Role of host microRNA in *Salmonella* phagosome maturation

DEEPALI GOYAL

ABSTRACT

Salmonellae are Gram-negative, facultative anaerobic, and intracellular pathogens that cause a variety of disease syndromes, ranging from common food poisoning to sometimes life-threatening typhoid fever. *Salmonella* has evolved different strategies to modulate intracellular trafficking within host macrophages to avoid lysosomal degradation. The pathogenesis of *Salmonella* depends on the coordinated function of various sets of virulence proteins encoded by gene clusters called *Salmonella* Pathogenicity Islands (SPI). Survival of *Salmonella* inside host cells requires a continuous supply of nutrients like fatty acids, amino acids, glucose, etc. Various reports suggest that a large number of intracellular pathogens need to acquire fatty acids from host cells. One possible way is via the lipid bodies present in host cells. Our lab has previously demonstrated that *Salmonella*-containing phagosomes (SCPs) recruit Rab18, but its role in *Salmonella* pathogenesis is not known.

Here, we have reported that *Salmonella* specifically recruits Rab18 to its SCPs in THP-1 macrophages using its effectors SipA and SipC. We have also determined the specific domains of the effectors that bind to Rab18, as well as the active form of Rab18. As Rabs exist in GTP- and GDP-bound forms in the cell depending on their activity, this distinction is important. The recruitment of Rab18 to SCPs is a live bacteria-driven phenomenon, as dead bacteria are unable to recruit host Rab18. We have reported that *Salmonella* recruits Rab18 to its SCPs in a time-dependent manner, and this recruitment is abolished in SPI-1 KO, SipA KO, and SipC KO strains. We have also addressed the mechanism regulating Rab18 expression in *Salmonella* infected THP-1 macrophages. We have reported that *Salmonella* upregulates the expression of Rab18 at the transcriptional level. Subsequently, we identified a host microRNA, hsa-miR-1914-3p, which has a specific target site in the 3′UTR of Rab18 mRNA. Further, overexpression of miR-1914-3p in macrophages leads to a reduction in host Rab18 levels. Our findings indicate that *Salmonella* infection significantly downregulates miR-1914-3p expression in macrophages. This effect is mediated through SPI-1 effectors, which in turn leads to an upregulation of Rab18.

We have also reported that *Salmonella* enhances lipid droplet (LD) number in THP-1-infected macrophages, leading to overexpression of PLIN2, a protein present on LDs. Interestingly, the increase in PLIN2 is disrupted in the absence of SPI-1 effectors. Subsequently, purified SCPs show the presence of Rab18, PLIN2, the RAB3GAP complex, and ZW10 proteins on live SCPs, and reduced amounts in dead SCPs, bead containing phagosomes, and SPI-1 KO SCPs, indicating the role of Rab18 recruitment on SCPs. Finally, we have found that intracellular bacterial growth is compromised in miR-1914-3p-overexpressing THP-1 cells, and this inhibition of bacterial growth is significantly rescued by fatty acid supplementation using oleic acid. These results demonstrate that *Salmonella* modulates host miR-1914-3p to recruit Rab18 to its phagosome and modulate its maturation through the acquisition of nutrients from host cells.

सार

साल्मोनेला एक ग्राम-ऋणात्मक (Gram-negative), ऐच्छिक अवायवीय (facultative anaerobic) एवं अंतःकोशिकीय रोगजनक है, जो सामान्य खाद्य-विषाक्तता से लेकर कभी-कभी जीवन-घातक आंत्र ज्वर तक विभिन्न रोग-संलक्षणों का कारण बनता है। साल्मोनेला ने परपोषी मैक्रोफेज के भीतर अंतःकोशिकीय परिवहन को नियंत्रित करने और लाइसोसोमल अपघटन से बचने के लिए विभिन्न रणनीतियाँ विकसित की हैं। साल्मोनेला की रोगजनकता जीन-समूहों द्वारा कूटबद्ध विभिन्न विषाणुता प्रोटीनों के समन्वित कार्य पर निर्भर करती है, जिन्हें साल्मोनेला रोगजनकता द्वीप (*Salmonella* Pathogenicity Islands, SPI) कहा जाता है। परपोषी कोशिकाओं के भीतर साल्मोनेला के उत्तरजीविता के लिए वसीय एसिड, अमीनो एसिड, ग्लूकोज आदि पोषक तत्वों की निरंतर आपूर्ति आवश्यक है। विभिन्न अध्ययनों से यह ज्ञात होता है कि बड़ी संख्या में अंतःकोशिकीय रोगजनक परपोषी कोशिकाओं से वसीय अम्ल अर्जित करते हैं। इसका एक संभावित मार्ग परपोषी कोशिकाओं में उपस्थित लिपिड बिंदुओं (lipid bodies) के माध्यम से है। हमारी प्रयोगशाला ने पूर्व में यह प्रदर्शित किया है कि साल्मोनेला-युक्त फेगोसोम (*Salmonella*-containing phagosomes, SCPs) Rab18 को अभिग्रहीत करते हैं, परंतु साल्मोनेला रोगजनकता में इसकी भूमिका अभी तक अज्ञात थी।

प्रस्तुत अध्ययन में हमने यह प्रतिवेदित किया है कि साल्मोनेला अपने प्रभावकारी प्रोटीनों SipA और SipC का उपयोग करते हुए THP-1 मैक्रोफेज में स्थित SCPs पर विशिष्ट रूप से Rab18 को अभिग्रहीत करता है। हमने यह भी निर्धारित किया है कि इन प्रभावकारियों के वे विशिष्ट डोमेन कौन से हैं जो Rab18 से बंधन करते हैं, साथ ही Rab18 के सक्रिय स्वरूप की भी पहचान की गई है। चूँकि Rab प्रोटीन कोशिका में अपनी सक्रियता के आधार पर GTP-bound और GDP-bound दोनों रूपों में विद्यमान रहते हैं, इसलिए यह भेद अत्यंत महत्त्वपूर्ण है। SCPs पर Rab18 की अभिग्राहिता एक जीवित जीवाणु-चालित परिघटना है, क्योंकि मृत जीवाणु परपोषी Rab18 को अभिग्रहीत करने में असमर्थ होते हैं। हमने यह प्रतिवेदित किया है कि साल्मोनेला समय-निर्भर रूप में SCPs पर Rab18 को अभिग्रहीत करता है, और यह अभिग्राहिता SPI-1 KO, SipA KO तथा SipC KO प्रभेदों में पूर्णतः समाप्त हो जाती है। हमने साल्मोनेला-संक्रमित मैक्रोफेज में Rab18 अभिव्यक्ति को नियंत्रित करने वाले तंत्र को भी स्पष्ट किया है। हमने यह दर्शाया है कि साल्मोनेला अनुलेखनीय स्तर पर Rab18 की अभिव्यक्ति को ऊर्ध्वनियमित करता है। इसके पश्चात्, हमने एक परपोषी सूक्ष्म-RNA (host microRNA), hsa-miR-1914-3p की पहचान की, जिसका Rab18 mRNA के 3′-UTR में एक विशिष्ट लक्ष्य स्थल है। मैक्रोफेज में miR-1914-3p का अतिअभिव्यक्तन परपोषी Rab18 के स्तर को कम कर देता है। हमारे परिणाम यह दर्शाते हैं कि साल्मोनेला संक्रमण अपने SPI-1 प्रभावकारियों का उपयोग करते हुए मैक्रोफेज में miR-1914-3p की अभिव्यक्ति को उल्लेखनीय रूप से अवरुद्ध कर देता है। इस प्रकार, साल्मोनेला SPI-1 प्रभावकारियों के माध्यम से miR-1914-3p के संश्लेषण को बाधित करता है और तद्द्वारा संक्रमित मैक्रोफेज में Rab18 के स्तर को वृद्धिंगत करता है।

हमने यह भी पाया है कि साल्मोनेला THP-1-संक्रमित मैक्रोफेज में लिपिड बूँद (lipid droplet, LD) जैवसंश्लेषण को ऊर्ध्वनियमित करता है, जिससे LDs पर उपस्थित प्रोटीन PLIN2 का अतिअभिव्यक्तन होता है। उल्लेखनीय रूप से, SPI-1 प्रभावकारियों की अनुपस्थिति में PLIN2 की यह वृद्धि बाधित हो जाती है। तत्पश्चात्, शुद्धिकृत (purified) SCPs पर जीवित SCPs में Rab18, PLIN2, RAB3GAP सम्मिश्र एवं ZW10 प्रोटीनों की उपस्थिति पाई गई, जबकि मृत SCPs, मनका-युक्त फेगोसोम तथा SPI-1 KO SCPs में इनकी मात्रा न्यूनतर थी। यह SCPs पर Rab18 अभिग्राहिता की भूमिका को इंगित करता है। अंततः, हमने पाया कि miR-1914-3p अतिअभिव्यक्तित THP-1 कोशिकाओं में अंतःकोशिकीय जीवाणु वृद्धि अवरुद्ध हो जाती है, और जीवाणु वृद्धि का यह अवरोध ओलेइक एसिड द्वारा वसीय अम्ल अनुपूरण से उल्लेखनीय रूप से प्रतिस्थापित हो जाता है। ये परिणाम यह प्रदर्शित करते हैं कि साल्मोनेला परपोषी miR-1914-3p को नियंत्रित करके अपने फेगोसोम पर Rab18 को अभिग्रहीत करता है और परपोषी कोशिकाओं से पोषक तत्वों के अधिग्रहण के माध्यम से फेगोसोम परिपक्वन को नियंत्रित करता है।