ETH zürich

ETH Library

The Legionella autoinducer synthase LqsA

characterization, signal production and biological role

Doctoral Thesis

Author(s):
Spirig, Thomas

Publication date:
2008

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-005650576

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.17763

The *Legionella* autoinducer synthase LqsA: characterization, signal production and biological role

A dissertation submitted to the

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

THOMAS SPIRIG

Dipl. Natw. ETH

born on March 4th, 1978
from Widnau and Winkel, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H. Hilbi, examiner
Prof. Dr. J. Vorholt, co-examiner

2008

Summary

Legionella pneumophila is a facultative intracellular bacterium that replicates within protozoan phagocytes. In fresh-water environments, the Gram-negative bacterium is found as free-living planktonic form or associated with biofilms. Upon inhalation of aerosols from contaminated water sources, the bacterium may also infect human alveolar macrophages resulting in a severe pneumonia termed Legionnaires' disease. In order to determine factors involved in replication and persistence of *L. pneumophila* within biofilms, we analyzed surface adherence and biofilm formation of the bacteria under different conditions by crystal violet staining and confocal microscopy. Our data demonstrate that surface attachment of *L. pneumophila* results in three-dimensional aggregates, but sessile cells do not replicate even in rich medium that allows axenic growth. In contrast, surface attached biomass accumulates upon replication of planktonic *L. pneumophila* or bacteria grown intracellularly in amoebae. Persistence of *L. pneumophila* on surfaces is influenced by other environmental bacteria, indicating that specific interactions between bacterial species modulate adherence. These findings may provide new strategies to control biofilm colonization by *L. pneumophila*.

The transition of *L. pneumophila* between intracellular and extracellular environments is coupled to a biphasic life cycle. The bacteria switch between a replicative and a transmissive phase and reciprocally express genes required for an efficient intracellular multiplication or motility and transfer to a new host, respectively. Adaptation to intracellular or extracellular environments and transition between different growth phases involves sensitive sensor systems and a complex regulatory network. Analysis of the *L. pneumophila* genome revealed genes encoding the autoinducer synthase LqsA and the sensor kinase LqsS. These enzymes are homologous to the *Vibrio cholerae cqsAS* quorum sensing system, which is involved in virulence regulation and biofilm formation. *LqsA* and *lqsS* are located in a cluster flanking the gene coding for the response regulator LqsR, which recently has been shown to be an element of the *L. pneumophila* virulence regulatory network. We demonstrate that expression of *lqsA* in *L. pneumophila* or *E. coli* results in the generation of diffusible signaling molecules and is able to functionally complement a *V. cholerae cqsA* deletion mutant. LAI-1 (*Legionella* autoinducer-1), the major product of LqsA, was identified as 3-hydroxypentadecan-4-one by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Together with the previously identified *Cholerae* autoinducer-1 (CAI-1), LAI-1 forms a novel family of α-hydroxyketone signaling molecules. Amino acid substitutions revealed that the enzymatic activity of LqsA is

dependent on a conserved lysine, that was shown to covalently bind the cofactor pyridoxal-5'-phosphate (PLP).

To elucidate a putative role for autoinducer-dependent signaling and gene regulation in *L. pneumophila*, we generated an *lqsA* deletion mutant and analyzed its phenotypes regarding virulence, growth and stress responses. The *L. pneumophila* strain lacking *lqsA* was less efficiently phagocytosed by host-cells. In contrast, LqsA was dispensable for other virulence traits, as well as bacterial growth, biofilm formation or stress responses. DNA microarray analysis revealed that 250 genes were differentially expressed in the *lqsA* mutant strain compared to wild-type *L. pneumophila* upon entry into the post-exponential growth phase. Virulence factors and flagellar components were down-regulated in absence of *lqsA*, while metabolic and bioenergetic genes and elements of the translation and transcription machinery were up-regulated.

Taken together, our data suggests that the PLP-dependent autoinducer synthase LqsA plays a role in regulation of bacterial metabolism and the biphasic life cycle of *L. pneumophila via* the production of α-hydroxyketone signaling molecules.

Zusammenfassung

Legionella pneumophila ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium, das sich in Amöben und anderen einzelligen Wirtsorganismen vermehrt. Das Gram-negative Bakterium existiert zudem im Süsswasser-Milieu in freier planktonischer Form oder assoziiert mit Biofilmen. Werden kontaminierte Aerosole inhaliert, kann das Bakterium Alveolärmakrophagen der menschlichen Lunge infizieren und so die Legionärskrankheit, eine schwere Lungenentzündung auslösen. Um Faktoren zu identifizieren, die für die Vermehrung und Persistenz von *L. pneumophila* in Biofilmen benötigt werden, analysierten wir die Adhärenz an Oberflächen und die Entstehung von Biofilmen unter verschiedenen Bedingungen mit Hilfe von Kristallviolett-Färbungen und konfokaler Mikroskopie. Unsere Resultate zeigen, dass *L. pneumophila* an Oberflächen haftet und dreidimensionale Aggregate bildet. Die sessilen Zellen vermögen jedoch auch in nährstoffreichem Medium nicht zu replizieren. Dagegen führt die Replikation planktonischer Bakterien oder die Vermehrung von *L. pneumophila* in Amöben zu einer Akkumulation von Biomasse auf Oberflächen. Dass die Persistenz von *L. pneumophila* auf Oberflächen zudem durch andere Bakterienstämme beeinflusst wird, ist ein Indiz dafür, dass spezifische Interaktionen der beteiligten Bakterienspezies die Adhärenz von *L. pneumophila* modulieren. Diese Erkenntnisse können zu neuen Strategien führen, um Kolonisation von Biofilmen durch *L. pneumophila* zu kontrollieren.

Der Übertritt von intrazellulären zu extrazellulären Lebensbedingungen durch *L. pneumophila* ist an einen zweiphasigen Lebenszyklus gekoppelt. Die Bakterien wechseln zwischen einer replikativen und einer transmissiven Phase und exprimieren selektiv Gene, die entweder für eine effiziente intrazelluläre Vermehrung oder für die Motilität und die Infektion eines neuen Wirts benötigt werden. Die Anpassung an unterschiedliche Bedingungen und der Wechsel zwischen verschiedenen Wachstumsphasen benötigen empfindliche Sensor-Systeme und vielschichtige Regulationsnetzwerke. Eine Analyse des *L. pneumophila* Genoms identifizierte Gene, welche für die Autoinducer-Synthase LqsA und die Sensor-Kinase LqsS kodieren. Diese Enzyme sind homolog zum *Vibrio cholerae cqsAS* Quorum-Sensing-System, das für die Regulation von Virulenz und Biofilmbildung verantwortlich ist. *LqsA* und *lqsS* bilden ein Cluster und flankieren ein Gen, das den Regulator LqsR kodiert. LqsR ist ein Bestandteil des regulatorischen Netzwerks, welches den Lebenszyklus und die Virulenz von *L. pneumophila* kontrolliert. Wir konnten zeigen, dass die Expression von *lqsA* in *L. pneumophila* oder *E. coli*

zur Entstehung eines diffundierbaren Singalmoleküls führt und eine *V. cholerae cqsA* Deletionsmutante funktionell zu komplementieren vermag. LAI-1 (*Legionella* autoinducer-1), das Hauptprodukt von LqsA, wurde mittels Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie als 3-Hydroxypentadecan-4-on identifiziert. LAI-1 bildet zusammen mit dem bereits identifizierten *Cholerae* autoinducer-1 (CAI-1) eine neuartige Familie von α-Hydroxyketon-Signalmolekülen. Ein Austausch von Aminosäuren zeigte, dass die enzymatische Aktivität von LqsA von der Anwesenheit eines konservierten Lysins abhängig ist, welches für die kovalente Bindung des Cofaktors Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) verantwortlich ist.

Um eine mögliche Funktion von Autoinducer-abhängiger Signalübertragung in der Genregulation von *L. pneumophila* aufzuklären, wurde eine *lqsA* Deletionsmutante hergestellt und deren Phänotyp bezüglich Virulenz, Wachstum und Stressantwort analysiert. Die *lqsA* Mutante wurde weniger effizient von Amöben und Makrophagen phagozytiert, zeigte jedoch keine weiteren Effekte bezüglich Virulenzmerkmalen, sowie bakteriellem Wachstum, Biofilmbildung oder Stressantwort. Eine DNA-Microarray-Analyse zeigte, dass in der *lqsA* Mutante 250 Gene unterschiedlich exprimiert wurden, verglichen mit einem *L. pneumophila* Wildtyp-Stamm, sobald die Bakterien in die post-exponentielle Wachstums-Phase eintreten. Virulenzfaktoren und Komponenten des bakteriellen Geisselapparates wurden in Abwesenheit von *lqsA* herunterreguliert, währenddem metabolische und bioenergetische Gene, sowie Elemente der Translations- und Transkriptionsmaschinerie hochreguliert wurden.

Unsere Daten zeigen, dass die PLP-abhängige Autoinducer-Synthase LqsA mittels Produktion eines α-Hydroxyketon-Signalmoleküls eine Rolle in der Regulation des bakteriellen Metabolismus und des zweiphasigen Lebenszyklus von *L. pneumophila* spielt.