

# Cytosolic Gram-negative bacteria prevent apoptosis by inhibition of effector caspases through LPS

Saskia Günther

## I. Abstract

Cytosolic appearance and propagation of bacteria causes extensive cellular stress responses that under physiological conditions induce apoptosis. Not surprisingly, intracellular pathogens have evolved strategies to manipulate the apoptotic program as one of their central survival strategies by involving an array of virulence factors. Some of these strategies are particularly well characterized during the course of viral infection by identification of genome-encoded anti-apoptotic factors. However, our knowledge about how intracellular bacteria interfere with apoptosis is still fragmentary.

Infection with the enteroinvasive intracellular residing Gram-negative bacterium *Shigella flexneri* revealed that infected epithelial cells are markedly resistant to apoptosis induced by extrinsic or intrinsic pro-apoptotic stimuli. The absence of apoptosis was evoked by efficient inhibition of effector caspases-3 and -7. Inhibition of effector caspases was also observed upon appearance of other Gram-negative bacteria in the cytosol. In particular, we identified lipopolysaccharide (LPS), an essential outer membrane glycolipid of most Gram-negative bacteria, as a *bona fide* effector caspase inhibitor. Our *in vitro* studies revealed that LPS efficiently blocks effector caspase activity.

We show that LPS directly binds to effector caspase-3 and -7 in a micromolar range, as it was previously shown for inflammatory caspases (caspase-11 in mice and caspase-4/-5 in human). Binding of inflammatory caspases to LPS is mediated by the caspase activation and recruitment domain (CARD) of the caspase and the lipid A portion of LPS. Strikingly, LPS binding to effector caspases was independent of the lipid A of LPS and the prodomain of the effector caspase. Conversely, the O-antigen of LPS may bind effector caspases generically. Indeed, a *Shigella* strain that lacks the O-antigen of LPS was incapable of blocking apoptosis and its intracellular replication was efficiently abrogated. The findings obtained in this study show that cytosolic LPS effectively inhibits effector caspase activity by direct binding. This subsequently results in the inhibition of the apoptotic process and allows intracellular bacterial propagation and eventually safeguards bacterial replicative niches.

### II. Zusammenfassung

Die Penetration und Propagation von Bakterien im Cytosol führt zu zellulärem Stress und damit häufig zur Apoptose der Wirtszelle. Folglich ist es nicht erstaunlich, dass intrazelluläre Krankheitserreger Strategien entwickelt haben, um apoptotische Signalwege zu umgehen. Zu diesen Strategien gehören anti-apoptotische Virulenzfaktoren, die Apoptose effizient inhibieren und damit das Überleben des Erregers sicherstellen. Derzeit sind vor allem Studien veröffentlicht, die sich mit viralen anti-apoptotischen Faktoren beschäftigen, wohingegen über die Strategien von intrazellulären Bakterien wenig bekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gram-negative, enteroinvasive Bakterium *Shigella flexneri* als Infektionsmodell genutzt. Die Infektion mit *Shigella* führte zu einer deutlichen Reduktion in extrinsisch und intrinsisch eingeleiteter Apoptose in Epithelzellen. Die beobachtete Verminderung des apoptotischen Zelltods konnte auf eine Inhibierung der Effektor-Caspasen-3 und -7 zurückgeführt werden. Auch die Anwesenheit von anderen Gram-negativen Bakterien im Cytosol führte zu einer Inhibition von Effektor-Caspasen. Unsere Daten konnten zeigen, dass Lipopolysaccharide (LPS), welche essentielle Glycolipide auf der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien darstellen, verantwortlich für die Inhibierung der Effektor-Caspasen sind.

In kürzlich publizierten Artikeln wurde gezeigt, dass inflammatorische Caspasen - Caspase-11 in Maus und Caspase-4 und -5 im Menschen - als cytosolische Rezeptoren für LPS agieren können. Die vorliegende Studie zeigt darüber hinaus, dass LPS auch in der Lage ist in mikromolarer Konzentration an die Effektor-Caspasen-3 und -7 zu binden. Inflammatorische Caspasen binden die Lipid A Region von LPS durch ihre Prodomäne, die sogenannte "caspase-activation and recruitment domain" (CARD). Im Gegensatz dazu scheinen Effektor-Caspasen LPS unabhängig von ihrer Prodomäne und nicht mittels der Lipid A Region, sondern am O-Antigen, in generischer Weise zu binden. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen war ein *Shigella* Stamm, der ein verkürztes LPS aufweist, welches kein O-Antigen mehr besitzt, nicht mehr in der Lage Apoptose zu blockieren. Ferner zeigten die Bakterien eine verminderte Proliferation nach Apoptose-Induktion.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass cytosolisches LPS effizient Effektor-Caspasen binden kann, wodurch Apoptose blockiert wird und damit zu einer intrazellulären Vermehrung der Bakterien beiträgt um ihre Replikationsnische zu sichern.