

# Abstract

The human pathogen *Neisseria gonorrhoeae* is the causative agent of gonorrhea, one of the most common sexually transmitted diseases worldwide. As clinical isolates of *N. gonorrhoeae* have developed high level resistance to almost all available antibiotics, gonorrhea emerges into a major public health concern. The pathogen has a huge reservoir of virulence factors mediating and maintaining infection of the human host. One of the most crucial virulence factors are type IV pili (T4P). T4P are dynamic cell appendages contributing to several functions including adhesion, movement, colony formation, antigenic escape, and horizontal gene transfer. We were especially interested in how this nano-machinery is affected by external stress and how gene conversion affects T4P-mediated survivability and gene expression.

In the first part of this study, we aimed at characterizing the effects of external stresses and aggregation on T4P production and dynamics. We established a method that enables direct visualization of gonococcal T4P *in vivo*. We showed that *N. gonorrhoeae* produce T4P at a remarkably high rate. By applying external stress in form of antibiotics, T4P production and dynamics are reduced. Transcriptional analysis after antibiotic treatment reveals downregulation of T4P associated genes and genes involved in energy metabolism pathways. Similar to antibiotics, oxidative stress or a decrease in pH reduced piliation levels and dynamics. We propose that reduced ATP levels within the cell are the driving force of changes in T4P production and dynamics. Finally, we investigated how T4P dynamics change as gonococci aggregate into colonies and demonstrate that T4P are dynamic within young microcolonies.

Antigenic variation facilitates the escape of a pathogen from the hosts immune surveillance. The major pilin *pilE* that forms the T4P fiber is naturally hypermutable by antigenic variation. We addressed the effects of pilin antigenic variation on T4P-dependent processes and on gene expression. We show that T4P functionality is strongly affected by pilin antigenic variation as different *pilE* variants that power surface movement are impaired in generating attractive forces between T4P. Consequently, these antigenic variants affect colony formation, resulting in planktonic, colony-inhibited strains. We used these pilin variants to address the question how colony formation affects gene expression. By RNA sequencing, we found that genes involved in anerobic respiration, iron and sulfur acquisition and genes encoding for prophages are strongly upregulated within the colony. On the other hand, ribosomal genes and some genes involved in energy and carbohydrate metabolism are downregulated. Since it has been shown

previously shown that cell aggregation is positively correlated with antibiotic tolerance, we used the pilin variants to investigate the effects of colony formation on tolerance against ceftriaxone. We found that T4P-mediated colony formation enhances tolerance against the antibiotic. As a first step towards identifying mechanisms involved in antibiotic tolerance we investigated the effects of deletion of genes that are highly upregulated in colonies and found promising candidates. Taken together, we show that antigenic variation impacts the behavior of gonococci beyond facilitating the escape from the human immune system.

Horizontal gene transfer contributes to the genetic diversity in *N. gonorrhoeae*. Gonococci are naturally competent for transformation. The DNA uptake machinery relies on T4P and the periplasmic DNA binding chaperone ComE. Here, we investigated how the uptake rate and the total amount of imported DNA depend on *comE* expression levels and on the sequence of ComE. We show that DNA uptake is increased by overexpression of ComE and is preserved when gonococcal ComE is replaced by ComE of commensal *Neisseria* species.

In summary, we highlight the complex interplay between external stresses and T4P production and dynamics. We show that naturally occurring antigenic variation impacts the T4P functionality and consequently the gonococcal lifestyle, the transcriptional response and tolerance towards antibiotics.

# Zusammenfassung

Das humanpathogene Bakterium *Neisseria gonorrhoeae* ist der Erreger der Gonorrhö, eine der am häufigsten sexuell übertragenen Krankheiten. Klinische Isolate des Erregers weisen immer häufiger multiple Resistenzen gegen die meisten klinisch angewandten Antibiotika auf, infolgedessen wird die Krankheit zu einem immer größeren globalen Problem. Das Pathogen verfügt über eine Reihe an Virulenzfaktoren, die eine Infektion im Menschen ermöglichen und auch erhalten. Einer der bedeutendsten Virulenzfaktoren sind Typ IV Pili (T4P). Diese dynamischen Zellfortsätze tragen zu einer Vielzahl von Funktionen bei, unter anderem ermöglichen sie die Infektion durch Adhäsion, Bewegung über Oberflächen, Koloniebildung, Immunevasion und horizontalen Gentransfer. Im Rahmen dieser Dissertation, sind wir besonders daran interessiert, wie externer Stress diese Nanomaschine beeinflusst und wie die Genkonversion der Pili die Toleranz gegenüber Antibiotika und die Genexpression beeinflusst.

Im ersten Teil dieser Arbeit, charakterisieren wir die Auswirkung von Stressbehandlung und Aggregation auf die T4P Produktionsrate und Dynamiken. Dazu etablieren wir eine Methode, welche die *in vivo* Visualisierung von T4P in *N. gonorrhoeae* ermöglicht. Wir zeigen, dass die T4P Produktionsrate in Gonokokken außergewöhnlich hoch ist und durch Antibiotikabehandlung reduziert werden kann. Die Analyse des Transkriptomts nach Antibiotikabehandlung ergab, dass T4P assoziierte Gene und Gene die am Energiestoffwechsel beteiligt sind, stark herabreguliert sind. Ähnlich zur Antibiotikabehandlung, führt oxidativer Stress und ein Absenken des pH-Wertes zu einer Reduktion der T4P Produktionsrate und einer Drosselung der Dynamiken. Wir folgern, dass reduzierte ATP Spiegel innerhalb der Zelle verantwortlich sind für die beobachteten Veränderungen der T4P. Des Weiteren können wir zeigen, dass T4P auch innerhalb von Aggregaten, insbesondere jungen Mikrokolonien, dynamisch sind und kontinuierlich retrahieren und elongieren.

Vermittelt durch antigenische Variation können pathogene Organismen dem Immunsystem des Wirtes entkommen. Das Gen *pilE*, das für das Hauptpilin der Pilusfaser kodiert, weist aufgrund antigenischer Variation eine hohe genetische Variabilität auf. Wir vermuten, dass Prozesse, die von T4P abhängen, stark durch antigenische Variation beeinflusst werden. In Folge dessen, wird wahrscheinlich auch die Genexpression davon verändert. Wir zeigen, dass die Funktionalität von T4P stark durch antigenische Variation beeinträchtigt wird, denn manche *pilE* Varianten ermöglichen die Bewegung über Oberflächen, weisen aber stark verminderte T4P Interaktionen auf. Dementsprechend bestimmt die Sequenz des Pilin den Lebensstil von

Gonokokken, entweder als planktonische Zellen oder in Form von Zellaggregaten. Mit Hilfe von RNA Sequenzierung untersuchten wir die differentielle Genexpression dieser beiden Lebensstile. Wir fanden heraus, dass Gene die für die anaerobe Atmung, Eisen und Schwefel Akquisition und Prophagen kodieren, stark in der Kolonie exprimiert werden. Andererseits sind viele ribosomale Gene und Gene die am Energie- und Kohlenstoffstoffwechsel beteiligt sind herabreguliert. Da Zellaggregation positiv mit der Toleranz gegenüber Antibiotika korreliert, sind wir ebenfalls daran interessiert wie antigenische Variation die Toleranz gegenüber Ceftriaxon beeinflusst. Wir zeigen, dass die T4P vermittelte Koloniebildung in Gonokokken zu einer erhöhten Toleranz führt. Um Gene zu identifizieren, die an der Kolonie-vermittelten Antibiotikatoleranz beteiligt sind, analysieren wir den Effekt der Gendeletion stark hochregulierte Gene unter Antibiotikabehandlung. Abschließend können wir somit demonstrieren, dass antigenische Variation weitaus mehr Einfluss auf Gonokokken nimmt, als nur die Flucht vor dem adaptiven Immunsystem.

Horizontaler Gentransfer trägt zu einer erhöhten genetischen Vielfalt in Gonokokken bei. *N. gonorrhoeae* ist natürlich transformierbar und die Aufnahme extrazellulärer DNA wird durch T4P und das im Periplasma lokalisierte, DNA bindende Chaperon ComE ermöglicht. In dieser Arbeit untersuchen wir, wie die DNA Aufnahme von der ComE Konzentration und dessen Sequenz abhängt. Wir können zeigen, dass die DNA Aufnahme gesteigert werden kann, wenn ComE überproduziert wird. Außerdem kann die DNA Aufnahme aufrechterhalten werden, wenn ComE durch ComE von kommensalen *Neisseria*-Arten ausgetauscht wird.

Zusammenfassend demonstrieren wir in dieser Arbeit ein komplexes Zusammenspiel zwischen externer Stressbehandlung und der T4P Produktion und Dynamik. Wir zeigen, dass natürlich vorkommende, antigenische Variation die T4P-Funktionalität und folglich den Lebensstil von Gonokokken, die Genexpression und die Toleranz gegenüber Antibiotika beeinflusst