



Doctoral Thesis

Molecular analysis of Salmonella type III secretion: transport and activity of the virulence factors SopE and SipA

Author(s):

Schlumberger, Markus

Publication Date:

2006

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005209999> →

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](#).

**Molecular analysis of *Salmonella* type III secretion:
transport and activity of the virulence factors SopE and SipA**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of

DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

MARKUS SCHLUMBERGER

Dipl. Natw., Swiss Federal Institute of Technology Zurich

born on September 24, 1976
from Steinhausen ZG, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt

Prof. Dr. Hubert Hilbi

Zurich, 2006

Summary

Salmonella spp. are Gram-negative, enteropathogenic bacteria that infect a variety of mammalian, avian and reptile hosts. Salmonellosis are among the most common and widely distributed food borne diseases in humans and represent a major public health and economical burden worldwide. The two type III secretion systems (TTSS) encoded on *Salmonella* pathogenicity islands (SPI) 1 and 2 are of key importance for the virulence and pathogenicity of *Salmonella* spp.. TTSS function as molecular injection needles that serve to deliver bacterial virulence factors, the effector proteins, directly into eukaryotic host cells. Inside their target cell, these effectors act in concert to manipulate host cell functions in a way that serves the bacteria to successfully establish and maintain an infection.

The SPI-1 TTSS is required for initiating intestinal inflammation and triggers invasion into non-phagocytic cells. Central for the invasion of *Salmonella* spp. is the activation of the host Rho GTPases Rac1 and Cdc42 by effectors delivered via the SPI-1 TTSS. Rac1 and Cdc42 are key regulators of actin cytoskeletal organization. The activity of Rho GTPases is determined by their G-nucleotide loading state. Activation of Rho GTPases is mediated by G-nucleotide exchange factors (GEFs), which catalyze the exchange of the GTPase-bound nucleotide from GDP to GTP.

Previous work demonstrated that the SPI-1 TTSS-translocated effector SopE acts as a potent GEF for Rac1 and Cdc42. The crystal structure of the SopE-Cdc42 complex revealed a number of interactions which were predicted to be involved in SopE-catalyzed G-nucleotide exchange. In order to analyze the catalytic role of these interactions, selected amino acids within the catalytic domain of SopE were mutated. The contribution of these amino acids to G-nucleotide exchange on Cdc42 was evaluated by measuring the catalytic performance of the different SopE variants in mediating G-nucleotide release from Cdc42 *in vitro*. Additionally, the ability of these SopE variants to induce remodeling of the host actin cytoskeleton in tissue culture cells was analyzed. This analysis showed that SopE uses a flexible catalytic loop, the GAGA-loop, to distort Cdc42 conformation and cause GDP release. In addition to the unique GAGA-loop, a number of other catalytically important contacts between SopE and Cdc42 were identified which interestingly resemble key contacts found in eukaryotic GEFs. In summary, structural data and functional analysis of the SopE-Cdc42 interaction showed that SopE accurately mimics the catalytic mechanism of eukaryotic GEFs to efficiently activate host Rho GTPases and promote bacterial invasion.

The rapid SPI-1 mediated induction of host signaling pathways leading to *Salmonella* invasion and pro-inflammatory responses requires not only a high activity of the translocated effectors, but also their efficient transport into the host cell via the TTSS. In this thesis, novel assays to analyze the type III transport of the SPI-1 effector SipA in real time have been developed. Upon its TTSS-mediated injection into eukaryotic cells, SipA accumulates in small foci at the bacteria-host cell interface. This work demonstrated that a fusion protein of green fluorescent protein (GFP) with InvB, the SPI-1 encoded chaperone for SipA, is efficiently recruited to sites of SipA foci formation. Real time imaging of the recruitment of GFP-InvB to the sites of SipA injection revealed that type III transport of SipA starts within a few seconds after docking of the bacteria to the host cell and ends after ca. 80-600 sec when the preformed bacterial pool of SipA is exhausted. Rapid depletion of the preformed intrabacterial pools of SipA, and also SopE, was confirmed using an optimized technique for immunofluorescence staining of intrabacterial proteins in combination with real time imaging of the infection process. Quantification of the bacterial SipA pool by Western blot analysis allowed for the first time to estimate transport rates for the type III secretion process (ca. 7-60 SipA molecules / sec). These results illustrate the efficiency of host cell manipulation by means of the SPI-1 TTSS.

While the accumulation of SipA in small foci inside eukaryotic cells facilitates sensitive detection of SipA transport in real time, the functional role of SipA foci formation remained unclear. A central region within SipA which is required for the proper localization of SipA inside host cells could be identified by deletion analysis. In contrast to this central region of SipA, termed the accumulation-enhancing domain, the well-characterized C-terminal actin-binding domain does not appear to contribute to SipA foci formation, but is essential for the functions of SipA in *Salmonella* virulence.

In conclusion, efficient injection into host cells, proper localization and high biochemical activity of *Salmonella* effector proteins form the basis for efficient manipulation of eukaryotic cells by the SPI-1 TTSS.

Zusammenfassung

Salmonella spp. sind Gram-negative, Darm-pathogene Bakterien, welche eine Vielzahl von Säugetieren, Vögeln und Reptilien infizieren können. Salmonellosen sind weit verbreitet, gehören zu den häufigsten menschlichen Erkrankungen durch kontaminierte Lebensmittel und stellen dadurch eine weltweite gesundheitliche und ökonomische Belastung für die Gesellschaft dar. Die zwei Typ III Sekretionssysteme (TTSS), welche auf den *Salmonella* Pathogenitätsinseln (SPI) 1 und 2 kodiert sind, haben eine zentrale Bedeutung für die Virulenz und Pathogenität von *Salmonella* spp.. TTSS fungieren als molekulare Injektionsnadeln, um bakterielle Virulenzfaktoren, die Effektorproteine, direkt ins Zytosol eukaryotischer Zellen zu transportieren. Das Zusammenspiel dieser Effektoren bewirkt die Manipulation von Wirtszell-Funktionen und ermöglicht damit den Bakterien die Infektion zu etablieren und aufrecht zu erhalten.

Das SPI-1 TTSS wird für das Auslösen der Darmentzündung und für die Invasion der *Salmonella* spp. in nicht-phagozytierende Zellen benötigt. Diese Invasion wird vermittelt über die Aktivierung der Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 durch Effektoren, welche über das SPI-1 TTSS in die Wirtszelle tranloziert werden. Rac1 und Cdc42 spielen eine zentrale Rolle bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Die Aktivität von Rho GTPasen hängt vom gebundenen G-Nukleotid (GTP oder GDP) ab. G-Nukleotid Austauschfaktoren (GEFs) aktivieren Rho GTPasen, indem sie den Austausch des an die GTPase gebundenen Nukleotids von GDP zu GTP katalysieren.

Frühere Forschungsergebnisse zeigten, dass der über das SPI-1 TTSS transportierte Effektor SopE eine hohe GEF-Aktivität für Rac1 und Cdc42 aufweist. In der Kristallstruktur des SopE-Cdc42 Komplexes wurde eine Reihe von Interaktionen gefunden, welche zum SopE-vermittelten G-Nukleotid Austausch beitragen könnten. Um die Rolle dieser Interaktionen genauer zu untersuchen, wurden die beteiligten Aminosäuren in der katalytischen Domäne von SopE mutiert. Der Beitrag dieser Aminosäuren zur Nukleotid-Austauschreaktion an Cdc42 wurde analysiert durch Messungen der katalytischen Aktivität dieser SopE Varianten bei der Dissoziation des G-Nukleotids von Cdc42 *in vitro*. Zusätzlich wurde die Fähigkeit der verschiedenen SopE Varianten zur Induktion von Aktin-Zytoskelett Umlagerungen in Zellkultur getestet. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine flexible Schleife in SopE, der GAGA-loop, eine zentrale Rolle bei der Katalyse der GDP-Dissoziation von Cdc42 spielt. Zusätzlich zum GAGA-loop wurden weitere katalytisch wichtige Interaktionen zwischen SopE und

Cdc42 identifiziert. Interessanterweise wurden ähnliche katalytisch wichtige Interaktionen teilweise auch in eukaryotischen GEFs gefunden. Die Kombination der Struktur des SopE-Cdc42 Komplexes mit der Funktionsanalyse aus dieser Arbeit zeigt, dass SopE trotz unterschiedlicher Struktur den katalytischen Mechanismus von eukaryotischen GEFs nachahmt, um die effiziente Aktivierung der Wirtszell-Rho GTPasen und damit die Invasion der Salmonellen zu bewirken.

Um Wirtszell-Signalwege, welche zu Invasion und Entzündungsantworten führen, schnell anschalten zu können, müssen die aktiven Effektoren auch effizient über das SPI-1 TTSS in die Wirtszelle transportiert werden. In dieser Arbeit wurden Methoden entwickelt, um den Typ III Transport des SPI-1 Effektors SipA in Echtzeit zu analysieren. Bei der TTSS-vermittelten Injektion in eukaryotische Zellen akkumuliert SipA an den Kontaktstellen zwischen Bakterium und Wirtszelle. Es konnte gezeigt werden, dass ein Fusionsprotein von InvB, dem SPI-1 kodierten Chaperon für SipA, mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) effizient an die Stellen rekrutiert wird, wo SipA in der Wirtszelle akkumuliert. Filmaufnahmen der Rekrutierung von GFP-InvB zu den SipA-Akkumulationsstellen zeigten, dass der Typ III Transport von SipA innerhalb weniger Sekunden nach dem Andocken der Bakterien an die Wirtszellen beginnt und etwa 80-600 sec später aufhört, sobald der Vorrat von SipA im Inneren des Bakteriums erschöpft ist. Durch Immunfluoreszenz-Färbung von SipA, und auch SopE, im Bakterienzytosol in Kombination mit Filmaufnahmen des Infektionsprozesses wurden diese Ergebnisse bestätigt.

Quantifizierung des Vorrats an SipA im Inneren des Bakteriums durch Western blot Analyse machte es erstmals möglich, Transportraten des Typ III Sekretionsprozesses abzuschätzen (ca. 7-60 SipA Moleküle / sec). Diese Ergebnisse veranschaulichen die Effizienz der Wirtszell-Manipulation durch das SPI-1 TTSS.

Die Akkumulation von SipA in Wirtszellen ermöglicht eine empfindliche Detektion des SipA Transports in Echtzeit, aber die funktionelle Bedeutung dieser Akkumulationen ist unklar. Durch Mutagenese-Studien wurde eine Akkumulations-fördernde Domäne im zentralen Bereich von SipA identifiziert, welche für die korrekte Lokalisation von SipA in Wirtszellen benötigt wird. Im Gegensatz dazu trägt die gut untersuchte Aktin-Bindungsdomäne am C-Terminus von SipA nicht zur SipA Akkumulation bei, ist aber essenziell für die Virulenzfunktion von SipA *in vivo*.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die effiziente Wirtszell-Manipulation durch das SPI-1 TTSS durch schnelle Injektion, korrekte Lokalisation und hohe biochemische Aktivität der *Salmonella* Effektorproteine erreicht wird.