

DISS. ETH NO. 29426

**The molecular composition and structure of the
type IV pilus during bacterial
natural transformation**

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

presented by

Sebastian Albrecht Gerhard Braus

M.Sc. Biochemistry, Technical University of Munich

born on 13.07.1992

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Manuela Kathrin Hospenthal

Prof. Dr. Nenad Ban

Prof. Dr. Rudolf Glockshuber

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt

2023

Summary

During natural transformation, bacterial cells take up free DNA from the environment and incorporate the new genetic material into their genome. Natural transformation is one of the main mechanisms of horizontal gene transfer, leading to the exchange of genetic material between bacterial species. Horizontal gene transfer shapes the genetic pool of bacteria and dramatically affects the spread of antibiotic resistance. During natural transformation in Gram-negative bacteria, the DNA must be transported through two membranes to be incorporated into the genome by homologous recombination. The transport of DNA through the outer membrane is referred to as DNA uptake and is facilitated by the type IV pilus (T4P) machinery. The T4P is a proteinaceous polymeric filament with the ability to elongate and retract by incorporation and disassembly of pilus subunits (pilins) in an ATPase-dependent manner. This process generates one of the strongest mechanical forces observed in nature. Many bacteria utilise the T4P machinery and related structures for motility, adhesion, biofilm formation and DNA uptake. The filament consists of major and minor pilins depending on the relative abundance within the pilus. Thousands of major pilins are incorporated, forming the majority of the fibre, also referred to as the pilus rod, and provide flexible stability to the pilus. Minor pilins get incorporated stochastically along the pilus rod or in a complex located at the tip of the pilus.

In this thesis, we identified five pilus subunits to be essential for natural transformation in *Legionella pneumophila* Philadelphia-1. We identified the DNA receptor FimT, characterised its DNA binding properties and determined its structure using nuclear magnetic resonance spectroscopy. We further showed FimT to be a conserved DNA binding pilin across many *Gammaproteobacteria*. Using cryo-electron microscopy and X-ray crystallography, we determined the pilus rod structure consisting of the major pilin PilA2 essential for competence and the isolated second putative major pilin PilA1, respectively. Only PilA2 filaments were observed on the cell surface. Furthermore, we determined the structure of the minor pilin PilE with major pilin properties thought to be incorporated along the pilus rod or connecting the major and minor pilins at the tip. Lastly, we determined the pilus rod structure of the naturally competent bacterium *Thermus thermophilus* strain HB8, with the highest resolution of a T4P rod to date. Comparison between the determined major pilins and their rods revealed that at least two conserved helical symmetries are found in bacteria leading to an alternative stacking of the surface-exposed globular domains of the subunits. We suggest that the approximate symmetry can be predicted based on the structure of the individual pilin monomers. In addition, our data suggest that no intermolecular salt bridge is present between the conserved residue Glu5 and the amino group of Phe1 in the pilus structures determined here compared to previously determined pilus structures.

Together this thesis furthers our understanding of the architecture of the T4P and revealed a crucial DNA receptor likely responsible for a conserved mode of DNA binding across many bacterial species.

Zusammenfassung

Bakterielle Natürliche Transformation umfasst die Aufnahme von DNA aus der Umgebung, gefolgt von deren Einbau in das bakterielle Genom. Neben bakterieller Transduktion und Konjugation ist Natürliche Transformation einer der wesentlichen Mechanismen, welcher zu Horizontalem Gentransfer führen kann, dem Austausch von genetischem Material zwischen unterschiedlichen Arten. Horizontaler Gentransfer hat einen großen Einfluss auf die Entwicklung des gesamten Genmaterials. Insbesondere wird diesen Mechanismen eine entscheidende Rolle bei der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen und anderen pathogenen Merkmalen zugeschrieben. Während Natürlicher Transformation muss die aufzunehmende DNA in gram-negativen Bakterien zunächst über die äußere und innere Membran transportiert werden, bevor das genetische Material mittels homologer Rekombination in das Erbgut eingebaut werden kann. Der Transport durch die äußere Membran hängt maßgeblich von der Typ IV Pilus Maschinerie ab und wird als DNA-Aufnahme bezeichnet, während der Transport durch die innere Membran durch den Membrankanal ComEC erfolgt und als DNA-Translokation verstanden wird. Der Typ IV Pilus ist ein helikales haarähnliches Filament bestehend aus vielen Untereinheiten (Piline), welche ATPase abhängig in den Pilus eingebaut und aus dem Pilus entfernt werden können. Das Zurückziehen des Pilus stellt eine der stärksten mechanischen Kräfte dar, welche in der Biologie gemessen wurden. Viele Bakterien und Archaeen verwenden Typ IV pili und verwandte Strukturen zur Fortbewegung, Oberflächenwahrnehmung, Adhäsion, Virulenz, Biofilm-Bildung und DNA-Aufnahme. Das Filament besteht aus Hauptpilinen, welche den Großteil des Filaments ausmachen und Nebopilinen, welche nur vereinzelt entlang des Filaments oder als Komplex an der Spitze eingebaut werden.

In dieser Arbeit haben wir fünf Piline identifiziert, welche essenziell für Natürliche Transformation in *Legionella pneumophila Philadelphia-1* Lp02 sind. Unter diesen haben wir das Nebopilin FimT identifiziert, welches in der Lage ist, DNA zu binden, haben dessen Proteinstruktur mittels Kernresonanzspektroskopie gelöst und die Interaktion mit DNA charakterisiert. Wir konnten zeigen, dass FimT von anderen Bakterien ebenfalls DNA binden kann und ein konserviertes DNA-Bindemotiv in vielen *Gamma*proteobakterien besitzt, was für einen konservierten Bindungsmechanismus bei der DNA-Aufnahme spricht. Mittels Kryoelektronenmikroskopie konnten wir die Struktur des helikalen Pilusfilaments lösen, bestehend aus dem für Natürliche Transformation essenziellen Hauptpilin PilA2. Die Struktur eines zweiten Hauptpilins, PilA1 wurde durch Röntgenkristallographie gelöst und zeigt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu PilA2 mit dem es jedoch funktional nicht redundant ist. Die

Struktur des Nebencilins PilE, welches vermutlich vereinzelt entlang des Pilus oder als Verbindungsstück zwischen Pilusfilament und Pilusspitze eingebaut wird, konnten wir ebenfalls mit Kristallographie lösen. Zusätzliche lösten wir die Struktur des Pilusfilaments von *Thermus Thermophilus* HB8 mittels Kryoelektronenmikroskopie. Überraschenderweise konnten wir beim Vergleich zwischen dem Nebencilin PilE von *L. pneumophila* und dem Hauptpilin von *T. thermophilus* große strukturelle Ähnlichkeiten erkennen, was auf eine konservierte Faltung zwischen Pilinen von weit entfernt verwandten Bakterien hindeutet und die Rolle von PilE als Verbindungsstück zwischen Haupt- und Nebencilin unterstreicht.

Wir konnten zudem entscheidende Unterschiede zwischen den helikalen Strukturen von Lp02 und *T. thermophilus* HB8 Filamenten feststellen, sowohl bei den einzelnen Untereinheiten als auch bei der Symmetrie des Filaments. Dies deutet auf mindestens zwei unterschiedliche Arten von Typ IV Pili mit unterschiedlicher Orientierung der oberflächenexponierten Domänen zueinander hin. Zudem konnten die hochaufgelösten Filamentstrukturen die zuvor vorgeschlagene ionische Wasserstoffbrückenbindung zwischen den konservierten Aminosäuren Glu5 und der Aminogruppe von Phe1 widerlegen, welche als essenziell für die Assemblierung des Filaments galt. Zusammengefasst lieferte diese Arbeit wichtige Beiträge zur Architektur und Zusammensetzung von Typ IV pili und zum Verständnis der Typ IV Pilus abhängigen DNA-Aufnahme. Zudem konnten wir einen über *L. pneumophila* hinaus konservierten DNA-Rezeptor in vielen bakteriellen Arten identifizieren.