

**Large-scale perturbation studies to uncover
host cellular pathways contributing to
Salmonella Typhimurium invasion**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Saskia Kreibich

Dipl.-Biologin, Philipps-Universität Marburg
born on 26.04.1983, Rheinberg,

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof Dr. Wolf-Dietrich Hardt
Prof Dr. Christoph Dehio
Prof Dr. Klemens Rottner
Dr. Jason Mercer

Summary

Infections by the food borne pathogen *Salmonella Typhmimurium* are a global health problem and represent one of the leading causes for human gastroenteritis. The infection occurs through the ingestion of contaminated food or drinking water and is characterized by disease symptoms like diarrhea, nausea, vomiting and abdominal pain. Even though it is a self-limiting infection in healthy individuals, the accompanied dehydration can possess a life-threatening risk for infants, elderly or the immunocompromised. In addition, low hygiene standards in the developing countries make *S.Tm* infections a frequent problem. For improvement of therapy, the infectious process needs detailed understanding on a molecular level.

S.Tm depends on the expression of two pathogenicity islands (SPI-1 and SPI-2) that encode type three secretion system (TTSS-1 and TTSS-2) by which they translocate effector proteins into the host cell. The secreted SPI-1 effectors "trigger" internalization into non-phagocytic cells through their concerted manipulation of the host cytoskeleton. The SPI-2 effectors are induced at the intracellular stage and promote the maturation and maintenance of the *Salmonella*-containing vacuole (SCV) - an intracellular niche where the pathogen can reside and replicate. Several host cell factors are known to contribute to *S.Tm* infection, but the coordination of the complex network of host cell factors required for host cell invasion remains ill-defined. Therefore, we set out to systematically uncover host cell factors that promote successful *S.Tm* infection by conducting a broad range of RNAi screens. The InfectX consortium, consisting of collaborators from fields of infection biology and bioinformatics, was providing a fruitful platform to perform, optimize and analyze the RNAi screens.

First, we set up a robust and stable screening assay of *S.Tm* infection that was well adapted to the common InfectX screening standards to allow for an automated, high-throughput performance of RNAi screens. The performance of distinct RNAi screens demonstrated a high technical reproducibility for screening replicates. However, the comparison of distinct kinome screens targeting the same genes with different siRNAs unraveled low correlation and low overlap between the identified "hits". This led to the discovery of high prevalence of off-target effects in RNAi screens. These are likely caused by siRNAs that unspecifically target via their 7mer seed sequence and thus act similar to microRNAs. Hence, we analyzed the involvements of microRNAs during *S.Tm* infection. This confirmed significant changes of *S.Tm* infection in response to overexpressed or silenced microRNAs, which demands for more detailed analysis in the future.

In order to improve the low overlap of hits identified by the distinct kinome screens, the Parallel Mixed Model was developed by collaborators of InfectX. This method aims at extracting relevant kinome hits by using the statistical power of the simultaneous analysis of siRNA screens performed for the different pathogens. This uncovered known players of *S.Tm* infection like mTOR, but also novel hits, whose mechanistic basics will be subject of future work.

Furthermore, we assessed the origin of siRNA-mediated off-target effects. By extracting data of distinct siRNA screens performed with different pathogens (*Brucella abortus*, Uukuniemi Virus, *S.Tm*), the presence of pathogen-specific seed sequences could be predicted via a bioinformatic strategy developed by A. Franceschini, R. Meier and C. von Mering. These predictions were confirmed in

follow-up screens and seeds were identified that either abolished or enhanced the respective infection. The use of custom siRNAs, which combined an identified seed with arbitrary downstream sequences, clearly uncovered the seed as the origin of pathogen-specific off-target effects. This could be demonstrated, since the custom siRNAs phenocopied previously observed infection defects of inventory siRNAs in a specific fashion. Insertions of single point mutations in the seed region abolished the effect. These findings will be of importance for establishing improved seed correction algorithms. Moreover, seeds inhibiting infection might develop into tools to fight infections.

Even though many host cell factors that we originally identified in our genome-wide screen turned out to be false-positive candidates, we were still able to uncover novel aspects of host cell invasion by phenotypic clustering of hits. This revealed that loss of several autophagy factors led to an impaired SCV maturation and abolished SPI-2 induction. We could confirm this novel contribution of autophagy to the *S.Tm* infection by the use of autophagy inhibitors/inducers as well as with mouse embryonic fibroblasts deficient for ATG5, which depicts an essential autophagy component for autophagosome elongation and closure. The supportive function of autophagy during *S.Tm* infection was dependent on a functional TTSS-1, but unaffected by a loss of TTSS-2. Furthermore, the phenotype was detected with the onset of the SPI-2-dependent reporter expression. This points to a mechanism, which precedes the well-established hyperproliferation of *S.Tm* in the cytosol of autophagy-deficient cells. Finally, we observed a diminished recruitment of Rab7 to the SCV in autophagy-deficient cells, which suggests a connective link between endocytosis and autophagy to promote a successful SCV maturation during *S.Tm* infection. These findings revealed that genome-wide RNAi screens can uncover novel molecular features of *S.Tm* host cell invasion.

Zusammenfassung

Infektionen mit dem Lebensmittel-assoziierten Pathogen *Salmonella* Typhimurium (S.Tm) sind ein bestehendes globales Gesundheitsproblem und stellen eine der Hauptursachen für humane Gastroenteritis dar. Die Infektion entsteht durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel oder Trinkwasser und zeichnet sich durch Krankheits Symptome wie Durchfall, Übelkeit, Erbrechen und Bauchkrämpfe aus. Obwohl es sich bei gesunden Personen um eine selbst-limitierende Infektion handelt, kann die einhergehende Dehydrierung ein lebensbedrohliches Risiko für Kinder, Ältere sowie für Personen mit geschwächtem Immunsystem darstellen. Ausserdem sind Infektionen mit S.Tm in Entwicklungsländern ein häufiges Problem, welches auf geringere hygienische Standards zurückzuführen ist. Zur Verbesserung der Behandlungsmassnahmen bedarf es eines molekularen Verständnisses des Infektionsprozesses.

S.Tm ist auf die Expression zweier Pathogenitätsinseln (SPI-1 und SPI-2) angewiesen, welche für Typ-III-Sekretionssysteme kodieren (TTSS-1 und TTSS-2) um Effektor-Proteine in die Wirtszelle zu translozieren. Die SPI-1 kodierten Effektoren bewirken durch die aufeinander abgestimmte Manipulation des Wirts-Zytoskeletts die Internalisierung in nicht-phagozytierende Zellen. Die SPI-2 Effektoren werden im intrazellulären Stadium induziert und fördern die Reifung und Aufrechterhaltung der *Salmonellen*-beinhaltenden Vakuole - eine intrazelluläre Nische, in welcher sich das Pathogen vermehren kann. Viele Wirtszellfaktoren, die zu einer Infektion mit S.Tm beitragen, sind bekannt, aber die Koordination des für die Infektion notwendigen, komplexen Netzwerks an Wirtszellfaktoren bleibt ungenau definiert. Aus diesem Grund haben wir uns zum Ziel gesetzt, die Wirtszellfaktoren, welche für eine erfolgreiche S.Tm Infektion benötigt werden, durch Ausführung diverser RNAi Screens systematisch aufzudecken. Dabei war das InfectX Konsortium, welches aus Kollaborateuren der Infektionsbiologie und Bioinformatik besteht, eine produktive Plattform um RNAi Screens durchzuführen, zu optimieren und zu analysieren.

Zunächst musste eine robuste und stabile Screening-Prozedur für die S.Tm Infektion etabliert werden, die den allgemeinen Screening-Standards von InfectX angepasst war und zudem eine automatisierte, Hochdurchsatz-Durchführung von RNAi-Screens ermöglicht. Die Durchführung diverser RNAi Screens wies eine hohe technische Reproduzierbarkeit der Screen-Replikat auf. Allerdings zeigte sich im Vergleich diverser Kinom-Screens, welche mit verschiedenen siRNAs die gleichen Wirtszellproteine herunterregulieren, eine geringe Korrelation sowie eine geringe Überschneidung an identifizierten Wirtszellfaktoren. Dies führte uns eine Prävalenz von "Off-Target-Effekten" in RNAi-Screens auf, welche höchstwahrscheinlich durch siRNAs entstehen, die unspezifisch über ihre 7mer "Seed" Sequenz fungieren und somit der Aktivität von mikroRNAs ähneln. Aus diesem Grund haben wir die Beteiligung von mikroRNAs während der S.Tm Infektion analysiert. Dies bestätigte signifikante Veränderungen der S.Tm Infektion als Reaktion auf überexprimierte oder herunterregulierte mikroRNAs, welche in zukünftigen Studien detailliert analysiert werden.

Um die geringe Überlappung von Wirtszellfaktoren, die in den verschiedenen Kinom-Screens identifiziert wurden, zu verbessern, wurde das "Parallel Mixed Model" von Kollaborateuren des InfectX entwickelt. Diese Methode zielt darauf ab relevante Kinasen durch die statistische Aussagekraft simultaner Analysen von siRNA Screens, welche mit verschiedenen Pathogenen

durchgeführt wurden, zu extrahieren. Dabei konnten sowohl für die *S.Tm* Infektion bekannte Wirtszellfaktoren wie mTOR aufgedeckt werden, sowie auch neue Faktoren mit unbekannter Funktion, deren mechanistische Grundlage in zukünftigen Studien adressiert wird.

Zudem wollten wir dem Ursprung der siRNA-vermittelten Off-Target Effekte auf den Grund gehen. Durch die Extraktion von siRNA Screen-Daten verschiedener Pathogene (*Brucella abortus*, Uukuniemi Virus, *S.Tm*) konnte die Anwesenheit Pathogen-spezifischer Seed-Sequenzen mithilfe einer von A. Franceschini, R. Meier und C. von Mering entwickelten bioinformatischen Strategie vorhergesagt werden. Diese Vorhersagen wurden in Folge-Experimenten bestätigt und es konnten Seeds identifiziert werden, welche die jeweiligen Infektionen entweder beeinträchtigten oder unterstützten. Die Verwendung massgeschneiderter siRNAs, welche einen bereits identifizierten Seed mit einer willkürlichen Folgesequenz kombinierten, konnte eindeutig aufdecken, dass Seeds den Ursprung Pathogen-spezifischer Off-Target Effekte in RNAi-Screens darstellen. Dies konnte gezeigt werden, indem die massgeschneiderten siRNAs den zuvor beobachteten Infektionsphänotyp auf eine spezifische Art und Weise reproduzierten. Insertionen von Einzelbasen-Mutationen innerhalb der Seed-Sequenz führten zu einer Aufhebung des Effekts. Diese Entdeckungen werden für die verbesserte Entwicklung von Algorithmen zur Seed-Korrektur von Relevanz sein. Ausserdem könnten sich Seeds, welche Infektionen verhindern, zu möglichen nützlichen Werkzeugen für den Kampf gegen Infektionen entwickeln.

Obwohl sich viele der Wirtszellfaktoren, die wir ursprünglich mit dem Genom-weiten Screen identifizieren konnten, als falsch-positive Kandidaten bestätigen liessen, war es uns mögliche neue Aspekte der *Salmonellen*-vermittelten Wirtszellinfektion durch das phänotypische Zusammenführen von Hits zu entdecken. Dies verdeutlichte, dass der Verlust mehrerer Autophagie-Faktoren zu einer beeinträchtigten SCV Reifung sowie zu einer verminderten SPI-2 Expression führt. Diese neue Eigenschaft von Autophagie für die *S.Tm* Infektion konnte bestätigt werden, indem Autophagie-gerichtete Inhibitoren/Aktivatoren sowie embryonale Mausfibroblasten mit spezifischer Deletion von ATG5 als essentielle Komponente der Autophagosomen Reifung verwendet wurden. Die unterstützende Funktion von Autophagie während der *S.Tm* Infektion stand in Abhängigkeit zu einem funktionalen TTSS-1, wurde jedoch nicht durch den Verlust von TTSS-2 beeinträchtigt. Zudem wurde der Phänotyp gleichzeitig mit dem Einschalten der SPI-2 abhängigen Reporterexpression detektiert. Dies deutet auf einen Mechanismus hin, der dem der gut beschriebenen Hyperproliferation von *S.Tm* im Zytosol Autophagie-defizienter Zellen vorangeht. Schlussendlich konnten wir eine verminderte Rekrutierung von Rab7 an die SCV in Autophagie-defizienten Zellen beobachten. Dadurch lässt sich eine Verbindung zwischen Autophagie und Endozytose vermuten, um die erfolgreiche SCV Reifung während der *S.Tm* Infektion zu fördern. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Genom-weite Screens neue molekulare Eigenschaften der Wirtszellinfektion von *S.Tm* aufdecken können.