

Phosphoinositide-metabolizing enzymes affecting trafficking and replication of *Legionella pneumophila* within *Dictyostelium discoideum*

Doctoral Thesis

Author(s):

Weber, Stefan Severin

Publication date:

2008

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005765087>

Rights / license:

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

DISS. ETH NO. 18048

**Phosphoinositide-metabolizing enzymes
affecting trafficking and replication of
Legionella pneumophila within *Dictyostelium discoideum***

A dissertation submitted to the

ETH ZÜRICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

STEFAN SEVERIN WEBER

Dipl. Natw. ETH

born June 20, 1980

citizen of Emmen LU and Zürich

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H. Hilbi (examiner)

Prof. Dr. W.-D. Hardt (co-examiner)

Prof. Dr. A. Helenius (co-examiner)

Zürich, 2008

SUMMARY

The causative agent of a severe pneumonia called Legionnaires' disease, *Legionella pneumophila*, employs the Icm/Dot type IV secretion system to upregulate phagocytosis and to establish a replicative vacuole in amoebae and macrophages. *Legionella*-containing vacuoles (LCVs) do not fuse with lysosomes but recruit early secretory vesicles and finally constitute a replicative vacuole in close association with the endoplasmic reticulum. The social amoeba *Dictyostelium discoideum* serves as a good model system to analyze host-pathogen interactions with *L. pneumophila*.

Here we analyzed the role of host cell phosphoinositide metabolism during uptake and intracellular replication of *L. pneumophila* in *D. discoideum*. Genetic and pharmacological evidence suggested that class I phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) are dispensable for phagocytosis of wild-type *L. pneumophila* but inhibit intracellular replication of the bacteria. PI3Ks also participate in the modulation of the LCV, as in the absence of PI3Ks the transition from "tight" to "spacious" vacuoles was strongly inhibited, implying that the formation of spacious vacuoles is not necessary for efficient intracellular replication. Interestingly, we identified the Icm/Dot-translocated protein SidC and its paralogue SdcA to bind specifically to phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdIns4P) *in vitro* and to localize preferentially to the LCV in absence of functional PI3Ks. The presence of PtdIns4P on the LCV was confirmed using a specific antibody or a PtdIns4P-binding pleckstrin homology domain as probes. Thus, we identified PtdIns4P as the first lipid marker on the LCV. Our results indicate that *L. pneumophila* exploits this lipid to anchor secreted effector proteins to the LCV.

Furthermore, we analyzed the role of inositol polyphosphate 5-phosphatases (IP5Ps) during phagocytosis and intracellular replication of *L. pneumophila*. While phagocytosis was not severely affected in absence of any of four distinct IP5Ps in *D. discoideum*, 2-3 orders of magnitude more *L. pneumophila* were released by amoebae lacking the IP5P Dd5P4, a close homologue of human OCRL1 (Oculocerebrorenal syndrome of Lowe). Mutations in the *OCRL1* gene locus lead to a human hereditary disease affecting kidneys, eyes and brain of the patients. OCRL1 has been implicated in retrograde transport between endosomes and the *trans*-Golgi network. In absence of Dd5P4, LCVs accumulated the ER marker calnexin more efficiently, and the transition from "tight" to "spacious" LCVs was blocked. Enhanced growth and impaired LCV dynamics within the *D. discoideum* Δ Dd5P4 mutant strain were complemented by Dd5P4 but not by the catalytically inactive IP5P. Furthermore, Dd5P4 was

shown to be enzymatically active on LCVs. Ectopically expressed Dd5P4 as well as OCRL1 were recruited to LCVs in *D. discoideum* via an NH₂-terminal domain previously not implicated in membrane targeting, and OCRL1 was also identified on LCVs in macrophages. Dd5P4₁₋₁₃₂ accumulated on LCVs in an Icm/Dot-dependent manner. OCRL1₁₋₂₃₆ was bound by *L. pneumophila* LpnE, which also interacted with phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) *in vitro* and with LCV membranes. These results provide evidence that in addition to early secretory vesicles budding from the ER-to-Golgi intermediate compartment, the LCV also acquires material trafficking between the *trans*-Golgi network and endosomes to form a replicative vacuole. In summary, we demonstrate that *D. discoideum* is a suitable model to analyze the role of phosphoinositide metabolism during uptake and intracellular replication of *L. pneumophila*.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Legionärskrankheit, eine schwere Lungenentzündung, wird durch den bakteriellen Erreger *Legionella pneumophila* verursacht. Dieses Bakterium verwendet das Icm/Dot Typ 4 Sekretionssystem (T4SS), um effizient von Amöben und Makrophagen aufgenommen zu werden und eine Replikations-permissive Vakuole zu bilden. *Legionella*-Vakuolen (LV) verhindern die Fusion mit Lysosomen und verschmelzen mit frühen sekretorischen Vesikeln, woraufhin die Bakterien in einer Vakuole replizieren, die mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert ist. Die soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum* ist ein zweckmässiges Modellsystem, um die Wirt-Pathogen Interaktionen mit *L. pneumophila* zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde die Rolle des Phosphoinositid-Metabolismus bezüglich Aufnahme und intrazellulärer Vermehrung von *L. pneumophila* in *D. discoideum* untersucht. Genetische wie auch pharmakologische Experimente zeigten, dass Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3K) der Klasse I für die Aufnahme in Wirtszellen keine Rolle spielen, jedoch das intrazelluläre Wachstum von *L. pneumophila* reduzieren. PI3K sind an der Entstehung von ausgedehnten LV beteiligt, da diese Entwicklung in Abwesenheit von PI3K ausblieb. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die Bildung von ausgedehnten Vakuolen für ein effizientes Wachstum der Bakterien in Wirtszellen nicht nötig ist. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass das Icm/Dot T4SS Substrat SidC und dessen Paralog SdcA *in vitro* spezifisch an Phosphatidylinositol 4-Phosphat (PtdIns4P) binden, und in Abwesenheit von funktionellen PI3K bevorzugt auf LV lokalisieren. Das Vorhandensein von PtdIns4P auf LV wurde mit einem spezifischen Antikörper, sowie mit einer PtdIns4P-bindenden Pleckstrin-Homologie-Domäne als Sonde nachgewiesen. PtdIns4P ist der erste Lipid Marker, der auf LV identifiziert werden konnte. Wir folgern aus diesen Resultaten, dass *L. pneumophila* PtdIns4P verwendet, um sekretierte Effektorproteine auf den LV zu verankern.

Des Weiteren haben wir die Rolle von Inositol Polyphosphat 5-Phosphatasen (IP5P) während der Internalisierung und intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* untersucht. Die Aufnahme der Bakterien wurde durch die Abwesenheit keiner der vier verschiedenen *D. discoideum* IP5P markant beeinflusst. Das intrazelluläre Wachstum der Bakterien war jedoch 100-1000-fach effizienter in Wirtszellen ohne die IP5P Dd5P4. Dd5P4 weist grosse Homologie zu humanem OCRL1 (Oculocerebrorenales Syndrom von Lowe) auf. Mutationen im *OCRL1* Genlokus führen zur Erbkrankheit Lowe-Syndrom, welche die Funktion von

Augen, Nieren und Gehirn betroffener Patienten beeinträchtigt. OCRL1 ist in den retrograden Transport von Vesikeln zwischen Endosomen und dem *trans*-Golgi Netzwerk involviert. In Dd5P4-defizienten Zellen wurde der ER Marker Calnexin effizienter an LV angereichert, und die Ausbildung von ausgedehnten LV war verhindert. Die gesteigerte Wachstumsrate von *L. pneumophila* in $\Delta Dd5P4$, sowie die ausbleibende Entwicklung ausgedehnter LV, konnte mit Plasmid-kodierter Dd5P4 komplementiert werden, nicht aber mit einer katalytisch inaktiven IP5P, und Dd5P4 zeigte katalytische Aktivität auf LV. Es konnte zudem gezeigt werden, dass in *D. discoideum* ektopisch exprimierte Dd5P4 sowie OCRL1 durch NH₂-terminale Domänen an die LV rekrutiert werden. Diese Domänen wurden bislang noch nicht mit der Lokalisierung an Membranen in Verbindung gebracht. Endogenes OCRL1 wurde zusätzlich auf LV in Makrophagen identifiziert. Dd5P4₁₋₁₃₂ lokalisierte nur an LV, welche Bakterien mit funktionellen T4SS enthielten. OCRL1₁₋₂₃₆ interagiert mit dem *L. pneumophila*-Protein LpnE, welches *in vitro* an Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PtdIns3P) band und auf LV detektiert werden konnte. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass für die Ausbildung einer Replikations-permissiven Vakuole, eine Interaktion der LV nicht nur mit frühen sekretorischen Vesikeln, sondern auch mit Vesikeln, die zwischen dem *trans*-Golgi Netzwerk und Endosomen verkehren, stattfindet. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass *D. discoideum* einen geeigneten Modellorganismus darstellt, um die Rolle des Phosphoinositid-Metabolismus für die Aufnahme und die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* zu untersuchen.