

DISS. ETH NO. 23266

Single cell analysis tools for gene expression by *Salmonella* Typhimurium

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH ZURICH)

presented by

ISMETA CURKIĆ

M.Sc., Veterinärmedizinische Universität Wien

born on 17.10.1987

citizen of Austria

accepted on the recommendation of

Prof. Wolf-Dietrich Hardt

Prof. Martin Ackermann

Prof. Manfred Claassen

Prof. Hans-Martin Fischer

2016

Summary

Since its first description in 1885, *Salmonella enterica* has caused numerous cases of disease throughout the world. The non-typhoidal *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Typhimurium (*S. Tm*) is a major cause of foodborne disease worldwide and is mainly transmitted via contaminated food or water.

The pathogenicity of *Salmonella* spp. is based on the two type-three secretion systems, the type three secretion system 1 (TTSS-1 or T1) and the type three secretion system 2 (TTSS-2 or T2). Both TTSSs form needle-like structures. They contribute to different steps of the infection. The T1 is essential for invasion into host cells, whereas T2 allows intracellular survival and replication. The genes encoding a functional T1 needle are encoded on a 40 kb pathogenicity island, termed *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1). Its expression is highly regulated and its regulation includes core regulation factors as well as global regulators that are encoded outside of SPI-1. The core regulatory cascade that controls T1 expression is comprised of the transcription factors *hilD*, *hilA*, *hilC* and *rtsA*, which activate the expression of each other and display auto-regulatory feedback loops to amplify their own expression. The major known T1 repressor *hilE* is encoded outside SPI-1 and represses T1 by direct binding of the T1 master regulator HilD. This highly complex regulation cascade controls and fine-tunes T1 expression.

The expression of the T1 needle is very costly for *S. Tm* and causes a metabolic burden that is accompanied by a reduced growth rate of the T1 expressing (T1⁺) cells. Because of the "cost" paid by T1 expressing cells, only a small subpopulation of the bacterial cells expresses this virulence factor in a given environment. Although the genes of the T1 regulation cascade are well established and the bistable behavior of T1 has been demonstrated in several earlier studies, the source of bistability has remained unclear. To clarify the roles of the different T1 regulators, it would be of interest to study the expression of all regulatory genes behind T1 simultaneously in single cells. This would allow identifying expression patterns before *t1* is expressed and might give insights into the generation of T1 bistability. Previous studies used fluorescent proteins coupled to single or more genes to analyze gene expression in single cells. However, when analyzing gene expression dynamics using different fluorescent proteins, variable maturation kinetics of the variable chromophores bias the gene expression analyses.

Gene expression reporter systems that allow the dynamic analysis of several genes in real time without introducing a folding kinetics-based bias are still missing.

In Chapter 2, I describe the establishment of an invasin-based reporter system, a novel gene expression reporter system in *S. Tm* that might be used as alternative for fluorescent proteins. We fused a hemagglutinin epitope-tagged invasin reporter (*invA_{HA}*) to different SPI-1 encoded genes, and benchmarked its expression using standard *gfp* reporter. We could demonstrate that the *InvA_{HA}* reporter system performs at least as well as the fluorophore-based approach. This chapter provides important groundwork for the future establishment of a multidimensional *invA* reporter system using differentially epitope-tagged *invA* variants.

Chapter 3 describes the establishment of the microfluidics microscopy system, which allows the analysis of gene expression within single cells in a stable long-term incubation system. This setting provides a useful tool to assess the dynamics of the T1 regulatory genes, i.e. when combined with the epitope-tagged invasin reporters as described in Chapter 1.

Finally, we were analyzing the role of the RpoE-mediated membrane stress response during the expression of the T1 needle and cytoplasmic fluorophores. In particular, we addressed the role of the zinc-metalloprotease RseP, which is involved in the membrane stress response (Chapter 4).

Overall, this thesis provides important groundwork to demonstrate the suitability of the *invA_{HA}* reporter system for gene expression analyses as alternative for fluorescent reporters in *S. Tm*. This reporter system could be applied in the microfluidics microscopy setup, described in this thesis. Furthermore, this thesis points out the still unresolved complexity of T1 regulation.

Zusammenfassung

Seit der Beschreibung im Jahre 1885, hat *Salmonella enterica* weltweit zahlreiche Krankheitsfälle ausgelöst. Der nicht-typhoide Salmonellenstamm *Salmonella enterica* Subspezies *enterica* Serovar Typhimurium (*S. Tm*) ist einer der bedeutendsten Erreger von Lebensmittelinfektionen weltweit und wird hauptsächlich durch kontaminierte Nahrung oder Wasser übertragen.

Die Pathogenität von Salmonellen basiert auf den zwei Typ-3 Sekretionssystemen, Typ-3 Sekretionssystem 1 (TTSS-1 oder T1) und Typ-3 Sekretionssystem 2 (TTSS-2 oder T2). Beide Typ-3 Sekretionssysteme bilden nadelähnliche Strukturen. Sie sind an verschiedenen Schritten der Infektion beteiligt. Das T1 ist für die Invasion in die Wirtszelle essenziell, wobei das T2 das intrazelluläre Überleben und Replikation gewährleistet. Die Gene, die für eine funktionelle T1-Nadel kodieren, sind auf einer 40 kB grossen Pathogenitätsinsel, die als Salmonellen Pathogenitätsinsel 1 (SPI-1) bezeichnet wird, kodiert. Dessen Expression ist höchst reguliert und ihre Regulation umfasst sowohl Kern-Regulationsfaktoren als auch globale Regulatoren, die ausserhalb von SPI-1 kodiert sind. Die Kern-Regulationskaskade, die die T1 Expression kontrolliert, besteht aus den Transkriptionsfaktoren *hilD*, *hilA*, *hilC* und *rtsA*, die sich gegenseitig aktivieren und über Auto-Feedback Mechanismen besitzen, die ihre eigene Expression amplifizieren. Der wichtigste bekannte Repressor *hilE* wird ausserhalb von SPI-1 kodiert und reprimiert T1 durch direktes Binden an HilD. Diese hochkomplexe Regulationskaskade kontrolliert und stimmt die T1 Expression ab.

Die Expression der T1-Nadel ist für *S. Tm* sehr aufwändig und bewirkt eine metabolische Belastung, die eine reduzierte Wachstumsrate von Zellen, die T1 exprimieren (T1⁺ Zellen), mit sich zieht. Wegen des "Preises", den T1 exprimierende Zellen zahlen müssen, exprimiert nur eine kleine Subpopulation der genetisch identischen Population diesen Virulenzfaktor in der gegebenen Umwelt. Obwohl die Gene der T1 Regulationskaskade schon gut etabliert sind und das bistabile Verhalten von T1 schon in mehreren früheren Studien demonstriert wurde, ist der Ursprung der Bistabilität noch immer unbekannt. Um die Rollen der einzelnen T1 Regulatoren klarzustellen, wäre es interessant die Expression aller T1 Regulationsgene gleichzeitig in einzelnen Zellen zu bestimmen. Das würde erlauben, die Expressionsmuster

bevor *t1* exprimiert wird zu identifizieren, und könnte Hinweise zur Generation von T1 Bistabilität geben. Vorherige Studien verwendeten Fluoreszenzproteine, gekoppelt an einzelne oder mehrere Gene, um Geneexpression in einzelnen Zellen zu analysieren. Jedoch, wenn man Genexpressions-Dynamiken mit verschiedenen Fluoreszenzproteinen analysiert, können variable Reifungskinetiken der unterschiedlichen Chromophore die Geneexpressionsanalysen verfälschen. Geneexpressions-Reportersysteme, die dynamische Analysen von mehreren Genen in Realzeit erlauben, ohne die Verfälschung durch verschiedene Faltungskinetiken, sind noch nicht entwickelt.

Im Kapitel 2 beschreibe ich die Etablierung eines neuen Geneexpressions-Systems für *S. Tm*, das Invasin-basierende Reportersystem, das als Alternative für Fluoreszenzprotein genutzt werden könnte. Wir haben einen Hämagglutinin-getaggten Invasin-Reporter (*invA_{HA}*) an verschiedene SPI-1 kodierte Gene fusioniert und bewerteten dessen Expression mit dem Standardreporter *gfp*. Wir konnten demonstrieren, dass das *InvA_{HA}* Reportersystem zumindest genauso gut wie die Fluorophore-basierte Methode funktioniert. Dieses Kapitel stellt eine wichtige Grundlage für die zukünftige Etablierung eines multidimensionalen *invA* Reportersystemes dar, das auf verschiedenen getaggten *invA*-Varianten basiert.

Kapitel 3 beschreibt die Entwicklung eines Mikrofluidics-Mikroskopie Systems, das die Geneexpressionsanalyse in einzelnen Zellen in einem stabilen Langzeit-Inkubationssystem erlaubt. Dieser Aufbau stellt ein nützliches Werkzeug dar, um dynamische Analysen von T1 Regulationsgenen, zu ermitteln, wenn es z.B. mit Epitop-getaggten Invasin-Reportern, wie im Kapitel 1 beschrieben, kombiniert wird.

Letztendlich analysierten wir die Rolle der RpoE-vermittelten Membranstress-Antwort während der T1-Nadel Expression während der Expression von cytoplasmischen Fluorophoren. Insbesondere, haben wir die Rolle der Zink-Metalloprotease RseP, die in der Membranstress-Antwort beteiligt ist, adressiert (Kapitel 4).

Insgesamt stellt diese Doktorarbeit wichtige Fundamente dar, um die Brauchbarkeit des *invA_{HA}* Reportersystemes für Geneexpressions-Analysen in *S. Tm* als Alternative zu Fluoreszenzreportern zu demonstrieren. Dieses Reportersystem könnte im Mikrofluidics-Mikroskopie Setup, das in dieser Arbeit beschrieben wird, verwendet werden. Weiterhin, zeigt diese Arbeit die noch immer ungelöste Komplexität der T1 Regulation auf.