

Lebendzellmikroskopie

Translokation bakterieller Effektorproteine – live und in Farbe

VERA GÖSER, MICHAEL HENSEL
 ABTEILUNG MIKROBIOLOGIE, CELLNANOS, UNIVERSITÄT OSNABRÜCK

Intracellular pathogens thrive by invading host cells, thereby creating protected replicative niches. The manipulation of host cells is accomplished by means of translocated bacterial effector proteins. The ability to track effector proteins during an infection is essential to understand host-pathogen interaction. Here, we describe a novel method to target bacterial effector proteins using *Salmonella enterica* as a model organism and deploying self-labeling enzyme tags.

DOI: 10.1007/s12268-019-1305-6
 © Springer-Verlag 2019

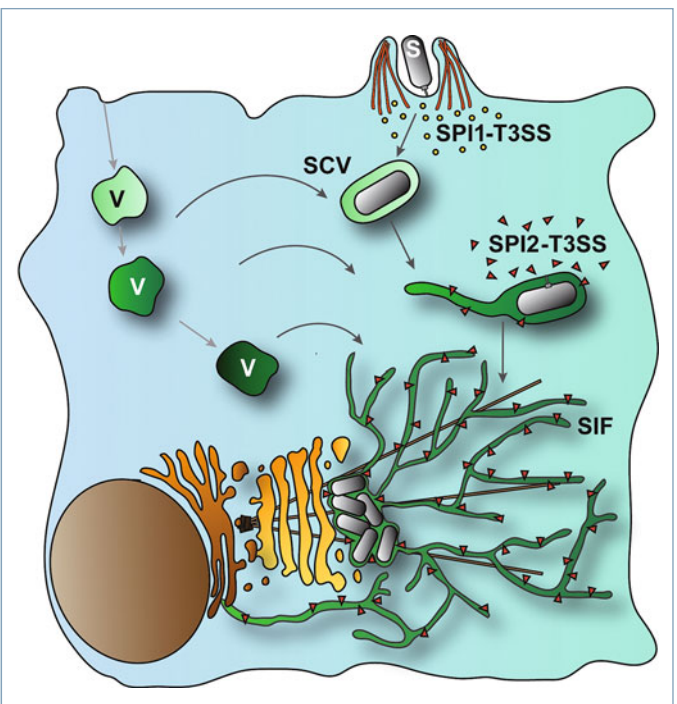
■ Zahlreiche Infektionserreger sind in der Lage, in eukaryotische Zellen einzudringen und sich dort häuslich einzurichten. Für den Aufbau einer intrazellulären Nische müssen die Erreger zunächst die wirtseigene Immunantwort umgehen und dann einen Weg finden, das zelluläre Nahrungsangebot auszunutzen. Um die Manipulation der Wirtszelle zu erreichen, besitzen intrazelluläre Bakterien ein Arsenal an Virulenzfaktoren. Dazu gehören auch die Effektorproteine [1], die mittels spezialisierter Sekretionssysteme von Bakterien in eukaryotische Wirtszellen übertragen werden. Ein bei Gram-negativen Bakterien weitverbreitetes Sekretionssystem stellt das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) dar. Dieser Proteinkomplex kann über eine nadelartige Struktur Effektorproteine (EP) direkt in eine Zielzelle injizieren oder translozieren. Hier interagieren EP mit Wirtsproteinen und führen zu Umprogrammierungen der Zelle, die das Überleben und die Vermehrung der Erreger erlauben. Wie genau die bakteriellen Effektorproteine die zellulären Mechanismen manipulieren und welche Pathogen-Wirt-Interaktionen für eine Infektion notwendig sind, bleibt in vielen Bereichen noch ungeklärt. Um diese Prozesse aufzuklären, sind Methoden nötig, die eine Verfolgung von Effektorproteinen in lebenden, infizierten Wirtszellen erlauben [2].

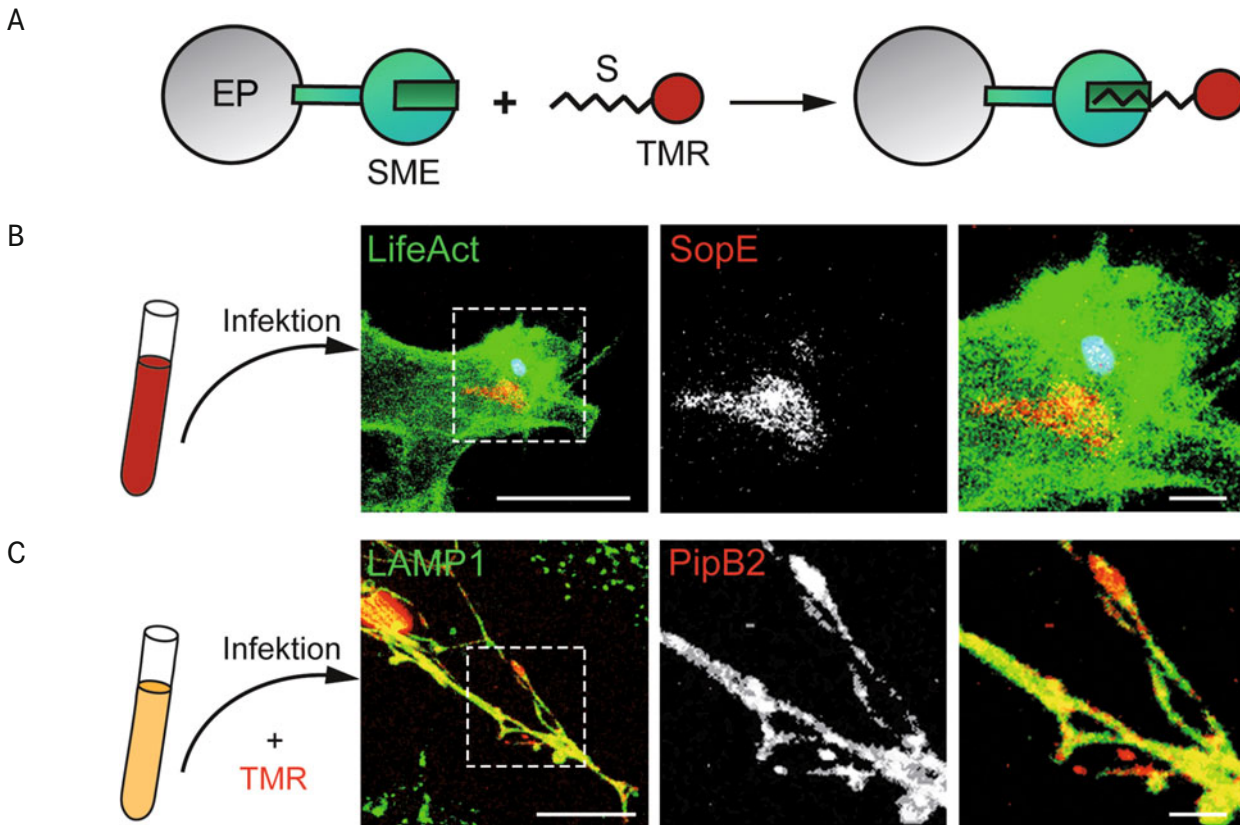
Salmonellen: „Meistermanipulatoren“ der Wirtszelle

Das Enterobakterium *Salmonella enterica* ist ein besonders trickreicher intrazellulärer Erreger, aber auch genetisch leicht zu manipulieren und somit ein idealer Modellorganismus zur Untersuchung von Erreger-Wirt-Interaktionen. Der Erreger löst abhängig vom

Serotyp entweder eine selbstlimitierende Gastroenteritis (z. B. *S. Typhimurium*) oder eine systemische Erkrankung aus, den Typhus (durch *S. Typhi*). Der Erfolg von Salmonellen ist von gleich zwei T3SS abhängig. Diese Sekretionssysteme sind von Genen auf *Salmonella*-Pathogenitätsinseln (SPI) codiert und übertragen jeweils ein spezifisches Set an Effektorproteinen. Um in eine nicht-phagozytische Zelle einzudringen, wird zunächst das SPI1-T3SS aktiv. Hier führen fünf der translozierten Effektorproteine des SPI1-T3SS (*SopE*, *SopE2*, *SipA*, *SopB* und *SptP*) zu einer Umstrukturierung des Aktincytoskeletts der Wirtszelle und erzwingen somit die Internalisierung des Bakteriums [3]. In der Wirtszelle befinden sich die Salmonellen dann in einer aus wirtseigenen Membranen bestehenden Vakuole, die *Salmonella-containing vacuole* (SCV). Für das weitere intrazelluläre Überleben des Erregers sind Effektorproteine verantwortlich, die über das SPI2-T3SS übertragen werden. Die für die Biogenese der SCV wesentlichen Effektorproteine sind *SseF*, *SseG*, *SifA*, *SseJ* und *SopD2* [4]. Diese werden

► **Abb. 1:** Infektion einer Wirtszelle mit *Salmonella enterica*. Die Aufnahme in die Zelle wird durch Umlagerung des F-Aktin-Cytoskeletts durch Interaktion mit Effektorproteinen des SPI1-T3SS ausgelöst. Das intrazelluläre Überleben ist abhängig von Effektorproteinen des SPI2-T3SS und die ausgelöste Vesikelrekrutierung sowie SIF (*Salmonella-induced filaments*)-Bildung. S: *Salmonella*; SCV: *Salmonella-containing vacuole*; SPI1/2: *Salmonella*-Pathogenitätsinseln; T3SS: Typ-III-Sekretionssystem; V: Vesikel.





▲ **Abb. 2:** **A,** Effektorproteine (EP) können genetisch mit selbstmarkierenden Enzymen (SME) fusioniert werden. Nach Zugabe eines spezifischen, mit einem fluoreszenten Farbstoff (Tetramethylrhodamin, TMR) gekoppelten Substrats (S) können Effektorproteine markiert werden. **B,** SPI1-T3SS-Effektorproteine können in Kultur vormarkiert werden. Das EP SopE (rot) kann während der Invasion von *Salmonella* in HeLa-Zellen, die F-Aktin-LifeAct-GFP (weiß) exprimieren, sichtbar gemacht werden. **C,** SPI2-T3SS-Effektorproteine werden zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion markiert. Das EP PipB2 (rot) kann während der Infektion einer LAMP1-GFP exprimierenden Wirtszelle auf SIF (*Salmonella-induced filaments*)-Membranen (weiß) sichtbar gemacht werden. SPI1/2: *Salmonella*-Pathogenitätsinseln; T3SS: Typ-III-Sekretionssystem. Maßstabsbalken: 10 µm (Übersicht), 2 µm (Detail).

aus der SCV in das Cytosol der Wirtszelle sekretiert und lokalisieren dann auf endosomalen Membranen der Wirtszelle. Hier lösen die Effektorproteine des SPI2-T3SS über die Interaktion mit Wirtsproteinen eine Umleitung des Vesikeltransports der Wirtszelle aus. Die spezifische Rekrutierung und Fusion von Vesikeln mit der SCV führt zur Ausbildung von mit der SCV verbundenen Membranstrukturen (**Abb. 1**). Diese tubulären Membranstrukturen werden als *Salmonella-induced filaments* (SIF) bezeichnet und gewährleisten das bakterielle Überleben durch die Verdünnung von antimikrobiellen Substanzen und den Zugang zu wirtseigenen Nährstoffen [5, 6].

Selbstmarkierende Enzym-Tags

Um die Translokation und Wirkungsweise von Effektorproteinen weiter aufzuklären, sind Methoden nötig, die das zeitaufgelöste Verfolgen der Proteine in infizierten, lebenden Wirtszellen zulassen. Eine Erfolg versprechende Methode stellt hier die Fluoreszenz-Lebendzellmikroskopie dar, die eine langfristige Verfolgung einzelner Zellen, Organellen bis hin zu Einzelmolekülen zulässt. Zu

diesem Zweck müssen Effektorproteine zunächst fluoreszenzmarkiert werden. Dieses Verfahren stellt sich als problematisch dar, da standardmäßig genutzte fluoreszente Proteine wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) nicht für die Markierung geeignet sind. Die stabile Tertiärstruktur der Fluorophore führt bei einer Fusion mit Effektorproteinen zu einer Blockierung des T3SS und verhindert somit die Translokation. Eine Lösung dieses Problems stellen selbstmarkierende Enzyme (SME) als Marker oder Tag dar. SME sind in der Lage, ein spezifisches Substrat kovalent zu binden. Wenn die Enzymsubstrate mit einem fluoreszenten Farbstoff kombiniert werden, kann eine Fluoreszenzmarkierung über die SME eingebracht werden (**Abb. 2A**). Zurzeit werden vor allem drei SME eingesetzt: HaloTag, SNAP-Tag und CLIP-Tag [7, 8, 9].

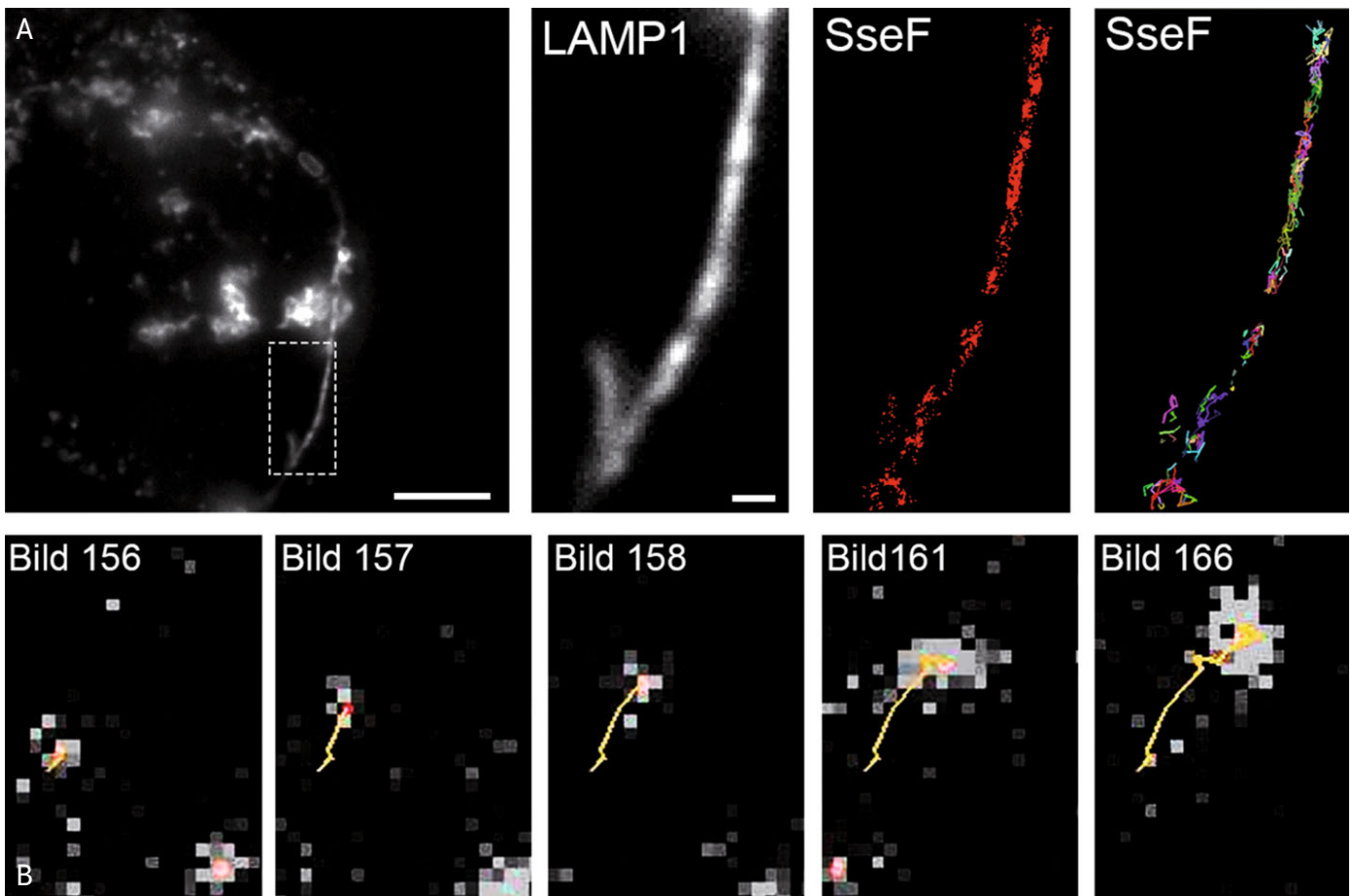
Visualisierung von Effektorproteinen in infizierten Zellen

Die hier beschriebene Methode erlaubt nun einen Nachweis von genetisch mit SME fusionierten Effektorproteinen unter Verwendung eines zellpermeablen Substrats, das mit dem

Fluorochrom Tetramethylrhodamin (TMR) gekoppelt ist. Hierbei erwiesen sich verschiedene SME als unterschiedlich kompatibel für die Fusion und anschließende Sekretion über das T3SS. Während SNAP-Tag sich als gut geeignet für die Fusion mit Effektorproteinen des SPI1-T3SS erwies, war HaloTag für die Fusion mit Effektorproteinen des SPI2-T3SS geeignet. Effektorproteine des SPI1-T3SS können dabei noch in der bakteriellen Zelle vor der Sekretion angefärbt und ihre Übertragung bei der Invasion von Salmonellen analysiert werden. Zur Visualisierung des Aktincytoskeletts oder des Endomembransystems der Wirtszelle können Wirtszellen verwendet werden, bei denen F-Aktin mit LifeAct-GFP markiert wurde oder die das endosomale Protein LAMP1, fusioniert mit GFP, exprimierten. In **Abbildung 2B** ist das SPI1-T3SS-Effektorprotein SopE während des Invasionsprozesses sichtbar gemacht. Da Effektorproteine des SPI2-T3SS erst zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion in die Wirtszelle transloziert werden, muss hier die gesamte infizierte Zelle mit dem fluoreszenten Substrat gefärbt und überschüssiges Substrat mit Waschschritten entfernt werden.

Hier steht eine Anzeige.





▲ **Abb. 3:** Einzelmolekülaufnahmen des SPI2-T3SS-Effektorproteins SseF. **A,** Die infizierte HeLa-Zelle exprimiert das wirtseigene spät-endosomale/lysosomale Protein LAMP1, gekoppelt an GFP, so werden Vesikel und SIF (*Salmonella-induced filaments*)-Membranen sichtbar (weiß). SseF-Einzelmoleküle werden zunächst auf SIF-Membranen lokalisiert (rot) und dann über einen Zeitraum von 200 sequenziellen Aufnahmen verfolgt (**B**). Anschließend werden die Trajektorien einzelner Moleküle berechnet (verschiedene Farben). Maßstabsbalken: 10 µm (Übersicht), 1 µm (Detail).

Abbildung 2C zeigt das SPI2-T3SS-Effektorprotein PipB2 auf den tubulären SIF-Membranen [10].

Einzelmolekülanalysen von Effektorproteinen

Der TMR-Farbstoff ist nicht nur für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet, sondern auch für hochaufgelöste Einzelmolekülmikroskopie. Im fixierten Zustand kann hier über die wiederholte Lokalisation von zum Blinken angeregten Fluorochromen eine Auflösung unterhalb der optischen Brechungsgrenze erzielt werden. Im Falle von Effektorproteinen des SPI2-T3SS kann nun eine verlässliche Darstellung der Konzentrationsverteilung der Proteine auf SIF-Membranen erzielt werden. So wird ersichtlich, dass die durch herkömmliche Fluoreszenzmikroskopie beobachtete homogene Verteilung von Effektorproteinen nicht zutrifft, sondern dass durch Anwendung von *super-resolution microscopy* (SRM) ein größeres Konzentrationspektrum der Verteilung beobachtet werden kann [10].

Bedient man sich einer Mikroskopiemethode, die einzelne Moleküle in lebenden Zellen verfolgt [11], so ist es möglich, Effektorproteine des SPI2-T3SS über die Länge eines SIF zu verfolgen. **Abbildung 3** zeigt beispielhaft das Effektorprotein SseF. Nach der Lokalisation von Einzelmolekülen können diese über eine gewisse Zeit aufgenommen und daraus resultierende Trajektorien berechnet werden. So können Dynamiken von Effektorproteinen dargestellt werden. Nach der Analyse von großen Datensets an gesammelten Bewegungen von Effektorproteinen können zudem Diffusionskonstanten einzelner Proteine ermittelt werden. Dadurch wird ein Vergleich der Mobilität von Effektorproteinen möglich.

Durch die Nutzung von SME und deren Markierung durch fluoreszente, zellpermeable Substrate steht der Infektionsbiologie eine neue Mikroskopietechnik zur Verfügung, die eine Verfolgung von Effektorproteinen in infizierten und lebenden Wirtszellen zulässt. Die Methode konnte schon erfolgreich für Effektorproteine von *Yersinia enterocolitica* einge-

setzt werden und sollte kompatibel mit der Visualisierung von Effektorproteinen der Sekretionssysteme verschiedener anderer Erreger sein. Weitere Anwendung wird die hier beschriebene Methode durch die simultane Verwendung verschiedener SME finden (*dual color*). So kann während einer Infektion gleichzeitig ein bakterielles Effektorprotein sowie Wirtsprotein markiert und verfolgt werden, um so z. B. Interaktionspartner zu identifizieren. Die fortlaufende Entwicklung von innovativen SME-Substraten sollte weitere Optimierungen der Methode ermöglichen. Durch die Verwendung neuer HaloTag-Substrate, die sich durch eine starke Fluoreszenzzunahme nach SME-Bindung auszeichnen, könnten zukünftig Experimente ohne Waschschritte möglich werden [12].

Mit der Analyse von Effektorproteinen in lebenden Zellen auf der Basis von Einzelmolekülen ist nun ein Schritt gemacht, um die Verfolgung von Effektorproteinen während einer Infektion zu gewährleisten und die

Dynamik der Wirt-Pathogen-Interaktion aufzuklären [10]. ■

Literatur

- [1] Cornejo E, Schlaermann P, Mukherjee S (2017) How to rewire the host cell: a home improvement guide for intracellular bacteria. *J Cell Biol* 216:3931–3948
- [2] Yu M, Lai EM (2017) Warfare between host immunity and bacterial weapons. *Cell Host Microbe* 21:3–4
- [3] Cain RJ, Hayward RD, Koronakis V (2008) Deciphering interplay between *Salmonella* invasion effectors. *PLoS Pathog* 4:e1000037
- [4] Jennings E, Thurston TLM, Holden DW (2017) *Salmonella* SPI-2 type III secretion system effectors: molecular mechanisms and physiological consequences. *Cell Host Microbe* 22:217–223
- [5] Liss V, Hensel M (2015) Take the tube: remodelling of the endosomal system by intracellular *Salmonella enterica*. *Cell Microbiol* 17:639–647
- [6] Liss V, Swart AL, Kehl A et al. (2017) *Salmonella enterica* remodels the host cell endosomal system for efficient intravacuolar nutrition. *Cell Host Microbe* 21:390–402
- [7] Los GV, Wood K (2007) The HaloTag: a novel technology for cell imaging and protein analysis. *Methods Mol Biol* 356:195–208
- [8] Hinner MJ, Johnsson K (2010) How to obtain labeled proteins and what to do with them. *Curr Opin Biotech* 21:766–776
- [9] Gautier A, Juillerat A, Heinis C et al. (2008) An engineered protein tag for multi-protein labeling in living cells. *Chem Biol* 15:128–136
- [10] Göser V, Kommnick C, Liss V et al. (2019) Self-labeling enzyme tags for analyses of translocation of type III secretion system effector proteins. *mBio* 10:e00769-19
- [11] Appelhans T, Beinlich FRM, Richter CP et al. (2018) Multicolor localization microscopy of single membrane proteins in organelles of live mammalian cells. *J Vis Exp* 136:e57690
- [12] Liu Y, Miao K, Dunham NP et al. (2017) The cation- π interaction enables a HaloTag fluorogenic probe for fast no-wash live cell imaging and gel-free protein quantification. *Biochem* 56:1585–1595

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Michael Hensel
Abteilung Mikrobiologie
CellNanOs – Center for Cellular
Nanoanalytics Osnabrück
Fachbereich Biologie/Chemie
Universität Osnabrück
Barbarastraße 11
D-49076 Osnabrück
Tel.: 0541-969-3940
michael.hensel@
biologie.uni-osnabrueck.de

AUTOREN



Vera Göser

2008–2015 Biologie- (B. Sc.) und Mikrobiologiestudium (M. Sc.) an der Universität Bonn. 2015–2019 Promotion an der Universität Osnabrück in der Abteilung Mikrobiologie bei Prof. Dr. M. Hensel.



Michael Hensel

Jahrgang 1962. 1982–1988 Biologiestudium an der Universität Osnabrück, dort 1989–1993 Promotion in Mikrobiologie. 1993–1996 Postdoc bei Prof. Dr. D. Holden, Imperial College London, UK. 1996–2000 Gruppenleiter bei Prof. Dr. J. Heesemann am Max-von-Pettenkofer-Institut, LMU München. 2000–2009 C3/W2-Professur an der Universität Erlangen-Nürnberg. Seit 2009 W3-Professur und Leitung der Abt. Mikrobiologie, Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Osnabrück.