

How type IV pilus interaction forces control bacterial systems

– I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n –

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

Köln 2016

vorgelegt von :
Lena Dewenter
aus Münster

Berichtersteller/in: Prof. Dr. Berenike Maier
Prof. Dr. Dieter Meschede

Tag der mündlichen Prüfung 23.05.2016

Zusammenfassung

1

In dieser Arbeit wurden zwei zentrale Fragestellungen untersucht. Erstens, wie werden große mechanische Kräfte durch den Pilus von *Neisseria gonorrhoeae* erzeugt? Zweitens, welchen Einfluss haben diese Kräfte auf die Biofilmbildung in *N. gonorrhoeae*?

Typ IV Pili (T4P) sind Zellanhängsel, welche die bakterielle Motilität, die DNA Aufnahme und die Mikrokoloniebildung unterstützen. T4P bestehen aus hoch dynamischen Polymerfasern, die zyklisch elongieren, adhären und retrahieren, wodurch die Bakterien Kraft auf Oberflächen oder anderen Bakterien ausüben. Die notwendige Energie für die maximal gemessenen Wechselwirkungskräfte, welche von dem T4P System erzeugt werden, übertreffen die Energie, die durch die Hydrolyse eines einzelnen ATP-Moleküls freigesetzt wird. Ob diese hohen Kräfte durch die Kooperation oder sogar Koordination von mehreren Untereinheiten in einer PilT-ATPase erzeugt werden, ist noch nicht bekannt. Die Entwicklung kleiner Bakteriencluster, sogenannter Mikrokolonien, ist der erste Schritt zur Biofilmbildung. Hierbei spielen T4P für den ersten Oberflächenkontakt und der Mikrokolonieentwicklung im Allgemeinen eine entscheidende Rolle. T4P können eine große Vielfalt von Biofilm Morphotypen erzeugen, wobei die Relevanz der beteiligten mechanischen Kräfte bisher noch unbekannt ist.

Die Retraktion einzelner Pili wird durch die hexamerische PilT-ATPase angetrieben. Um die Hexamer-interne Koordination mehrerer Untereinheiten, die für die hohe Kraftproduktion notwendig ist, zu verstehen haben wir das Verhalten von mutierten Bakterien studiert, die mit nicht-funktionsfähigen Untereinheiten dotiert waren. Die Mutationen führten zu unterschiedlichen Verhältnissen zwischen funktionalen und nicht-funktionalen PilT Untereinheiten. Wir konnten zeigen, dass die Geschwindigkeit und Umkehrkraft mit steigendem Anteil an nicht-funktionalem PilT abnahmen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Untereinheiten kooperieren, eine Koordination jedoch nicht notwendig ist um größere Kräfte zu erzeugen.

Als nächstes wurde die Koordination mehrerer Pili eines Bakteriums untersucht. Jedes Bakterium führt einen 'random walk' (Korrelierter Irrflug) aus, dessen Persistenz-Zeit von der Anzahl der Pili abhängt. In einem kombinierten theoretischen und experimentellen Ansatz war es uns möglich zu zeigen, dass T4P durch einen zweidimensionalen

Tauzieh-Mechanismus mit Bündelung und Wieder-Elongation als Erinnerungseffekt koordiniert sind. Die Persistenz der Bewegung wurde durch die Behandlung mit Plasma (SP), welches die natürlich Übertragungsbedingungen simuliert, stark eingeschränkt, da diese die Pilus-Bündelung beeinträchtigt. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine SP-Behandlung einen Zuwachs in der Größe von Mikrokolonien auf Epithelzellen hervorruft, was auf eine Bevorzugung von Bakterium-Bakterium-Wechselwirkung hindeutet.

Bezogen auf die zweite zentrale Fragestellung dieser Arbeit haben wir die Hypothese aufgestellt, dass differenzielle Wechselwirkungskräfte die Biofilm Morphologie im frühen Stadium beeinflussen. Zur Beurteilung dieser Hypothese war die Messung der Wechselwirkungskräfte zwischen einzelnen Bakterien ein essentieller Bestandteil. Hierzu haben wir eine Analysemethode, zur Bestimmung der Abreißkräfte, basierend auf optischen Fallen entwickelt. Wir konnten zeigen, dass die Pilus-Pilus-Wechselwirkungskräfte durch die Pilus-Glykosylierung beeinflusst wird und dass die Pilus-Pilus-Wechselwirkungskräfte die Zellen im frühen Biofilm-Stadium organisieren. Diese Anordnung basiert auf physikalischen Grundsätzen, ähnlich denen in der Embryonalentwicklung, wie von der 'differential strength of adhesion hypothesis' (Hypothese der Differenziellen Kraft der Adhäsion) vorhergesagt.

Durch die große Nähe von Nachbarzellen in Mikrokolonien sind die einzelnen Bakterienzellen zusätzlich einem Sauerstoffgradienten ausgesetzt. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass variierende Umgebungsbedingungen die Stabilität der Mikrokolonien beeinflussen, indem die Pilus-Pilus-Wechselwirkungskräfte modifiziert werden. Mit der neu entwickelten Methode zur Bestimmung der Abreißkräfte konnten wir zeigen, dass Sauerstoff die Pilus-Pilus-Wechselwirkungskräfte unterstützt wohingegen anaerobe Bedingungen diese stark unterdrücken. Daher kann man schlussfolgern, dass auch die Mikrokoloniestabilität vom Sauerstoffniveau abhängig ist. Unter Sauerstoffeinfluss bilden sich stabile und freibewegliche Mikrokolonien mit einer runden Morphologie. Unterhalb eines Sauerstoffgrenzwertes von $3 \mu\text{M}$ unterliegen die Mikrokolonien einem aktiven Zerfallsprozess. Dieses Verhalten ist reversibel, da die Mikrokolonien sich nach Sauerstoffzugabe zügig reformieren. Wir konnten demonstrieren, dass der sauerstoffabhängige Mikrokoloniezerfall vom Abfall der Protonen-motorischen Kraft abhängt. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Biofilmstabilität von der spezifischen Wechselwirkungskraft der T4P und nicht von der T4P-Geschwindigkeit abhängt. Zusätzlich beobachteten wir, dass große Mikrokolonien ab einem Radius von $r \approx 7 \mu\text{m}$ oder ~ 1000 Zellen, einen Kern mit Bakterien, die in ihrer Bewegung stark eingeschränkt sind, entwickeln. Dieser Kern zeigt auch nach dem Sauerstoffverbrauch einen stabilen Zusammenhalt. Ebenso zeigte die Zugabe von chromosomaler DNA unter Sauerstoffmangel Stabilität fördernde Eigenschaften der Mikrokolonien. Daher ist es wahrscheinlich, dass eine DNA-Matrix die Mikrokoloniestabilität unter dem Ausfall von aktiven T4P-Retraktionen unterstützt.

Die Arbeit zeigt einen fundamentalen Zusammenhang zwischen der Höhe der interbakteriellen Wechselwirkungskräfte und der Struktur von Biofilmen auf. In Zukunft wird es interessant herauszufinden, welchen Einfluss die Adhäsionskräfte in der natürlichen Umgebung, epithelialen Wirtszellen, spielen.

Abstract

2

In this study, we examined two key questions. First, we investigated the generation of high mechanical forces of the *Neisseria gonorrhoeae* pilus. Second, the role of these mechanical forces governing *N. gonorrhoeae* biofilm morphology was scrutinized.

Type IV pili (T4P) are cell appendages that drive bacterial motility, promote DNA uptake and govern microcolony formation. The T4P are highly dynamic polymeric fibers which undergo cycles of elongation, adhesion and retraction, through which the bacteria can apply forces onto surfaces or other bacteria. The energy necessary for the maximum forces generated by T4P retraction exceed the energy provided by the hydrolysis of a single ATP. Whether these high energy levels are generated through cooperation or even coordination of multiple PilTs within one hexamer is not known so far. The formation of small bacterial clusters, called microcolonies, is the first step towards biofilm formation. T4P are used for the initial surface adhesion and microcolony formation. T4P can generate a rich diversity of biofilm morphologies, but in contrast to eukaryotic cells, the relevance of mechanical forces within the biofilm is unknown.

First, pilus coordination at the level of individual PilT ATPases was studied by doping bacteria with non-functional PilTs. Single pilus retraction is powered by the hexameric ATPase PilT. Here, we tested whether multiple ATP would be necessary to provide enough energy for high force retractions. To understand the PilT hexamer coordination and its ATP hydrolyzation, we studied the behavior of bacteria doped with non-functional PilT. We used laser tweezers to characterize the force-dependent kinetics of T4P retraction in mutant bacteria that generated different ratios of functional and non-functional PilT. We found that with increasing levels of non-functional PilT, the speed and reversal force decreased. Our data strongly suggests that the six PilTs cooperate for high force generation but coordination is not necessary.

Next, coordination between pili of a single cell was investigated. Each single *N. gonorrhoeae* cell performs a correlated random walk, where the persistence time decreases with the number of pili. In a combined theoretical and experimental approach, we were able to show that the T4P are coordinated by a two-dimensional tug-of-war mechanism with bundling and re-elongation as a memory effect. The persistence of the

motility was strongly reduced by inhibiting pilus bundling by means of seminal plasma (SP) treatment. SP treatment simulates bacterial transmission conditions and has additionally been shown to cause a significant increase in the size of microcolonies on epithelial cells, suggesting a favored bacterium-bacterium interaction.

Concerning the second key question, we hypothesized that differential interaction forces triggered cell sorting in early biofilm. To assess this hypothesis, it was essential to measure the interaction forces. To this end, a laser tweezers based assay was developed. We showed that the pilus glycosylation state fine-tuned the *N. gonorrhoeae* pilus-pilus interaction force. Additionally, we found that the pilus-pilus interaction force triggered cell sorting in early biofilms. This sorting was based on physical principles similar to those in developing embryos, as predicted by the differential strength of adhesion hypothesis.

Due to the close proximity of neighbors in microcolonies, cells are additionally exposed to gradients of oxygen. In this work, we showed that environmental conditions affected microcolony stability by modifying pilus-pilus interaction forces. Using the assay for measuring rupture forces we showed that oxygen strongly enhances the pilus-pilus interaction force and anaerobic conditions severely inhibits pilus-pilus interaction. As a consequence, microcolony stability was dependent on the oxygen level. When oxygen was available, stable and motile microcolonies with a round morphology were formed. Below a threshold oxygen concentration of 3 μM , microcolonies were found to actively disaggregate. This behavior was reversible in a way that microcolonies rapidly reformed after oxygen replenishment. We demonstrated that microcolony disaggregation upon oxygen depletion was triggered by the depletion of the proton motive force. We could show that biofilm stability is dependent on specific interaction forces of the T4P and not on the T4P retraction speed. Large gonococcal microcolonies exceeding a radius of $r \approx 7 \mu\text{m}$ or ~ 1000 cells developed a kernel that showed strongly reduced motility of the single cells within the microcolony. This kernel was found to remain stable upon oxygen depletion. Chromosomal DNA was found to stabilize microcolonies in absence of oxygen. Hence, a DNA matrix in the microcolony supports microcolony stability in the absence of active T4P retractions.

In summary, we demonstrated a fundamental relation between the magnitude of the pilus-mediated interaction force and the structure of early biofilms. In the future, it will be interesting to address the role of host cell adhesion in the morphology of gonococcal biofilms.