

The evolution and adaptation of Enterobacteriaceae in the murine gut

Doctoral Thesis

Author(s):

Bakkeren, Erik

Publication date:

2020-10

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000448622>

Rights / license:

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

DISS. ETH NO. 27095

The evolution and adaptation of Enterobacteriaceae in the murine gut

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

Presented by

Erik Bakkeren

MSc. Biology, ETH Zurich

Born November 25th 1993

Citizen of Canada/France

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt

Prof. Dr. Médéric Diard

Prof. Dr. Sebastian Bonhoeffer

Prof. Dr. Gregory Velicer

Prof. Dr. Dr. Adrian Egli

2020

Summary

During infection, pathogens interact with both competitors and the host to establish a niche. These interactions dictate pathogen evolution. In order to understand how, we must comprehend the mechanisms by which pathogens evolve within and between hosts, and the consequences of this on the global spread of a given pathogen. Due to the rise of antibiotic resistance, an adequate understanding of 1) the conditions that promote the spread of antibiotic resistance and 2) the processes that make pathogens successful and stabilize their virulence is critical for the development of antibiotic-independent strategies to manage bacterial infections.

Distinct evolutionary processes alter allele frequencies, defining evolution: mutation, gene flow through horizontal gene transfer, genetic drift, and selection. All of these processes can be observed in natural pathogen populations. However, in order to study these in detail, we require accessible experimental systems. Specifically, we need a relevant host infection model where evolutionary processes can be tractably monitored in real time. Here, I will use *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (S.Tm) and *Escherichia coli* mouse colonization models, both of which fit these criteria to study the evolution of virulence, antibiotic resistance, and co-evolution with the host immune response.

S.Tm engages in virulence through cooperative behavior. Some cells invade into host cells by expressing *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI)-1-encoded genes. The resulting gut inflammation represents a public good fueling Enterobacteriaceal growth in the gut lumen. However, this makes cooperative virulence vulnerable to genetic mutants (cheaters) that do not pay the cost associated with virulence, but can still profit from the inflammation. By optimizing a technique to measure the proportion of cooperators to cheaters in fecal populations, I explored the conditions that support the emergence and stability of cooperative virulence *in vivo*, using S.Tm as a model organism. Specifically, I focused on *hilD*, which encodes a central regulator of SPI-1 expression that is frequently disrupted in cheaters. To study the role of horizontal gene transfer in the stabilization of cooperative virulence, I encoded HilD on a conjugative plasmid. *In vivo* infection experiments revealed that virulence can emerge through horizontal gene transfer, and that host-to-host transmission is essential for stabilizing S.Tm virulence, suggesting why so many virulence factors are encoded on mobile genetic elements.

Second, I analyzed the spread of antibiotic resistance plasmids in the gut. I studied the spread of clinically relevant *E. coli* plasmids among Enterobacteriaceae in the murine gut. This data has complemented *in vitro* work by my collaboration partners. We found that the speed of plasmid spread is determined by both strain- and plasmid-specific factors, and that *in vitro* high throughput testing can qualitatively predict plasmid spread in the gut. Additionally, we investigated the conditions that modulate plasmid transfer. As a consequence of invasion to trigger inflammation, S.Tm forms reservoirs inside of host tissues that can survive antibiotic therapy. These cells are not genetically resistant, but are instead defined by their phenotypic recalcitrance (persisters). This established that plasmids housed inside of S.Tm persisters can be transferred to strains that occupy the gut lumen after the cessation of antibiotic therapy, indicating a role for persisters as plasmid reservoirs promoting antibiotic resistance plasmid spread. We found that vaccination can slow this process down.

Lastly, I investigated the adaptation of S.Tm in the gut of vaccinated mice. Vaccination triggers an immune response, coating the surface of bacteria with secretory IgA. In collaboration with the Diard and Slack labs, we showed that S.Tm predictably escapes IgA coating through defined mechanisms that generate a fitness trade-off: evasion of the host immune response renders S.Tm unfit in the next host. This knowledge can be harnessed to generate vaccines that aim to trap S.Tm in an evolutionary dead end.

Overall, this work both quantifies the spread of antibiotic resistance plasmids, as well as uncovers aspects of virulence evolution and within-host adaptation that could be used for therapeutic intervention. We show that vaccination against *S.Tm*, which has roles in slowing the spread of mobile genetic elements, preventing invasion, and generating fitness trade-offs, is a promising method and should be safely applicable.

Zusammenfassung

Während der Infektion interagieren Krankheitserreger mit Konkurrenten und dem Wirt, um eine Nische für sich zu schaffen. Diese Wechselwirkungen bestimmen die Evolution der Krankheitserreger. Um zu verstehen, wie die Evolution stattfindet, müssen wir die Mechanismen aufklären, durch welche sich die Krankheitserreger innerhalb und zwischen den Wirten entwickeln und die daraus folgenden Konsequenzen auf die globale Ausbreitung eines gegebenen Krankheitserregers untersuchen. Aufgrund des Anstieges von Antibiotikaresistenzen ist ein angemessenes Verständnis von 1) den Bedingungen, die die Ausbreitung der Antibiotikaresistenz fördern und 2) die Prozesse, welche Krankheitserreger erfolgreich machen und ihre Virulenz stabilisieren, entscheidend für die Entwicklung von Strategien zur Behandlung bakterieller Infektionen unabhängig von Antibiotika.

Unterschiedliche Evolutionsprozesse verändern die Allelfrequenzen und definieren Evolution: Mutation, Genfluss durch horizontalen Gentransfer, Gendrift und Selektion. Alle diese Prozesse können in natürlichen Populationen von Krankheitserregern beobachtet werden. Zugängliche experimentelle Systeme werden benötigt, um die Evolutionsprozesse im Detail zu untersuchen. Insbesondere wird ein relevantes Wirtsinfektionsmodell benötigt, mit dem Evolutionsprozesse in Echtzeit nachvollziehbar überwacht werden können. In dieser Arbeit werden *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (S.Tm) und *Escherichia coli* Mauskolonisationsmodelle verwendet, welche die Kriterien erfüllen, um die Entwicklung von Virulenz, Antibiotikaresistenz und Koevolution mit der Immunantwort des Wirts zu untersuchen.

S.Tm betreibt durch kooperatives Verhalten Virulenz. Einige Zellen dringen in Wirtszellen ein, indem sie *Salmonella* Pathogenitätsinsel (SPI)-1-kodierte Gene exprimieren. Die daraus resultierende Darmentzündung stellt ein öffentliches Gut dar, welches das Wachstum von Enterobacteriaceae im Darmlumen fördert. Dies macht kooperative Virulenz jedoch anfällig für genetische Mutanten (Betrüger), welche nicht die mit Virulenz verbundenen Kosten tragen, aber dennoch von der Entzündung profitieren können. Durch die Optimierung einer Technik zur Messung des Verhältnisses von kooperierenden zu betrügenden Bakterien in Stuhlpopulationen wurden die Bedingungen untersucht, welche die Entstehung und Stabilität der kooperativen Virulenz *in vivo* unterstützen, unter Verwendung von S.Tm als Modellorganismus. Ein besonderer Fokus wurde auf *hild* gelegt, welches einen zentralen Regulator der SPI-1-Expression kodiert, der bei Betrügern häufig gestört wird. Um die Rolle des horizontalen Gentransfers bei der Stabilisierung der kooperativen Virulenz zu untersuchen, wurde Hild auf ein konjugatives Plasmid kodiert. *In vivo* Infektionsexperimente zeigten, dass Virulenz durch horizontalen Gentransfer entstehen kann und dass die Übertragung von Wirt zu Wirt für die Stabilisierung der S.Tm Virulenz notwendig ist. Dies ist ein Hinweis darauf, warum so viele Virulenzfaktoren auf mobilen genetischen Elementen kodiert sind.

Des Weiteren wurde die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzplasmiden im Darm analysiert. Die Ausbreitung klinisch relevanter *E. coli* Plasmide unter Enterobacteriaceae Populationen im Darm der Maus wurde untersucht. Diese Daten haben die *in vitro* Arbeit der Kollaborationspartner ergänzt. Es wurde festgestellt, dass die Geschwindigkeit der Plasmidausbreitung sowohl durch Stamm- als auch durch Plasmid-spezifische Faktoren bestimmt wird und dass *in vitro* Hochdurchsatztests die Plasmidausbreitung im Darm qualitativ vorhersagen können. Zusätzlich wurden die Bedingungen, die den Plasmidtransfer modulieren, untersucht. Durch eine Invasion, welche eine Entzündung auslöst, bildet S.Tm Reservoirs innerhalb des Wirtsgewebes. Die Zellen in den Reservoirs können eine Antibiotikatherapie überleben. Diese Zellen sind nicht genetisch resistent, sondern werden durch ihre phänotypische Persistenz (persistente Zellen) definiert. Diese Erkennung zeigt, dass Plasmide, die in

persistenten *S.Tm* untergebracht sind, nach Beendigung der Antibiotikatherapie auf Stämme übertragen werden können, die das Darmlumen besiedeln. Dies deutet auf eine Rolle für persistente Zellen als Plasmidreservoir, welche die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzplasmiden fördern. Es konnte festgestellt werden, dass eine Impfung diesen Prozess verlangsamen kann.

Zuletzt wurde die Anpassung von *S.Tm* im Darm geimpfter Mäuse untersucht. Die Impfung löst eine sekretorische IgA Reaktion aus, wodurch die Oberfläche von Bakterien von IgA bedeckt wird. In Zusammenarbeit mit den Labors von Professor Diard und Professorin Slack konnte gezeigt werden, dass *S.Tm* der IgA Bedeckung durch definierte Mechanismen, welche einen Fitness-Kompromiss erzeugen, vorhersehbar entgeht: Die Umgehung der Immunantwort des Wirts macht *S.Tm* für die Besiedlung des nächsten Wirts ungeeignet. Dieses Wissen kann genutzt werden, um Impfstoffe zu entwickeln, welche *S.Tm* in eine evolutionäre Sackgasse führen.

Insgesamt quantifiziert diese Arbeit sowohl die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzplasmiden als auch Aspekte der Virulenz evolution und der Anpassung innerhalb des Wirts, die für therapeutische Interventionen verwendet werden könnten. Es konnte gezeigt werden, dass die Impfung gegen *S.Tm*, welche die Ausbreitung mobiler genetischer Elemente verlangsamt, eine Invasion verhindert und Fitness-Kompromisse hervorruft, eine vielversprechende Methode ist und sicher angewendet werden kann.