

DISS. ETH NO. 27154

**Bacterial cell-cell interactions
studied by cryo-electron tomography**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Gregor Ludwig Weiss

M.Sc. in Biological Chemistry
University of Vienna, Austria

born on 03.11.1989

citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Martin Pilhofer (examiner)
Prof. Dr. Jörn Piel (co-examiner)
Prof. Dr. Thomas Marlovits (co-examiner)

2020

Summary

Bacteria rarely occur as isolated organisms, making interactions with surrounding cells crucial for their survival. These cell-cell interactions are highly diverse as they serve a great spectrum of different purposes, ranging from mutualistic and symbiotic to opportunistic and pathogenic. With the help of intercellular communication, bacteria are able to shape cellular communities in diverse ecological habitats. Furthermore, the high spatial and temporal control of the underlying processes highlight our current definition of bacteria as complex organisms. This complexity, however, leads often to an incomplete understanding of these cell-cell interactions. In order to improve our knowledge about how bacteria shape their environment, the principles of bacterial cell-cell interactions need to be studied and understood on several levels – from molecular to cellular scale.

Key players in mediating bacterial cell-cell interactions are often macromolecular multi-protein complexes. Cryo-electron tomography (cryo-ET) is tailored to visualize the involved

complexes in their cellular environment (*in situ*), in a native state and at a few nanometer resolution. Combined with subtomogram averaging, cryo-ET is even capable to solve high-resolution structures, which can help to link protein architecture with function.

This approach, combined with cryo-focused ion beam (FIB) milling for sample preparation as well as additional functional assays, was successfully applied within this thesis to elucidate the *in situ* architecture and function of several macromolecular machineries involved in diverse cell-cell interactions. **Chapter 2** describes a bacterial gap junction analog in filamentous cyanobacteria, termed septal junction (SJ), which enables molecular exchange between sister cells. Here, we could demonstrate that SJs consist of a septum spanning tube and a plug, which was covered by a cytoplasmic cap. Intercellular communication was blocked upon stress, which was accompanied by a reversible conformational change of the cap.

To interact with cells other than sister cells within a filament, bacteria have to translocate effectors across their entire cell envelope. Contractile injection systems (CISs) are widely used mediators of such interactions and were so far divided into two modes of action. In **Chapter 3**, we could identify a third mode of action of CIS in a cyanobacterium. These CISs were anchored within a pore of the thylakoid membranes and stress-induced ghost cell formation exposed the CIS to possible targets in the environment.

Eukaryotic cells on the other hand evolved strategies to block bacterial interaction to hinder infection. **Chapter 4** describes the first three-dimensional structure of human Uromodulin (UMOD), the most abundant protein in urine. We could show, how UMOD encapsulates and aggregates uropathogenic bacteria, hence preventing their adhesion to the bladder epithelium and infection of the urinary tract.

This work routinely used a state-of-the-art imaging workflow together with accompanying functional assays to reveal aspects of bacterial cell-cell interactions at unprecedented detail. It will serve as groundwork for future studies in both, basic bacterial cell biology and advanced studies for new treatment strategies against urinary tract infections.

Zusammenfassung

Bakterien findet man selten als isolierte Organismen, dementsprechend sind Interaktionen mit Zellen in der Umgebung entscheidend für ihr Überleben. Diese Zell-Zell Interaktionen können sehr unterschiedlich ausfallen, da sie von mutualistischen und symbiotischen bis zu opportunistischen und pathogenen, sehr diversen Zwecken dienen. Mithilfe dieser zellulären Kommunikation können Bakterien jedoch ganze Gemeinschaften in verschiedenen ökologischen Lebensräumen aktiv formen. Darüber hinaus unterstreicht die hohe räumliche und zeitliche Kontrolle der zugrunde liegenden Prozesse unsere heutige Definition von Bakterien als komplexe Organismen. Diese Komplexität führt allerdings auch häufig zu einem lückenhaften Verständnis dieser Zell-Zell Kommunikation. Um ein tiefgreifendes Wissen dafür zu bekommen, wie Bakterien ihr Umfeld gestalten, müssen die Prinzipien der bakteriellen Zell-Interaktionen auf mehreren Ebenen untersucht werden – von molekularer bis zur zellulären Ebene.

Makromolekulare Multi-Proteinkomplexe sind zumeist die zentralen Vermittler der Interaktionen zwischen Bakterien und anderen Zellen. Kryo-Elektronentomographie (cryo-ET) ist genau darauf ausgelegt, die beteiligten Komplexe in ihrer zellulären Umgebung sowie mit einer Auflösung von ein paar Nanometern zu visualisieren. In Kombination mit dem Mitteln von repetitiven Strukturen in mehreren Tomogrammen kann diese Technik sogar hochaufgelöste Strukturen produzieren. Dies kann dabei helfen die Protein-Architektur mit ihrer Funktion zu verknüpfen.

Dieser experimentelle Ansatz wurde mit Ionenstrahl-Fräsen zur Probenvorbereitung sowie weiteren funktionellen Experimenten erfolgreich verbunden, wodurch im Rahmen dieser Arbeit die *in situ* Architektur mehrerer makromolekularen Komplexe sowie deren Beteiligung in Zell-Zell Interaktionen aufgezeigt werden konnte. **Kapitel 2** beschreibt ein Analogon zu Gap Junctions in filamentösen Cyanobakterien. Diese sogenannten Septal Junctions (SJs) ermöglichen den molekularen Austausch zwischen Schwesterzellen. Wir konnten zeigen, dass SJs aus einem Septum-spannenden Röhrchen und einem Stopfen bestehen, der von einer zytoplasmatischen Kappe bedeckt war. Die interzelluläre Kommunikation konnte durch Stress blockiert werden, was mit einer Konformationsänderung der Kappe einherging.

Um mit anderen Zellen als mit Nachbarzellen in einem Filament zu kommunizieren, müssen Bakterien Effektoren über ihre Zellhülle translozieren. Kontraktile Injektionssysteme (CIS) sind weitverbreitete Nanomaschinen, die diese Aufgabe übernehmen und sie wurden bisher in zwei Funktionsweisen unterteilt. In **Kapitel 3** konnten wir eine dritte Funktionsweise von CIS in Cyanobakterien identifizieren. Diese CIS waren in einer Pore in der Thylakoid-Membran verankert und wurden durch stressbedingte Bildung von Geisterzellen für Interaktionen mit der Umwelt freigelegt.

Eukaryotische Zellen entwickelten jedoch auch Strategien um bakterielle Interaktionen zu blockieren und somit eine Infektion zu verhindern. **Kapitel 4** beschreibt die erste dreidimensionale Struktur von menschlichen Uromodulin (UMOD), dem häufigsten Protein im Urin. Wir konnten zeigen wie UMOD uropathogene Bakterien umschließt was folglich zu Zell-Aggregation führt. Dies verhindert die Adhäsion der Bakterien am Blasenepithelium, wodurch eine Harnwegsinfektion erschwert wird.

Diese Arbeit verwendete ein hochmodernes Bildgebungsverfahren zusammen mit weiterführenden funktionellen Experimenten, um verschieden Aspekte der Interaktionen zwischen Bakterien und anderen Zellen mit einer beispiellosen Auflösung aufzudecken. Dies bildet die Grundlage für zukünftige Studien, sowohl in der grundlegenden bakteriellen Zellbiologie als auch in angewandten Studien auf der Suche nach neuen Behandlungsstrategien gegen Harnwegsinfektionen.