

# Abstract

Structure and function are closely intertwined in multi-cellular organisms. The evolution of subdividing tissues into separate compartments and their subsequent maintenance gave rise to complex species. Spatial organisation is a key requirement for specialised cells to fulfil their specific functions. It is recognised that the initial segregation of cells in developing embryonic tissues is strongly influenced and indeed facilitated by differential physical interactions among different cell types. The mechanics inside a developing embryo closely resemble liquid-like properties of highly viscous fluids.

Recently, the role of spatial organisation and maintenance of heterogeneity in bacterial biofilms has received increased attention. Traditionally, biofilm compositions might be seen as clumps of identical bacteria that passively grow at the site of their initial attachment to surfaces. However, these aggregates can be more than homogeneous clusters. Genetic differentiation and mutation hotspots that act at high frequencies can lead to differentially altered bacteria inside the same biofilm.

In this study, we set out to investigate in how far spatial organisation can be promoted between bacteria with differentially altered surface properties. On top of passive growth at the position of their initial occurrence, differential physical interactions were shown to actively govern the architecture of early bacterial biofilms.

We were able to genetically modify the physical interactions between bacteria of the species *Neisseria gonorrhoeae* by changing the properties of gonococcal type IV pili (T4P), which are adhesive filaments that dominate cell-cell interactions in *N. gonorrhoeae*. A systematic tuning of the physical pilus-pilus interactions was achieved by suppression of post-translational modification of the T4P. Specifically, the glycosylation of PilE was inhibited, which is the major constituent of the pilus fibre. Pilus-pilus rupture forces between glycosylated and non-glycosylated pili were measured. The force required for breaking homotypic connections between non-glycosylated T4P increased, while the force required to break heterotypic connections decreased in comparison to the homotypic rupture forces between wild-type T4P. In addition to modifications of pilus-pilus interactions, the cell-cell interactions were raised or lowered by increasing or decreasing the T4P-density on the cells, respectively. These modifications allowed to use the T4P as a tool for controlling bacterial cell-cell interactions. The resulting toolbox was used to demonstrate how cells with decreased interactions get pushed out of expanding bacterial colonies grown on agar and are segregated to the front of these model biofilms. In liquid environments, gonococcal cell-cell interactions lead to the aggregation of spherical clusters called microcolonies. Dependent on the differential interactions between the cells, mixed microcolonies showed cell sorting. In this context, microcolonies showed a liquid-like behaviour with apparent differential surface energies. In analogy to immiscible viscous fluids, the differences in surface tensions drove the mixed microcolonies into phase-separated domains. Additionally, initial experiments were performed showing that not only the final equilibrium shapes resemble a liquid-like state, but the dynamic time-course of gonococcal clusters rounding up into spheres follow liquid-like properties, too. This puts the cell sorting observed in our system on the same physical

footing as the theoretical descriptions of cellular segregation in developing tissues. However, while eukaryotic cells in tissues are extended units that exhibit both contractile forces along cell-cell boundaries and antagonistically opposing forces arising from cell adhesions, the cell body in our bacterial system is proposed to act as a point-object with purely attractive forces arising from T4P retractions. We propose the mechanism for cell sorting to be based on a tug-of-war between bacteria with cells moving in the direction where they can pull the strongest, i.e. the direction where the rupture force is highest. A similar mechanism has been described by Harris in the differential strength of adhesion hypothesis.

The genetic modifications introduced to alter T4P and gonococcal cell-cell interactions were purposefully chosen to reflect changes in T4P properties that can frequently occur under mechanisms called phase- and antigenic variation. The results of T4P-dependent cell sorting, taken together with experiments of expanding gonococcal model biofilms, demonstrated how natural phase- and antigenic variation lead to segregation of *N. gonorrhoeae*. Gonococci with decreased cell-cell interactions governed the competition dynamics in structured environments. Segregation due to differential physical interactions was shown to occur irrespective of differential growth rates.

Furthermore new methods developed in this study demonstrated high fitness costs associated with the expression of PilE. Beyond this, new software tools developed in this study helped to elucidate the role of ComE in the process of DNA uptake into *N. gonorrhoeae*. ComE is a DNA binding protein and the tools developed here, helped to show the quantitative influence of ComE on the amount of DNA that could be taken up into the periplasm of *N. gonorrhoeae*. Once inside the periplasm, DNA was shown to localise into clusters. The spatial distribution of these clusters was analysed and shown to be dependent on the length of DNA fragments inside these clusters with a tendency of smaller fragments to aggregate at the septum of gonococci.

Taken together, the role of physical interactions in bacterial cell aggregates and biofilms could be elucidated. Cells were able to actively position themselves inside a biofilm. This has far reaching implications since cell sorting can modify the architecture of biofilms. This might lead to changes in the resilience against antibiotics, can influence the efficiency of gene transfer and thus the spread of resistances, or be the switch from an uncomplicated to a chronic or disseminated disease. These results are likely to spark further investigations of the impact of differential physical interactions on the structure and function of biofilms, and point to a promising field of new research.

## Kurzzusammenfassung

Struktur und Funktion sind eng verbunden in multizellulären Organismen. Die Entwicklung von separaten Kompartimenten und deren Aufrechterhaltung führten zu komplexen Spezies. Spezialisierte Zellen benötigen eine räumliche Unterteilung um richtig zu funktionieren. Inzwischen ist bekannt, dass die initiale Entmischung von Zellen in embryonalen Geweben deutlich durch differentielle physikalische Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen beeinflusst und gefördert wird. Die Mechanik in der embryonalen Entwicklung kann mit einem flüssigkeitsähnlichem Verhalten beschrieben werden.

Seit kurzem bekommt die Rolle von räumlicher Struktur und Aufrechterhaltung einer Heterogenität in bakteriellen Biofilmen eine erhöhte Aufmerksamkeit. Üblicherweise würde man den Aufbau eines Biofilms mit Klumpen von identischen Bakterien vergleichen, welche passiv auf einer Oberfläche wachsen. Jedoch können diese Anhäufungen durchaus mehr sein. Genetische Differenzierung und Zufallsmutationen können zu unterschiedlichen Bakterien innerhalb des gleichen Biofilms führen.

In dieser Arbeit wird der Einfluss von Bakterien mit veränderter Oberflächenstruktur auf deren räumliche Anordnung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass, zusätzlich zu passivem Wachstum, differentielle physikalische Interaktionen die Architektur in jungen Biofilmen beherrschen.

Die physikalischen Interaktionen zwischen *Neisseria gonorrhoeae* Bakterien konnten genetisch modifiziert werden, indem die Eigenschaften von ihren type IV pili (T4P) verändert wurden. T4P sind adhäsive Filamente, welche die Interaktion zwischen *N. gonorrhoeae* Zellen dominieren. Ein systematisches Einstellen der physikalischen pilus-pilus Interaktionen konnte durch eine Unterdrückung von post-translationalen Modifikationen des T4P erreicht werden, indem die Glykolisierung von PilE gehemmt wurde. T4P sind hauptsächlich aus PilE Proteinen aufgebaut. Die Abreisskräfte zwischen glykosylierten und unglykosylierten T4P konnten gemessen werden. Relativ zur Abreisskraft von homotypischen glykosylierten T4P war die Abreisskraft von homotypischen Verbindungen zwischen unglykosylierten T4P erhöht und die Abreisskraft von heterotypischen Verbindungen erniedrigt. Weiterhin konnten die Interaktionen zwischen den Zellen durch eine Erhöhung, bzw. Erniedrigung der T4P-Dichte der Zellen gesteigert, bzw. gesenkt werden. Dadurch war es möglich den T4P als Werkzeug zur Beeinflussung der Interaktion zwischen den Zellen zu benutzen. So konnte gezeigt werden, dass eine Senkung der Interaktionen dazu führt, dass Zellen aus einer auf Agar expandierenden Bakterienkolonie herausgedrückt werden und sich an der Front dieses Modell Biofilms ansammeln. In flüssiger Umgebung führt die interzelluläre Interaktion zur Agglomeration von kugelförmigen Mikrokolonien. Gemischte Mikrokolonien führten abhängig von differentieller Interaktion eine Zellsortierung aus. Dies ähnelte dem Verhalten von Flüssigkeitstropfen mit unterschiedlicher Oberflächenspannung. Analog zu unvermischbaren, viskosen Flüssigkeiten, konnten Unterschiede in der Oberflächenspannung die gemischten Mikrokolonien in phasenetrennte Domänen entmischen. Ausserdem wurden erste Experimente ausgeführt, welche zeigten, dass nicht nur die Gleichgewichtsform, sondern auch die zeitliche Veränderung von Anhäufungen von Zellen, die sich zu Kugeln formen, sich flüssigkeitsähnlich verhält. Damit wird die Zellsortierung im hier beobach-

tetem System auf das gleiche physikalische Fundament gestellt, wie die theoretischen Beschreibungen von Zellentmischungen in embryonalen Geweben. Jedoch sind eukaryotische Zellen ausgedehnte Einheiten mit kontraktile Kräfte entlang ihrer Zellgrenzen und entgegengesetzten Adhäsionskräften. Die hier beschriebenen Bakterienzellen sind eher Punktobjekte und zeigen nur attraktive Kräfte auf Grund von T4P Retraktionen. Die Theorie wird aufgestellt, dass der Mechanismus zur Zellsortierung auf einem Tauziehen zwischen den Bakterien beruht. Die Zellen werden dann in die Richtung gezogen, in der sie den grössten Zug aufbauen können. D.h. die Richtung, in der die Abreisskräfte am höchsten sind. Ähnlich argumentiert Harris in seiner *differential strength of adhesion hypothesis*.

Die genetischen Veränderungen um den T4P und die interzelluläre Interaktion zu beeinflussen, wurden bewusst gewählt um Veränderungen des T4P zu verursachen, welche auch häufig natürlich unter dem Einfluss von sogenannter Phasen- und Antigenischer Variation entstehen. Zusammen mit den Ergebnissen der T4P abhängigen Zellsortierung, konnten Experimente mit expandierenden Modell Biofilmen demonstrieren, dass natürliche Phasen- und Antigenische Variation zur Entmischung von *N. gonorrhoeae* führt. Gonokokken mit erniedrigter interzellulärer Interaktion beherrschten die Ausbreitungsdynamik in strukturierten Umgebungen. Entmischung auf Grund von differentieller physikalischer Interaktion konnte gleichgültig von differentiellem Wachstum gezeigt werden.

Weiterhin wurden neue Methoden entwickelt, welche hohe Wachstumskosten auf Grund der Epression von PilE nachweisen konnten. Darüber hinaus, wurden Algorithmen entwickelt, welche halfen die Rolle von ComE in der DNA Aufnahme von *N. gonorrhoeae* zu erklären. ComE ist ein DNA-bindendes Protein und der Algorithmus konnte benutzt werden um zu zeigen, dass ComE einen quantitativen Einfluss auf die Menge an DNA, die in das Periplasma von *N. gonorrhoeae* aufgenommen werden kann, hat. Innerhalb des Periplasmas wurde die DNA stark gebündelt. Die räumliche Verteilung dieser Zusammenballungen konnte analysiert werden. Es zeigte sich, dass diese Anhäufungen sich mehr in Richtung des Septums von Gonokokken bewegten, je kürzer die DNA Fragmente waren, aus denen sie aufgebaut sind.

Schlussendlich wurde der Einfluss von physikalischer Interaktion auf Bakterienansammlungen und Biofilmen gezeigt. Zellen konnten sich aktiv innerhalb des Biofilms positionieren. Das hat weitreichende Folgen, denn die Zellsortierung kann die Architektur des Biofilms verändern. Dies könnte die Resistenz gegen Antibiotika erhöhen, die Effizienz von Gentransfer und damit verbundener Resistenzen verändern, oder gar der Schalter sein, welcher eine harmlose Infektion in eine sich ausbreitende, chronische Krankheit verändert. Diese Ergebnisse werden mit grosser Sicherheit weitere Forschungen veranlassen um den Einfluss von differentieller physikalischer Interaktion auf Struktur und Funktion von Biofilmen besser zu begreifen.