



University of Cologne

Type 4 Pili Tune Microcolony Dynamics and Bacterial Survivability

-Inaugural-Dissertation-

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

vorgelegt von
Tom Cronenberg
aus Hilden

Köln 2020

Berichterstatter:
(Gutachter)

Prof. Dr. Berenike Maier
Prof. Dr. Tobias Bollenbach

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2020

Abstract

Most bacterial species spend the majority of their life in multicellular communities called biofilms. Within a biofilm, cells are protected from external stress including antibiotic treatment. The human pathogen *Neisseria gonorrhoeae* relies on the type 4 pilus (T4P) to move on solid surfaces and aggregate into biofilms. The T4P is a dynamic cell appendage which continuously elongates, adheres and retracts to interact with the environment. It is unclear how T4P dynamics affect the material properties of bacterial aggregates and the antibiotic tolerance of cells within biofilms. The first part of this thesis focuses on the biophysical characterization of force generation by the T4P motor. The second part links these forces to the dynamics of microcolonies and the survival rate in early biofilms.

By means of optical tweezers, we show that the gonococcal T4P can retract in the absence of the retraction ATPase PilT. The retraction velocity is approximately 2 orders of magnitude smaller than in the presence of PilT and depends on the applied force. The stalling force is reduced more than 20-fold to 5 pN. We show that PilT independent retraction is not exclusively powered by proton motive force (PMF) and the PilT paralogues PilT2 and PilU, but depletion of PMF and deletion of *pilT2* reduce the retraction velocity. Furthermore, overexpression of the major pilin PilE decreases the retraction velocity. Finally, we demonstrate that doping of motor complexes with non-functional PilT decreases motor activity but does not inhibit PilT driven retraction.

Next, we investigated how pili affect the dynamics of microcolonies which are an early step in biofilm formation. We show that gonococcal colonies show liquid-like shape relaxation dynamics. The relaxation rate is tuned by motor activity and PilE glycoform and phosphoform modifications, which change pilus surface structure. We demonstrate that colony viscosity is strongly affected by changes in motor activity, while colony surface tension exhibits only minor changes. Likewise,

modifications in pilin posttranslational modifications severely affect the viscosity of colonies. Removing the phosphoform modification leads to a transition from fluid-like to solid-like dynamics. Furthermore, we show that PilE glycoform and phosphoform modifications govern cell sorting.

Bacterial biofilms were shown to exhibit increased antibiotic tolerance compared to planktonic cells. Using confocal microscopy, we show that gonococci deep within the biofilm exhibit an increased survivability compared to cells at the surface when treated with ceftriaxone. We demonstrate that antibiotic treatment increases cell size and affects biofilm structure. Azithromycin treatment enhance cell motility within aggregates. We show that motor activity and pilin posttranslational modifications increase the cell survivability under benign conditions but render cells more susceptible to antibiotic treatment. Finally, we show that a pretreatment with azithromycin decrease cell survivability under ceftriaxone treatment.

Having demonstrated that pilus-mediated cell-cell interactions affect colony structure, dynamics and bacterial survival, we investigated how pilus behavior evolves in the presence and absence of H₂O₂. Gonococcal populations evolving in liquid environment lose the ability to form surface associated aggregates but still produce pili. Additionally, growth in liquid culture selects for pellicle formation. Many mutational pathways involving the pilus related genes *pilE*, *pilC1* and *pilC2* lead to similar aggregation phenotypes.

In summary, we show that tuning of T4P mediated interactions governs colony dynamics and strongly affects material properties of microcolonies. T4P mediated dynamics affect the efficiency of antibiotic treatment in bacterial biofilms. Our results suggest that targeting of T4P-T4P interactions increases the efficiency of bactericidal antibiotics which might lead to novel strategies of treating infections with *N. gonorrhoeae*.

Kurzzusammenfassung

Die meisten Bakterienarten leben den Großteil ihres Lebens in multizellulären Gemeinschaften, die Biofilme genannt werden. In einem solchen Biofilm sind die Zellen vor von außen zugefügtem Stress wie Antibiotika geschützt. Das für den Menschen pathogene Bakterium *Neisseria gonorrhoeae* verwendet den Typ 4 Pilus (T4P) um sich auf festen Oberflächen zu bewegen und Biofilme zu formen. Der T4P ist ein dynamisches Zellanhängsel, welches kontinuierlich elongiert, adhärert und retrahiert um mit der Umgebung zu interagieren. Bisher ist nicht geklärt, wie die T4P Dynamik die Materialeigenschaften von bakteriellen Aggregaten und die Toleranz gegenüber Antibiotika in Biofilmen beeinflusst. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der biophysikalischen Charakterisierung der Krafterzeugung durch den T4P Motor. Der zweite Teil verbindet diese Interaktionskräfte mit der Dynamik von Mikrokolonien und der Überlebensrate in jungen Biofilmen.

Mit Hilfe einer optischen Pinzette konnten wir zeigen, dass der T4P von Gonokokken retrahieren kann, wenn die Retraktions-ATPase PilT nicht vorhanden ist. Die Retraktionsgeschwindigkeit ist dabei etwa zwei Größenordnungen kleiner als wenn PilT vorhanden ist. Des Weiteren hängt die Geschwindigkeit von der anliegenden Kraft ab. Die Kraft, bei der der Motor stoppt, ist um etwa den Faktor 20 auf 5 pN reduziert. Wir konnten zeigen, dass die PilT unabhängige Pilusretraktion nicht ausschließlich durch die protonenmotorische Kraft und die PilT Paraloge PilT2 und PilU getrieben ist. Allerdings führen der Abbau der protonenmotorischen Kraft und die Deletion von *pilT2* zu einer Reduzierung der Retraktionsgeschwindigkeit. Des Weiteren führt eine Überproduktion des Hauptpilins PilE zu einer Verringerung der Retraktionsgeschwindigkeit. Zu guter Letzt konnten wir demonstrieren, dass die Dotierung von Motorkomplexen mit nicht funktionalen PilT Untereinheiten die durch PilT getriebene Retraktion nicht verhindert, aber zu einer Verringerung der Motoraktivität führt.

Als nächstes untersuchten wir den Einfluss von Pili auf die Dynamik von Mikrokolonien, welche einen frühen Schritt in der Ausbildung von Biofilmen darstellen. Wir konnten zeigen, dass durch Gonokokken geformte Kolonien eine flüssigkeit-sähnliche Relaxationsdynamik aufweisen. Die Relaxationsrate wird dabei durch die Motoraktivität und durch Glyko- und Phosphormodifikationen von Pile bestimmt. Letztere ändern dabei die Oberflächenstruktur des Pilus. Wir konnten zeigen, dass die Viskosität von Kolonien stark von der Motoraktivität abhängt, während die Oberflächenspannung kaum davon beeinflusst wird. Auch unterschiedliche posttranslationelle Modifikationen des Pilins haben einen starken Einfluss auf die Viskosität von Kolonien. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass Glyko- und Phosphormodifikationen das Sortierungsverhalten von Zellen in Aggregaten bestimmen.

Bakterielle Biofilme weisen im Vergleich zu planktonischen Zellen eine erhöhte Toleranz gegenüber Antibiotika auf. Unter Verwendung der konfokalen Mikroskopie konnten wir zeigen, dass aggregierte Gonokokken, die sich nahe des Zentrums des Biofilms befinden, eine im Vergleich zu den Zellen am Rand erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen, wenn sie mit Ceftriaxon behandelt werden. Wir konnten demonstrieren, dass die Behandlung mit Antibiotika die Zellgröße erhöht und die Biofilmstruktur beeinflusst. Die Behandlung mit Azithromycin erhöht die Zellmotilität in Zellaggregaten. Unsere Daten weisen darauf hin, dass die Motoraktivität und die posttranslationelle Modifikation der Piline die Überlebenswahrscheinlichkeit von Zellen in Abwesenheit von äußerem Stress erhöht, aber auch zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Antibiotika führt. Zu guter Letzt konnten wir zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Azithromycin die Überlebenswahrscheinlichkeit von Zellen unter Ceftriaxonbehandlung verringert.

Basierend auf den Beobachtungen, dass die durch den Pilus vermittelten Zell-Zell Interaktionen die Struktur und die Dynamik von Kolonien sowie die Überlebensfähigkeit von Bakterien beeinflussen, wurde durch uns untersucht, wie die durch den Pilus vermittelte Aggregation in der Anwesenheit und der Abwesenheit von H_2O_2 evolviert. Gonokokkenpopulationen, die in flüssiger Umgebung evolvieren, verlieren die Fähigkeit Aggregate auf Oberflächen zu formen, obwohl sie noch funktionale Pili besitzen. Zusätzlich selektiert Wachstum in Flüssigkultur auf die Bildung von Pellikeln. Wir konnten zeigen, dass viele verschiedene Mutationspfade, die sich auf

die zum Pilus zugehörigen Gene *pilE*, *pilC1* und *pilC2* beziehen, einen ähnlichen Aggregationsphänotyp hervorrufen können.

Zusammengefasst haben wir gezeigt, dass eine Änderung der Pilusinteraktionen sowohl die Dynamik als auch die Materialeigenschaften von Mikrokolonien bestimmt. Die durch den T4P vermittelte Dynamik beeinflusst die Effizienz der Antibiotikabehandlung von bakteriellen Biofilmen. Unsere Resultate weisen darauf hin, dass ein Eingreifen in die T4P-T4P Interaktion die Effizienz von bakteriziden Antibiotika erhöht, was zu neuartigen Behandlungsstrategien im Kampf gegen Infektionen mit *N. gonorrhoeae* führen könnte