



Doctoral Thesis

Secretory IgA enforces "caged growth" of Salmonella Typhimurium - a story of being trapped

Author(s):

Moor, Kathrin

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010778693> →

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

DISS. ETH Nr. 23612

SECRETORY IGA ENFORCES "CAGED GROWTH" OF *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

- A STORY OF BEING TRAPPED

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCE of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

KATHRIN MOOR

MSc ETH in Biology, ETH Zurich

born on May 14th 1985

citizen of Zofingen (AG)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt

Dr. Emma Slack

Prof. Dr. Annelies Zinkernagel

Prof. Dr. Manfred Kopf

2016

THESIS SUMMARY

Mucosal surfaces are prominent sites for non-vector borne pathogen-entry. In the intestine, the situation is especially challenging, since the dense microbiota and potential enteropathogens are separated by only a few layers from the sterile lamina propria. It is broadly accepted that immunoglobulin A (IgA) plays an important role in coordinating the establishment and the maintenance of the intestinal microbiota, however very little is understood about the protective mechanisms attributed to this antibody isotype. Only very few mucosal vaccines that aimed at inducing intestinal IgA are in regular clinical use, predominantly as trials have ended with excess adverse effects or poor protection. This can most likely be attributed to our poor understanding of how exactly protective immunity at mucosal surfaces functions. The presented work aims towards a better mechanistic understanding of IgA-mediated protection during blooms of *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) after antibiotic-induced dysbiosis.

In order to study the mechanism of IgA-mediated protection in the intestine, we first had to develop tools to reliably induce intestinal high-avidity IgA and to measure and characterize the nature of this antibody response. The mucosal immune system is compartmentalized away from systemic sites. Therefore, induction of intestinal IgA responses requires oral delivery of the antigen. However, since the gastrointestinal tract is colonized with a dense microbiota and constantly flooded by a variety of antigens, the induction of adaptive immunity in the intestine is tightly regulated, and the threshold for inducing immune responses is extremely high. To reliably inactivate high numbers of bacteria, while maintaining their antigenic properties, our strategy was to incubate them with the strongly oxidizing reagent peracetic acid. We could demonstrate that this treatment is much more efficient to inactivate high numbers of a broad range of bacteria as compared to traditional methods such as pasteurization, and maintains antigenicity better than autoclaving. The oral administration of peracetic acid killed bacteria leads to the robust induction of high-avidity, T cell dependent intestinal IgA responses specific for the bacterial strain used for vaccine production. This occurs in the absence of intestinal inflammation or colonization of the host by the vaccination strain. Therefore, this vaccination strategy allows the study of high-avidity IgA-mediated protection in an otherwise unperturbed host. Due to its sterile nature, this vaccine is safe even in the context of severe immunodeficiency. In combination with a newly developed method for the analysis of bacterial surface-specific antibodies by flow cytometry, we could demonstrate that vaccination with peracetic acid-inactivated *S. Typhimurium* (PA.STm) protects from systemic pathogen spread and pathology in the murine model of non-typhoidal Salmonellosis in an O-antigen- and IgA-dependent manner.

In order to further study the mechanism of IgA-mediated protection, we applied a variety of microscopy techniques, combined with mathematical models that aim to describe the within-host population dynamics of *S. Typhimurium*. Thereby we found that in the presence of high-avidity IgA and an open niche for colonization, *S. Typhimurium* undergo caged growth. This growth pattern is caused by the unsuccessful physical segregation of two cells after division, resulting in the formation of clonal microcolonies that fuse into more complex oligoclonal aggregates as the bacterial population in the intestine reaches higher densities. We could demonstrate that caged growth is far more efficient than density-dependent classical agglutination when realistic infectious inocula sizes are ingested. Since in PA.STm-vaccinated mice most intestinal bacteria reside in aggregates, the actual infectious bacterial population (that is the non-aggregated bacteria) is reduced by roughly hundredfold. As the bacterial tissue invasion and further systemic spread in PA.STm-vaccinated mice are reduced by the same order of magnitude, this phenomenon is in fact sufficient to explain all vaccine-mediated protection in our model.

Interestingly, caged growth also has several consequences for *S. Typhimurium* population genetics. We found that clonal growth delays the density-dependent exchange of genetic material. As IgA-mediated caged growth leads to the confinement of potential plasmid donor and recipient clones in physically separated microcolonies, we observed a delay in the rate of plasmid transfer. Interestingly, we could also demonstrate a secondary effect of high-avidity IgA on the induction of inflammation-mediated phage transfer between *Salmonella* spp.. Additionally, the non-segregation of clones results in more extensive clonal extinction in the gut lumen. Therefore, we report for the first time that vaccine induced high-avidity IgA has the potential to decrease horizontal gene transfer which can be observed during blooms of enteropathogens.

Taken together, this work presents new tools to induce intestinal high-avidity IgA and mechanistically study its protective properties. We have found unexpected effects of high-avidity IgA on pathogen within-host evolution and horizontal gene transfer. This new insight in how IgA can protect against fast-growing bacteria could help to improve the current difficulties in the development of efficient vaccines against enteric bacterial pathogens.

ZUSAMMENFASSUNG

Schleimhäute sind prominente Eintrittspforten für Pathogene, die nicht durch Vektoren übertragen werden. Im Darm ist die Situation besonders kritisch, da die dichte Mikrobiota und potentielle Darmpathogene nur durch wenige Schichten von der sterilen darunterliegenden Lamina Propria getrennt sind. Die Meinung, dass Immunglobulin A (IgA) eine wichtige Rolle dabei spielt, die Etablierung und den Erhalt der Mikrobiota zu koordinieren, ist weit verbreitet. Über die genauen Schutzmechanismen, die diesem Antikörper-Isotyp zugeschrieben werden, ist jedoch wenig bekannt. Es sind nur sehr wenige mukosale Impfungen zur Induktion intestinaler IgA-Antworten in regelmässigem klinischem Gebrauch, da die bisherigen Studien starke Nebenwirkungen oder schlechten Impfschutz zeigten. Dies kann höchstwahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass unser Verständnis, wie genau protektive Immunität an Schleimhäuten erreicht werden kann, nach wie vor sehr unzureichend ist. Das Ziel der präsentierten Arbeit ist, ein besseres mechanistisches Verständnis des Schutzes durch IgA während dem extremen Wachstum von *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) nach Antibiotikabehandlungen zu erreichen.

Um die Schutzmechanismen von IgA im Darm zu untersuchen, mussten wir zuerst Methoden entwickeln, die es uns auf der einen Seite ermöglichten, verlässlich intestinale IgA-Antworten zu induzieren, die sich durch eine hohe Antikörperavidität auszeichnen. Auf der anderen Seite sollten diese Methoden es zusätzlich ermöglichen die Antikörperantwort charakterisieren. Das mukosale Immunsystem ist von systemischen immuninduktiven Stellen getrennt. Deshalb ist es für die Induktion von intestinalen IgA-Antworten unerlässlich, das Antigen oral zu verabreichen. Infolge der dichten Besiedlung des Darms durch die Mikrobiota und den konstanten Durchfluss einer Vielfalt von Antigenen ist die Induktion von adaptiven Immunantworten im Darm streng reguliert und der Grenzwert des Stimulus, der überschritten werden muss, um erfolgreich eine Immunantwort zu induzieren, extrem hoch. Um verlässlich grosse Mengen an Bakterien zu inaktivieren und gleichzeitig ihre Antigencharakteristiken zu erhalten, verwendeten wir Peressigsäure, welches stark oxidierende Eigenschaften aufweist. Wir konnten zeigen, dass diese Behandlung, verglichen mit traditionellen Methoden wie Pasteurisierung, viel effizienter ist, um grosse Mengen einer breiten Reihe von Bakterien zu inaktivieren und gleichzeitig deren antigenes Potential besser zu erhalten als durch Autoklavierung. Die orale Verabreichung solcher durch Peressigsäure inaktivierter Bakterien induziert eine robuste, T-Zellen abhängige IgA-Antwort mit starker Avidität für den Bakterienstamm, der für die Produktion der Impfung verwendet wurde. Dies geschieht ohne die Induktion intestinaler Entzündungsreaktionen sowie Kolonisierung des Wirts durch den Impfstamm. Deshalb ermöglicht diese Impfstrategie Studien über den mechanistischen Schutz von hoch spezifischem IgA in einem sonst unveränderten Organismus. Durch die sterile Verabreichungsform ist die Anwendung dieser Impfung sogar im Kontext schwerer

angeborener Immundefekte sicher. In Kombination mit einer neu entwickelten Methode zur Analyse von bakterienoberflächenspezifischen Antikörpern konnten wir zeigen, dass Impfung mit Peressigsäure-inaktivierten *Salmonella* Typhimurium (PA.STm) vor einer systemischen Ausbreitung des Pathogens und vor intestinaler Pathogenese im Mausmodell der nicht-typhoidalen Salmonellose schützt und dies in einer O-Antigen- und IgA-abhängigen Weise geschieht.

Um die Mechanismen dieses IgA-abhängigen Schutzes genauer zu untersuchen, verwendeten wir verschiedene Mikroskopie-Techniken und kombinierten diese mit mathematischen Modellen, die darauf abzielen, Populationsdynamiken von *S. Typhimurium* im Wirt zu beschreiben. Dadurch fanden wir heraus, dass Salmonellen in der Gegenwart von hochavidem IgA und einer offenen Nische kettenartig wachsen. Dieses Wachstumsmuster hat seine Ursache in der nicht erfolgreichen physikalischen Trennung zweier Bakterien nach deren Teilung und resultiert in der Bildung von klonalen Mikrokolonien, die zu komplexeren oligoklonalen Aggregaten fusionieren, wenn die Bakterienpopulation im Darm eine höhere Dichte erreicht. Wir konnten zeigen, dass diese wachstumsbedingte Agglutination effizienter ist als klassische dichteabhängige Agglutination, wenn realistische Mengen an Bakterien eingenommen werden. Da sich die meisten Bakterien im Darm von PA.STm-geimpften Mäusen in Aggregaten befinden, verringert dies die effektive infektiöse Population (die freien Bakterien) etwa um den Faktor hundert. Weil die Invasion der Bakterien ins Gewebe und deren weitere systemische Verbreitung in PA.STm-geimpften Mäusen um denselben Faktor verringert ist, reicht dieses Phänomen aus, um den kompletten Impfschutz in unserem Modell zu erklären.

Dieses Wachstumsmuster hat auch Konsequenzen für die Populationsgenetik von *S. Typhimurium*. Wir fanden heraus, dass der dichteabhängige Austausch von genetischem Material verlangsamt wird. Weil das kettenartige Wachstum potentielle Plasmid-Spender- und Empfängerklone räumlich trennt, konnte eine Verlangsamung des Plasmidtransfers beobachtet werden. Interessanterweise konnten wir einen sekundären Effekt von hochavidem IgA nachweisen und zeigen, dass der entzündungsinduzierte Transfer von Phagen zwischen *Salmonella* spp. unterbunden wird. Zusätzlich resultiert die klonale Struktur der intestinalen Bakterienpopulation in einem erheblichen Verlust von Klonen aus dem Darm. Somit konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass hochavidem IgA das Potential hat, den horizontalen Gentransfer zwischen schnellwachsenden bakteriellen Darmpathogenen zu verringern.

Zusammenfassend präsentiert diese Arbeit neue Methoden, um hochavidem intestinales IgA zu induzieren und seine protektiven Funktionen zu untersuchen. Unerwarteterweise konnten wir dadurch auch sehr interessante Effekte von hochavidem IgA auf die Evolution von Bakterien und den horizontalen Gentransfer im Darm nachweisen. Dieses neugewonnene

Wissen, wie hochavides IgA gegenüber schnellwachsenden Bakterien wirkt, könnte helfen, die aktuellen Schwierigkeiten bei der Entwicklung effizienter Impfungen gegen bakterielle Darmpathogene zu überwinden.