

Respuesta celular inmune contra *Shigella flexneri*

Damián Lobato Márquez



Department of Infection Biology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, Reino Unido.



De izquierda a derecha: Vincezo Torraca, Ana Teresa López Jiménez, Hoan Ngo, Serge Mostowy, Stevens Robertin, Magdalena Bielecka, Margarida Castro Gomes, Damián Lobato Márquez

Un grupo de bacterias patógenas que incluye *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes* o *Rickettsia* spp., replican en el citosol de la célula hospedadora infectada donde polimerizan la actina celular y forman “colas de actina”, que propulsan al patógeno permitiendo invadir las células adyacentes (Goldberg, 2001). Para contrarrestar la infección, el huésped dispone no sólo de las respuestas inmune innata y adaptativa mediadas por células especializadas, sino también de respuestas más inmediatas a nivel de la célula hospedadora. En el caso de la infección por *Shigella flexneri*, las células epiteliales del intestino poseen tres mecanismos principales de respuesta celular inmune: autofagia (Ogawa *et al.*, 2005), GBPs (del inglés *guanylate binding proteins*) (Li *et al.*, 2017) y la respuesta celular mediada por septinas (Mostowy *et al.*, 2010).

La autofagia es un sistema de reciclado celular (conservado evolutivamente desde levaduras a mamíferos) que juega un papel crucial en la eliminación de orgánulos celulares dañados, y en la respuesta contra la infección por patógenos bacterianos como *S. flexneri* (Gatica *et al.*, 2018). En el citoplasma de la célula hospedadora, *S. flexneri* es marcada mediante la unión covalente de ubiquitina, que es reconocida por los receptores de autofagia (Mostowy *et al.*, 2011). El sistema de autofagia engloba entonces a *S. flexneri* en vesículas de doble membrana, denominadas autofagosomas, las cuales se fusionan con lisosomas para la destrucción del patógeno (Ogawa *et al.*, 2005).

Las GBPs bloquean la polimerización de actina durante la infección por *S. flexneri*. La motilidad de *S. flexneri* depende de una

proteína transmembrana (denominada IcsA), situada en la membrana externa, que recluta los factores celulares responsables de la polimerización de actina (Egile *et al.*, 1999). IcsA se localiza en uno de los polos bacterianos, y esta localización está facilitada por el lipopolisacárido (Robbins *et al.*, 2001). Las GBPs actúan como surfactante sobre el lipopolisacárido, alterando su estructura y provocando la deslocalización de IcsA (Kutsch *et al.*, 2020). Como resultado, *S. flexneri* pierde su capacidad de polimerizar eficientemente colas de actina, pudiendo así la célula hospedadora restringir la difusión del patógeno.

Las septinas conforman el citoesqueleto celular junto a actina, filamentos intermedios y microtúbulos (Mostowy & Cossart, 2012). En humanos existen 13 genes que codifican

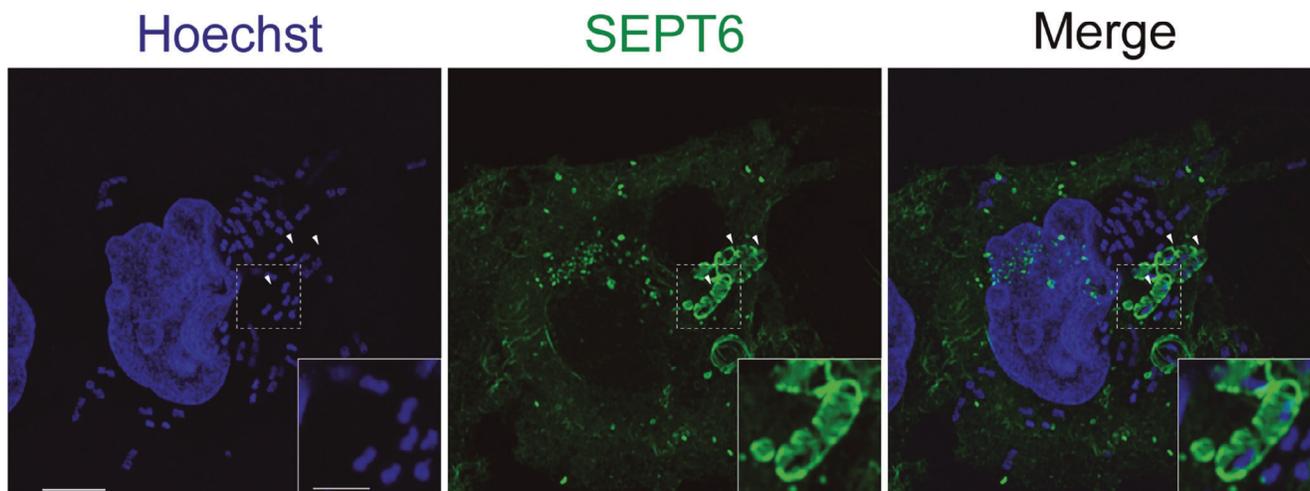


Figura 1. *Shigella* es atrapada en cajas de septina en el citosol de las células epiteliales. Imagen confocal (Airyscan) mostrando una célula HeLa infectada con *S. flexneri* (marcada con Hoechst). Puntas de flecha, bacterias atrapadas en cajas de septina. Escala, 5 μm (magnificación, 2 μm).

septinas, cuyos productos se ensamblan en hetero-oligómeros formando filamentos. Las septinas reconocen la curvatura de membrana a nivel micrométrico (Bridges *et al.*, 2016; Lobato-Márquez & Mostowy, 2016), y juegan un papel fundamental en la citoquinesis celular y en la respuesta contra patógenos bacterianos como *S. flexneri*, *Mycobacterium marinum* o *Pseudomonas aeruginosa* (Mostowy & Cossart, 2012; Mostowy *et al.*, 2010; Krokowski *et al.*, 2018a). Durante la infección de células epiteliales por *S. flexneri*, las septinas atrapan a las bacterias que se encuentran polimerizando actina en lo que se han denominado “cajas de septina” (Mostowy *et al.*, 2010). Las cajas de septina tienen un doble papel antimicrobiano: (1) bloquean la polimerización de actina, impidiendo así que la bacteria infecte las células adyacentes (Figura 1); y (2) las bacterias atrapadas en estas estructuras son marcadas para degradación por autofagia (Sirianni *et al.*, 2016; Krokowski *et al.*, 2018b). Por ello, estas estructuras pueden considerarse como “jaulas antimicrobianas”. Para entender como las cajas septinas se fusionan con los autofagosomas / lisosomas en el citosol de la célula infectada, estamos investigando este proceso mediante crio-tomografía de rayos X de baja energía. Este estudio pionero lo llevamos a cabo en colaboración con José Javier Conesa (CNB-CSIC, Madrid) y el sincrotrón ALBA (Barcelona).

Recientemente hemos descubierto que la curvatura de membrana y el lípido cardiolipina, situado en el polo de *S. flexneri*, son importantes para el reconocimiento por septinas (Krokowski *et al.*, 2018). Sin embargo, nuestros datos indican que estos no son los únicos factores que median la interacción septina-*Shigella*. Esta es una pregunta que, dada la complejidad del ambiente intracelular, ha sido imposible responder usando células en cultivo. La biología sintética permite estudiar de manera simplificada procesos biológicos que tienen lugar en ambientes bioquímicamente complejos. Los ensayos *in vitro* (*bottom-up*) han permitido comprender procesos tan importantes como la replicación del DNA o la polimerización de colas de actina por patógenos bacterianos (Kornberg, 1960; Welch *et al.*, 1997). Recientemente, hemos desarrollado un ensayo *in vitro* con el cual podemos reconstituir cajas de septina en el tubo de ensayo usando complejos de septina purificados. Con este ensayo hemos descubierto que la capacidad de las septinas para reconocer a *Shigella* depende del crecimiento bacteriano. En colaboración con el grupo del Prof. Martin Pilhofer (ETH, Zúrich) estamos combinando nuestro ensayo *in vitro* con crio-tomografía electrónica. Esta aproximación nos ha permitido visualizar, por primera vez y a escala nanométrica, septinas interaccionando con la superficie bacteriana. Datos preliminares indican que los filamentos de septina se

ensamblan a modo de “alambre de espino” sobre la superficie bacteriana.

Nuestro ensayo de reconstitución de cajas de septina *in vitro*, supone una plataforma ideal con la cual estamos estudiando qué factores celulares y bacterianos modulan el ensamblaje de las cajas de septina durante la infección por *Shigella*. En cuanto a la respuesta inmune mediada por septinas contra otras bacterias, *Listeria* no es atrapada en cajas de septina, y nada se sabe sobre *Rickettsia*. Usando nuestro ensayo *in vitro*, podemos investigar cómo *Listeria* escapa de este mecanismo inmune y si *Rickettsia* es o no reconocida por septinas. Entender como las células responden a la infección por este tipo de bacterias patógenas, puede ayudar a desarrollar nuevas terapias antimicrobianas.

AGRADECIMIENTOS

D.L.-M. ha sido financiado por el programa de investigación e innovación Marie Skłodowska-Curie de la Unión Europea (Horizonte 2020) bajo el código H2020-MSCA-IF-2016-752022, y el sincrotrón ALBA. El laboratorio de Serge Mostowy está financiado por el European Research Council Consolidator Grant (772853-ENTRAPMENT), Wellcome Trust Senior Research Fellowship (206444/Z/17/Z), y el Instituto Lister de Medicina Preventiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Bridges A.A., Jentsch M.S., Oakes P.W., Occhipinti P. & Gladfelter, A.S. (2016).** Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. *J. Cell Biol*, 213: 23–32.
- Egile C., Loisel T.P., Laurent V., Li R., Pantaloni D., Sansonetti P.J. & Carlier M. F. (1999)** Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol*, 146: 1319-1332.
- Gatica D., Lahiri V. & Klionsky D.J. (2018)** Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol*, 20: 233-242.
- Goldberg M. B. (2001).** Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiol Biol Rev: MMBR*, 65(4), 595–626.
- Kornberg A. (1960)** Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science*, 131: 1503–1508.
- Krokowski S., Lobato-Márquez D., Chastanet A., Matos-Pereira P., Angelis D., Larrouy-Maumus G., Henriques R., Spiliotis E.T., Carballido-López R. & Mostowy S. (2018a)** Septins recognize and entrap dividing bacterial cells for delivery to lysosomes. *Cell Host Microbe*, 24: 866–874.
- Krokowski S., Lobato-Márquez D., Mostowy S. (2018b)** Mitochondria promote septin assembly into cages that entrap *Shigella* for autophagy. *Autophagy*, 14 (5): 913-914. * equal contribution.
- Kutsch M., Sistemich L., Lesser C. F., Goldberg M.B., Herrmann C. & Coers, J. (2020)** Direct binding of polymeric GBP1 to LPS disrupts bacterial cell envelope functions. *EMBO J*, 39, e104926.
- Li, P. et al. (2017)** Ubiquitination and degradation of GBPs by a *Shigella* effector to suppress host defence. *Nature*, 551: 378-383.
- Lobato-Márquez D. & Mostowy S. (2016)** Septins recognize micron-scale membrane curvature. *J Cell Biol*, 213(1): 5–6.
- Mostowy S., Bonazzi M., Hamon M.A., Tham T.N., Mallet A., Lelek M., Gouin E., Demangel C., Brosch R., Zimmer C., Sartori A., Kinoshita M., Lecuit M. & Cossart P. (2010).** Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. *Cell Host Microbe*, 8: 433–444.
- Mostowy S., Sancho-Shimizu V., Hamon M.A., Si-meone R., Brosch R., Johansen T. & Cossart P. (2011)** p62 and NDP52 Proteins Target intracytosolic *Shigella* and *Listeria* to different autophagy pathways. *J Biol Chem*, 286(30): 26987–26995.
- Ogawa M., Yoshimori T., Suzuki T., Sagara H., Mizushima N. & Sasakawa C. (2005)** Escape of Intracellular *Shigella* from Autophagy. *Science*, 307: 727-731.
- Robbins J.R., Monack D., McCallum S.J., Vegas A., Pham E., Goldberg M.A. & Theriot J.A. (2001)** The making of a gradient: IcsA (VirG) polarity in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*, 41 (4): 861-872.
- Sirianni A., Krokowski S., Lobato-Márquez D., Buranyi S., Pfanzer J., Galea D., Willis A., Culley S., Henriques R., Larrouy-Maumus G., Hollinshead M., Sancho-Shimizu V., Way M. & Mostowy S. (2016)** Mitochondria mediate septin cage assembly to promote autophagy of *Shigella*. *EMBO Rep*, 17: 1-15.
- Welch M.D., Iwamatsu A. & Mitchison T.J. (1997)** Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 385: 265-269.