. The application of advances in

MS-based proteomics to gain insights into the mechanisms of pathogenesis is bridging the current gap in understanding the genotype to phenotype transition of host-pathogen interactions - through complementary information on the proteotype.

## Résumé

La plupart des pathogènes dépendent d'organismes hôte pour leur réplication et leur propagation. Durant ce cycle de vie opportun, les pathogènes sont défiés par de nombreux mécanismes de défense déployés par l'hôte. Sous une telle pression sélective, les pathogènes ont développé des mécanismes subtils afin d'éviter les réponses de l'hôte et de profiter de sa machinerie moléculaire. Au cours des dernières décennies, notre compréhension (moléculaire) du cycle de vie de nombreux pathogènes s'est grandement améliorée. Néanmoins, les pandémies virales, les maladies d'origine alimentaire et hydrique demeurent et des pathogènes bactérien multi-résistants sont entrainés de (ré-)émerger.

Les méthodes appliquées dans le passé - se concentrant principalement sur un nombre restreint de gènes ou de protéines - ont fourni des informations de base sur les interactions moléculaires entre hôtes et pathogènes.

Un récent changement conceptuel utilisant une approche de système biologique pourrait permettre d'acquérir une compréhension plus élaborée sur le mécanisme moléculaire sous-jacent de la pathogénèse, fournissant potentiellement de nouvelles cibles et stratégies pour le développement de médicaments.

Durant cette thèse, je me suis concentré sur l'investigation et la compréhension systémique des mécanismes de signalisation de deux pathogènes - vaccinia le prototype des poxvirus et la bactérie d'origine alimentaire *Listeria monocytogenes*.

Des méthodes quantitatives de spectrométrie de masse permettent désormais la caractérisation objective et exhaustive du protéotype - l'état actif du protéome.

Les informations protéotype peuvent aider dans la compréhension de la transition génotype phénotype.

Dans le cadre de cette thèse, je démontre précisément comment des informations générées au niveau du protéotype peuvent fournir de directes indications mécanistiques durant le processus d'assemblage du virus vaccinia et le mécanisme d'entrée de la bactérie *Listeria monocytogenes*.

L'entrée d'un virus est une étape importante vers l'infection, cependant afin de propager l'infection de nouveau virus doivent être assemblés et libérés.

Par conséquent, nous avons étudié le processus d'assemblage du virus vaccinia et l'impact de la kinase virale F10 et de la phosphatase virale H1.

Ces deux enzymes à double spécificité ont été reportées étant nécessaires à différents stades durant la morphogénèse de vaccinia, néanmoins leur mode d'action est inconnu.

En utilisant une stratégie phosphoprotéomique en combinaison avec des virus inducibles pour F10 et H1, nous avons défini le réseau virale de phosphorylation dépendant de F10 et H1.

Grâce à une analyse fonctionnelle détaillée de deux substrats identifiés, la protéase I7 requise pour la maturation de virions par dégradation protéolytique, et le facteur de transcription viral, A7, nous démontrons que la morphogénèse du virion et la compétence de transcription de virions nouvellement assemblés dépendent directement d'une phosphorylation réversible de la serine 134 sur I7 et de la tyrosine 367 sur A7.

Ces résultats établissent le mode d'action moléculaire et un démontrent le rôle clé de F10 / H1 dans la régulation dynamique de phosphorylation au cours de l'assemblage à multiples étapes de poxvirus infectieux.

*Listeria monocytogenes* a la capacité impressionnante et pathogénique de franchir trois barrières chez l'humain, à savoir la barrière intestinale, la barrière hémato-encéphalique et la barrière foeto-placentaire.

L'entrée de *Listeria* dans les cellules est médiée par les protéines de surface bactériennes internaline (Inl) A et B par l'interaction et l'activation avec les protéines humaine d'adhésion de surface cellulaire E-cadhérine et le récepteur du facteur de croissance des hépatocytes (MET), respectivement.

Nous avons étudié l'entrée de *Listeria* par la voie dépendante de InlB par analyse quantitative de la distribution de protéines humaine de surface (le surfaceome) sur des cellules HeLa en appliquant des protéines solubles InlB.

Malgré le fait que cette voie d'entrée a été caractérisée en grand détail, nous avons trouvé que la protéine de membrane associée au lysosome (LAMP-1)

était enrichi à la surface de cellules traitées avec InIB. En addition, le traitement de cellules avec la toxine sécrétée par *Listeria* LLO a démontré une relocalisation encore plus prononcée de LAMP-1, et de plus amples investigations par microscopie ont révélé que LAMP-1 co-localise avec les bactéries envahissantes sur la membrane plasmique de la cellule hôte.

Ces résultats suggèrent que la toxine porogène LLO, dans une grande mesure, et la protéine de surface bactérienne InIB, dans une moindre mesure, induisent le mécanisme de réparation de la membrane de la cellule hôte et ces événements sont nécessaires pour l'internalisation de *Listeria*.

Alors que l'internalisation est promue par le recrutement de compartiments endosomales tardifs ou de compartiments lysosomales, l'échappement de *Listeria* par formation de pore par LLO du compartiment internalisé et positive pour LAMP-1 est compromis.

Ces résultats mettent en évidence une délicate balance moléculaire entre les stratégies moléculaires de détournement des machineries cellulaires utilisées par *Listeria* pour envahir les cellules hôtes, et les fonctions cellulaires conçues pour contrôler l'infection induites par des pathogènes intracellulaires.

En conclusion, dans cette thèse une approche de système biologique a été prise afin de découvrir les mécanismes sous-jacents de la pathogénèse induite par le virus vaccinia et *Listeria monocytogenes*.