

Diss. ETH No. 17474

**Virulence regulation in *Legionella pneumophila* by the *lqs* cluster:
The response regulator LqsR promotes
pathogen - host cell interactions**

A dissertation submitted to the
ETH ZÜRICH

for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by

André Tiaden

Diplom - Biologe, University of Basel
born on April 20th, 1977
in Basel, Switzerland
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H. Hilbi, examiner
Prof. Dr. H. Hennecke, co-examiner
Prof. Dr. C. Buchrieser, co-examiner

Zürich, 2007

Summary

Legionella pneumophila is an opportunistic human pathogen that replicates within the alveolar macrophages of the lung, which may result in a severe pneumonia termed Legionnaires' disease. The Icm/Dot type IV secretion system is a major virulence factor and required for the formation of an endoplasmic reticulum-derived *Legionella* containing vacuole (LCV). In the environment, the gram-negative bacteria survive as facultative intracellular parasites of fresh water amoebae or persist in multi-species biofilms. *L. pneumophila* adopted a biphasic life cycle to accommodate the exposure to extra- and intracellular environments. The need for a rapid and sensitive adaptation to changing conditions is reflected by a complex regulatory network governing the transition from an intracellular replicative phase to a virulent form, the latter of which is transmitted to a new host. Thus, *L. pneumophila* mutually exclusively induces genes that are either required for replication or transmission. Nutrient (amino acid) starvation and possibly additional signals stimulate the two-component system LetAS and the stationary sigma factor RpoS, which leads to an induction of virulence traits, including motility, efficient uptake by host cells and establishment of an LCV. In addition to the pathways involving RpoS or LetAS, further signal transduction cascades might contribute to the differentiation process of *L. pneumophila*. A bioinformatic analysis of the *L. pneumophila* genome revealed the *lqs* (*legionella quorum sensing*) gene cluster, which shows homologies to the *cqsAS* quorum sensing system in *Vibrio cholerae*. The *lqs* genes encode a putative quorum sensing autoinducer synthase (*lqsA*) and a sensor histidine kinase (*lqsS*), which flank a novel response regulator (*lqsR*). Organization and orientation of the *lqsA-lqsR-lqsS* or *lqsA-lqsS* cluster was found to be conserved among different species, suggesting that the *lqs* genes constitute a functional unit. Exceptional to *L. pneumophila* is the presence of a gene homologous to *hdeD* in *Escherichia coli*, which encodes a putative integral membrane protein. The current PhD thesis is focused on the characterization of the response regulator LqsR and the function of the *lqs* system in the regulatory events that govern the biphasic life cycle and the interaction of *L. pneumophila* with phagocytic hosts.

LqsR is the prototypic member of a new group of response regulators, sharing an unknown C-terminus not similar to conserved output domains, such as a DNA-binding HTH motif. The characterization of an *lqsR* deletion mutant demonstrated that LqsR positively regulates pathogen-host cell interactions, such as efficient phagocytosis, formation of the LCV, intracellular replication and cytotoxicity, while negatively regulating the entry of *L.*

pneumophila into the replicative growth phase. Furthermore, expression of *lqsR* is dependent on RpoS and to a lesser extent on LetA. Production of the LqsR protein depends on the growth phase, yielding a peak upon onset of the stationary (transmissive) phase. Differential expression of *lqsR* is underlined by the presence of a putative *luxbox* motif and a transcriptional attenuation site located in the 5'-upstream region of the gene. DNA microarray experiments revealed that *lqsR* regulates directly or indirectly the expression of genes involved in virulence and cell division, consistent with a role in the regulatory network that controls the transition from replicative to transmissive phase. To investigate the function of the complete *lqs* cluster in the regulation of *L. pneumophila* virulence, we constructed a deletion mutant lacking all four genes of the cluster. The *lqs* mutant shows an aberrant morphology, defects in the flagellum apparatus and virulence-associated phenotypes similar to the *lqsR* single mutant. However, compared to the deletion of only *lqsR*, many phenotypes were more severe upon disruption of the *lqs* cluster, suggesting a synergistic effect of the *lqs* genes. Transcriptome analysis reflected the inability of an *lqs* cluster mutant to induce the transmission regulon in the stationary phase. In the stationary growth 380 genes were differentially regulated in the *lqs* mutant compared to wild-type *L. pneumophila*. While replicative traits including protein production, bioenergetics and metabolism were upregulated in the stationary phase, genes encoding proteins implicated in virulence such as Icm/Dot secreted-effectors, eukaryotic-like genes and flagellum genes were repressed. Proteome analysis of cytoplasmic proteins confirmed the results obtained by the micro-array experiments.

Taken together, the data presented in the current thesis expand our model of the regulatory network that controls the biphasic life style and virulence of *L. pneumophila*. The response regulator LqsR is a crucial element of the very network controlled by the RpoS-LetAS-CsrA complex. Our results suggest that LqsR together with other proteins encoded by the *lqs* cluster genes constitutes a functional unit, which contributes to the induction of virulence traits and to the establishment of an effective pathogen-phagocyte interaction.

Zusammenfassung

Legionella pneumophila ist ein opportunistisches, humanpathogenes Bakterium, das sich in Alveolarmakrophagen der Lunge vermehrt und so die Legionärskrankheit, eine schwere Pneumonie, auslösen kann. Das Icm/Dot Typ IV Sekretionssystem ist ein entscheidender Virulenzfaktor der Legionellen und ermöglicht den intrazellulären Bakterien eine wachstumspermissive Vakuole (LCV) zu etablieren, welche aus Wirtszellmaterial wie das Endoplasmatische Retikulum gebildet wird. In der Umwelt überleben die Gram-negativen Bakterien als fakultativ intrazelluläre Parasiten von freilebenden Amöben oder überdauern in Biofilmen. *L. pneumophila* hat einen zweiphasigen Lebenszyklus entwickelt um sich den unterschiedlichen extra- und intrazellulären Lebensbedingungen anzupassen. Ein vielschichtiges Netzwerk von Regulatoren kontrolliert den Übergang von einer intrazellulären replikativen Phase in eine virulente Form, die einen neuen Wirt befallen kann. Dieser Lebenszyklus widerspiegelt die Notwendigkeit, schnell und gezielt auf Änderungen der äusseren Umgebung zu reagieren und ermöglicht *L. pneumophila* selektiv die Expression ausgewählter Gene zu aktivieren, die entweder in der replikativen oder der transmissiven Phase benötigt werden. Nährstoffknappheit und unbekannte weitere Signale stimulieren das Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystem LetAS und den stationären Sigmafaktor RpoS. Diese beiden Faktoren initiieren die Induktion von Virulenzfaktoren, welche Motilität, effiziente Wirtszellinvasion und die Etablierung einer LCV ermöglichen. Parallel zu LetAS und RpoS steuern vermutlich weitere Faktoren die Differenzierung von *L. pneumophila*.

Eine bioinformatische Untersuchung des *L. pneumophila* Genoms, mit der Absicht zusätzliche Regulationssysteme zu identifizieren, offenbarte den *Legionella* Quorum sensing (*lqs*) Gencluster, welcher Homologien zum *cqsAS* Quorum Sensing System in *Vibrio cholerae* aufweist. Der *lqs* Cluster kodiert eine mutmassliche Autoinducer Synthase (*lqsA*) und eine Sensor-Histidin-Kinase (*lqsS*), welche einen bisher unbekanntem Regulator (*lqsR*) flankieren. Die Organisation und Orientierung des *lqsA-lqsR-lqsS* oder *lqsA-lqsS* Clusters ist in einer Vielzahl verschiedener Bakterienspezies konserviert, was darauf hindeutet, dass die *lqs* Gene eine funktionelle Einheit bilden. Einzigartig für den *lqs* Cluster ist ein zusätzliches Gen *hdeD*, das für ein vermeintliches Membranprotein kodiert. Die vorliegende Doktorarbeit beschreibt die Charakterisierung des Regulators LqsR und gibt einen Einblick, in welcher Weise das *lqs* System zur Regulation des zweiphasigen Lebenszyklus und der Interaktion von *L. pneumophila* mit Wirtszellen beiträgt.

LqsR ist ein Mitglied einer neuen Familie von Zwei-Komponenten Regulatoren, deren C-Terminus keine Ähnlichkeit zu bekannten Regulatordomänen, wie z.B. einem DNA-bindenden HTH Motiv, besitzt. Die Untersuchung einer *lqsR* Deletionsmutante zeigte, dass der Regulator verschiedene Virulenzdeterminanten stimuliert, wie effiziente Phagozytose durch Wirtszellen oder Bildung einer LCV, und gleichzeitig den Übertritt der Legionellen in die replikative Wachstumsphase unterdrückt. Eine detaillierte Analyse der Expression von *lqsR* ergab überdies, dass RpoS und in geringerem Masse LetAS die Produktion von LqsR kontrollieren. Zusätzlich weist das Expressionsmuster von *lqsR* eine Abhängigkeit der Wachstumsphase des Bakteriums auf. So kann ein Maximum der LqsR Produktion zu Beginn der stationären Phase beobachtet werden. DNA-Microarray Experimente bestätigten, dass LqsR direkt oder indirekt die Expression von Genen mit Funktion in Virulenz und Zellteilung reguliert. Diese Daten unterstützen somit das Konzept, dass LqsR ein Bestandteil des Regulationsnetzwerkes darstellt, das den Übergang von der replikativen zur transmissiven Phase steuert.

Um eine mögliche Funktion des *lqs* Clusters zu untersuchen, wurde eine *L. pneumophila* Mutante erstellt, in welcher alle vier *lqs* Gene deletiert wurden. Diese Mutante weist eine anomale Morphologie, Defekte im Flagellumapparat auf und ähnliche Virulenz-assoziierte Phänotypen wie die *lqsR* Mutante auf. Jedoch zeigen mehrere Phänotypen der *lqs* Mutante ein stärkeres Ausmass als jene der *lqsR* Einzelmutante und suggerieren somit einen synergistischen Effekt der *lqs* Gene. Eine Transkriptomanalyse spiegelt denn auch die Probleme der *lqs* Mutante wider, das Transmissionsregulon in der stationären Phase effizient zu induzieren. So sind 380 Gene in der stationären Wachstumsphase anders reguliert als in einem *L. pneumophila* Wildtypstamm. Transmissions-typische Faktoren, wie Icm/Dot sekretierte Effektoren, Eukaryotisch-ähnliche Gene oder Flagellumgene sind reprimiert, wohingegen replikative Merkmale, wie die Protein-Produktionsmaschinerie, bioenergetische und metabolische Abläufe hochreguliert sind. Eine Proteomanalyse von zytoplasmatischen Proteinen bestätigte überdies die Resultate der Microarray Experimente.

Die vorgestellten Daten dieser Doktorarbeit erweitern das bisherige Wissen über das regulatorische Netzwerk, welches den Lebenszyklus und Virulenz von *L. pneumophila* kontrolliert. Der Zwei-Komponenten Regulator LqsR ist ein kritischer Bestandteil dieses Netzwerkes, welches von dem RpoS-LetAS-CsrA Komplex verwaltet wird. Unsere Resultate stützen die Hypothese, dass *lqsR* zusammen mit weiteren Genen des *lqs* Clusters eine funktionelle Einheit darstellen, welche zur Induktion von Virulenzmerkmalen und der Etablierung einer effizienten Pathogen-Wirt-Interaktion beiträgt.