

# **Bistable regulation of *ttss-1* genes in *Salmonella* Typhimurium**

A dissertation submitted to

ETH Zurich

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Alexander Sturm

Diplom Biologe, Martin-Luther University Halle-Wittenberg, Germany

Born May 1<sup>st</sup> 1982

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt (examiner)

Prof. Dr. Michael Hensel (co-examiner)

Prof. Dr. Matthias Heinemann (co-examiner)

Zurich 2011

## Thesis summary

To date, *Salmonella* Typhimurium (*S. Tm*) represents one of the most prevalent human pathogens with implications in diarrheal diseases throughout the world. Consequences of *Salmonella* infections range from diarrhea to lethal systemic infections. Naturally, the human gut represents a reservoir for a number of commensal bacteria that contribute to the human diet and confer colonization resistance against invading bacteria. It is thought that *Salmonella Tm* can subvert the host's inflammatory response to circumvent colonization resistance and facilitate colonization of the gut.

*Salmonella Tm* virulence relies on a large set of different virulence factors. However, the gastrointestinal inflammation is primarily mediated by a Type Three Secretion System (TTSS-1) encoded on a 40 kb AT-rich region of the chromosome, termed as pathogenicity island 1 (SPI-1). Remarkably, the virulence factors of SPI-1 are only expressed in a sub-fraction of the *S. Tm* populations. This phenomenon is observed in laboratory cultures as well as in the gut of the infected host. Bistable gene expression - the stable co-existence of two phenotypes of isogenic populations in a given environment - bases on noise in gene expression and the possibility of its amplification under certain prerequisites. Without doubt, stochastic gene expression plays a key role in the fate of individual cells and the phenotypic diversity in clonal populations will contribute to the overall fitness of the genotype. Besides virulence in *S. Tm*, bistability is observed in other cell differentiation processes, e.g. sporulation of *Bacillus subtilis* or persistence among several bacterial species. The latter differentiation processes usually represent a backup mechanism of the population to deal with unpredictable and dramatic changes in the environment.

So far it has remained unclear why *S. Tm* might benefit from bistable virulence factor gene expression. Normally, virulence factors are expected to enhance the fitness of a population in terms of an evolutionary advantageous strategy. Nevertheless, those considerations are made for the average of the population, but might disregard costs for the individual bacterium. Thus, in the first part of the presented thesis I focused on the question, whether virulence gene expression might entail fitness costs for the individual bacterium. We hypothesized that this could explain the necessity of bistable *ttss-1* expression. We used a number of single cell based fluorescence reporter strains in vitro experiments to monitor the bistable expression of *ttss-1* operons like e.g. *sicAsipBCDA* that encode for the translocon of the TTSS-1 and effector proteins. Our experiments revealed a significantly reduced growth rate accompanying *ttss-1* expression. Mutations in the regulatory cascade resulted either in *S. Tm* populations that were exclusively composed of individuals entirely lacking *ttss-1* expression or in those, which displayed virtually 100 % TTSS-1<sup>+</sup> individuals. Mutations leading to an increased fraction of the *ttss-1* expressing bacteria always correlated with compromised growth. Nevertheless, in LB batch cultures we could observe an increase of the TTSS-1<sup>+</sup> subpopulation entering the late logarithmic phase. We developed a mathematical model that explained the increasing

fraction of TTSS-1<sup>+</sup> bacteria in the late logarithmic growth phase of a given *S. Tm* culture by an increased rate of *ttss-1* induction and the concurrent decrease in growth rate of TTSS-1<sup>+</sup> bacteria.

The regulatory cascade that controls the expression of *ttss-1* genes is maintained by a set of hierarchically arranged SPI-1 encoded transcriptional activators, HilC, HilD and HilA. Besides this, the proper regulation of SPI-1 is maintained by a remarkable number of additional regulators affecting *ttss-1* expression in response to determinants ranging from metabolism and stress signals to motility. Thus, in a second approach we analyzed the *ttss-1* master regulator HilA. Despite the complexity of the regulatory network, all signals and information seemed to converge on HilA. In contrast to other SPI-1 specific transcription factors as HilD or HilC, HilA exhibits homology to response regulators of two component systems the major signal transduction pathways in bacterial cells. In a pull-down assay we could identify the chemotaxis sensory kinase CheA as an interaction partner of HilA. As response regulators get usually phosphorylated by their cognate sensory kinase, we also analyzed phosphorylation of HilA, but could not find evidence for this kind of posttranslational modification. Nevertheless,  $\Delta cheA$  mutants displayed enhanced levels of the HilA target operon *sicAsipBCDA*. Yet, HilA levels themselves remained unaffected by CheA. This established a novel level of co-regulating flagellar function and *ttss-1* expression.

Furthermore, we found evidence for posttranslational modifications of HilA. Besides phosphorylation, acetylation of proteins plays a major role in the transmission of signals throughout the cell. Mass spectrometric analyses revealed that two lysine residues K<sub>231</sub> and K<sub>324</sub> of HilA are subject to N<sub>ε</sub>-acetylation by the acetylCoA-synthetase Acs. It is mainly involved in the central metabolism making acetate accessible for the citric acid cycle and thus for energy release. The modification of HilA also changed its activity and led to decreased transcription of *sicAsipBCDA*. Again, HilA levels remained unaffected. Both, the interaction with CheA and the posttranslational N<sub>ε</sub>-acetylation changed the ratio of TTSS-1<sup>+</sup> to TTSS-1<sup>-</sup> fractions within the population and hence represent mechanisms to fine-tune bistability.

Finally, we observed that *S. Tm* responds to temperature changes. We found that temperatures below 30 °C as well as above 40 °C remarkably reduced the expression of SPI-1 virulence genes. Again, we conducted a series of single cell reporter assays monitoring the expression of the *sicAsipBCDA* operon. We observed that the ratio of TTSS-1<sup>+</sup> to TTSS-1<sup>-</sup> bacteria varied in response to temperature. As 40 °C describes an environmental cue, which can also occur during infection (fever), we speculated that fever might represent a host response sensed by the pathogen to avoid excessive disease and compromised host survival, which could limit pathogen transmission.

In conclusion, this work provides new insights into the regulation of *ttss-1* genes of *S. Tm*. It elucidated that *ttss-1* expression has intriguing consequences for the individual bacterial cell and

considers the growth cost by calculations of *ttss-1* initiation rates by a new mathematical model. Furthermore, it manifests the central role of HilA in the regulatory cascade in respect to integration of chemotaxis signals (CheA) and to information about the metabolic state of the bacterium by acetylation (Acs) and how those mechanisms can affect the ratio between TTSS-1 subpopulations. This represents a key advance in our understanding of the infection process.

## Zusammenfassung

Bis heute stellt *Salmonella* Typhimurium (*S. Tm*) eines der weltweit am häufigsten vorkommenden menschlichen Pathogene dar. Folgen einer Salmonelleninfektion reichen von Durchfall bis hin zum Teil tödlich verlaufender systemischer Infektionen. Der menschliche Darm wird naturgemäß von einer Reihe symbiotischer Bakterien besiedelt, die zum einen zur Verbesserung der Verdauung beitragen und zum anderen eine sogenannte Kolonisationsresistenz gegenüber normalerweise darmfremden, invasiven Bakterien vermitteln. Es wird vermutet, dass *S. Tm* die im Wirtsorganismus (z.B. Mensch) ausgelöste Entzündung benützt, um die von den kommensalen Bakterien vermittelte Kolonisationsresistenz zu umgehen.

Die Virulenz von *S. Tm* stützt sich auf eine große Anzahl verschiedener Faktoren. In erster Linie wird jedoch die Magen-Darm-Entzündung durch das Typ-III-Sekretionssystem (TTSS-1) hervorgerufen, das auf einer 40 kb AT-reichen Region des Chromosoms, *Salmonella* Pathogenitäts Insel 1 (SPI-1), kodiert wird. Bemerkenswerterweise sind die Virulenzfaktoren von SPI-1 nur in einem Teil des *S. Tm* Population exprimiert. Dieses Phänomen wird sowohl in Laborkulturen sowie im Darm des infizierten Wirts beobachtet. Bistabile Genexpression - die stabile Koexistenz zweier Phänotypen einer isogenen Population unter identischen Umweltbedingungen – basiert auf *noise* (stochastisch auftretende Unregelmäßigkeiten) in der Genexpression und der Möglichkeit diesen zu amplifizieren. Zweifelsohne spielt stochastische Genexpression eine wichtige Rolle im Schicksal einer einzelnen Zellen und der phänotypischen Vielfalt in einer klonalen Population, die wiederum zur Fitness dieses Genotyps beitragen. Neben Virulenz in *S. Tm* ist Bistabilität in anderen Zelldifferenzierungsprozessen zu beobachten, z.B. während der Sporulation von *Bacillus subtilis* oder der Koexistenz von persistenten und nicht persistenten Individuen innerhalb verschiedener Bakterienarten. Letztere Differenzierungsprozesse beschreiben Versicherungsmöglichkeiten mit unvorhersehbaren und dramatischen Veränderungen in der Umwelt umzugehen.

Bisher war es unklar, warum *S. Tm* von einer bistabilen Expression der Virulenzfaktoren profitieren könnte. Normalerweise sorgen Virulenzfaktoren dafür die Fitness einer Population im Sinne eines evolutionären Vorteils zu steigern. Diese Überlegungen treffen für den Durchschnitt der Population zu, ignorieren aber gegebenenfalls die Kosten für einzelne Bakterien. So konzentriere ich mich im ersten Teil der vorliegenden Arbeit auf die Frage, ob die Expression von Virulenzfaktoren Fitnesskosten für die einzelnen Bakterien zur Folge haben. Wir verfolgten die Hypothese, dass diese Kosten bistabile *ttss-1*-Expression notwendig macht. Hierzu haben wir eine Reihe auf Einzelzellebene basierender Fluoreszenzreporterstämme *in vitro* Experimenten konstruiert, um die bistabile Expression des *ttss-1*-Operons, wie z.B. *sicAsipBCDA*, das das TTSS-1-Translokon und Effektor-Proteine codiert, mikroskopisch zu untersuchen. Unsere Experimente zeigten eine deutlich verringerte

Wachstumsrate begleitend zur *ttss-I*-Expression. Mutationen in den regulatorischen Kaskade resultierten entweder in *S. Tm* Populationen mit fehlender *ttss-I*-Expression oder aber mit nahezu 100% TTSS-1<sup>+</sup> Individuen. Solche Mutationen, die zu einem erhöhten Anteil des *ttss-I* exprimierenden Bakterien führten, korrelierten immer mit eingeschränktem Wachstum. Daraus schlussfolgernd müssten TTSS-1<sup>+</sup> von TTSS-1<sup>-</sup> Individuen letztlich verdrängt werden. In LB Flüssigkulturen beobachteten wir jedoch eine Zunahme der TTSS-1<sup>+</sup> Subpopulation. Wir entwickelten ein mathematisches Modell, das den zunehmenden Anteil von TTSS-1<sup>+</sup> Bakterien in der spät-logarithmischen Wachstumsphase einer *S. Tm* Kultur mithilfe einer erhöhten *ttss-I*-Induktionrate und dem gleichzeitigen Rückgang der Wachstumsrate der TTSS-1<sup>+</sup> Subpopulation erklärt.

Die regulatorischen Kaskade, die die Expression der *ttss-I* Gene steuert, wird durch eine Reihe von hierarchisch angeordneter SPI-1 kodierter Transkriptionsaktivatoren, HilC, HilD und HilA, bestimmt. Zusätzlich wird SPI-1 durch eine bemerkenswerte Anzahl von zusätzlichen Regulatoren beeinflusst. Diese reichen von Stoffwechsel und Stresssignalen bis hin zu Faktoren der Motilität. So analysierten wir in einem zweiten Ansatz den TTSS-1 Master-Regulator HilA. Trotz der Komplexität des regulatorischen Netzwerkes, schienen alle Signale und Informationen bei HilA zu konvergieren. Im Gegensatz zu anderen SPI-1-spezifischen Transkriptionsfaktoren wie HilD oder HilC weist HilA Homologie zu *response regulators* von Zwei-Komponenten-Systeme auf, den wichtigsten Signaltransduktionswegen in Bakterienzellen. In einem Pull-Down-Assay konnten wir die *chemotaxis sensory kinase* CheA als Interaktionspartner von HilA identifizieren. Da in der Regel *response regulators* durch ihre spezifische *sensory kinase* phosphoryliert werden, haben wir auch die Phosphorylierung von HilA untersucht, konnten jedoch keine Hinweise für diese Art der posttranslationalen Modifikation feststellen. Dennoch scheinen  $\Delta cheA$  Mutanten die Expression des von HilA regulierten Operon *sicAsipBCDA* zu erhöhen. Dabei blieb die HilA Konzentration an sich von CheA unbeeinflusst. Mit diesen Daten konnten wir eine weitere Schnittstelle in der Co-regulation zwischen Flagellen und *ttss-I*-Expression aufdecken.

Darüber hinaus fanden wir Hinweise auf posttranslationale Modifikationen von HilA. Neben Phosphorylierung spielt Acetylierung von Proteinen eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Signalen in der Zelle. Massenspektrometrische Analysen ergaben, dass zwei Lysinreste K<sub>231</sub> und K<sub>324</sub> von HilA N<sub>ε</sub>-Acetylierung durch die AcetylCoA-Synthetase Acs unterliegen. Deren Funktion besteht vor allem im zentralen Stoffwechsel. Hier macht es Acetat für den Zitronensäure-Zyklus und damit für die Energiefreisetzung zugänglich. Die Modifizierung von HilA beeinflusste dessen Aktivität und führte zu einer verminderten Transkription des *sicAsipBCDA* Operons. Auch hier blieb die HilA Konzentration unberührt. In beiden Fällen, der Interaktion mit CheA und die posttranslationale N<sub>ε</sub>-

Acetylierung, änderte sich das Verhältnis von TTSS-1<sup>+</sup> zu TTSS-1<sup>-</sup> Fraktionen innerhalb der Population. Beide beschreiben somit Mechanismen, die Bistabilität beeinflussen können.

Schließlich beobachteten wir, dass *S. Tm* auf Temperaturänderungen reagiert. Wir fanden, dass bei Temperaturen unter 30 °C sowie über 40 °C die Expression von SPI-1 Virulenzgenen merklich reduziert war. Wieder haben wir eine Reihe von Einzelzellreporterassays benützt, um die *sicAsipBCDA* Expression zu dokumentieren. Wir konnten beobachten, dass das Verhältnis von TTSS-1<sup>+</sup> an TTSS-1<sup>-</sup> Bakterien in Abhängigkeit von der Temperatur variiert. Bei Temperaturen um 40 °C handelt es sich um Bedingungen, die auch während der Infektion (Fieber) auftreten. So vermuteten wir, dass Fieber eine Wirtsreaktion darstellt, die vom Erreger bemerkt und eine übertriebene, außer Kontrolle geratene Infektion, eine erhöhte Wirtsterblichkeit zu vermeiden, die die Übertragungsrate des Erregers verringern würde.

Zusammenfassend beschreibt diese Arbeit neue Erkenntnisse über die Regulation der *ttss-1* Gene von *S. Tm*. Sie beschreibt Kosten für das einzelne Bakterium, die mit der Expression der Virulenzgene einhergehen. Sie berücksichtigt die Wachstumskosten für die Population mit Hilfe eines neuen mathematischen Modells zur Berechnung der *ttss-1* Initiationsrate. Darüber hebt sie die zentrale Rolle von HilA innerhalb der regulatorischen Kaskade hervor, indem es Chemotaxis-Signale (CheA) sowie Informationen über den metabolischen Zustand der Zelle durch Acetylierung (ACS) inkorporiert und damit das Verhältnis zwischen TTSS-1 Subpopulationen beeinflusst. Dies stellt einen wichtigen Fortschritt in unserem Verständnis des Infektionsprozesses dar.