



Doctoral Thesis

## The role of Fiml protein in the assembly of type 1 pilus from *Escherichia coli*

**Author(s):**

Ignatov, Oleksandr V.

**Publication Date:**

2009

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006027202> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO.18523

**The role of FimI protein in the assembly of type 1 pilus from**  
***Escherichia coli***

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

**DOCTOR OF SCIENCES**

presented by

**Oleksandr Vasilievich Ignatov**

Ms.sc. in Biochemistry (Kharkiv National University, Ukraine)

born on July 3, 1980

citizen of Ukraine

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Rudi Glockshuber

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt

2009

## SUMMARY

Type 1 pili represent one of the most abundant surface structures both in pathogenic and non-pathogenic Gram-negative bacteria. These rigid, highly oligomeric, proteinaceous appendages, anchored to the outer bacterial membrane, serve as extremely efficient adhesion tools for bacteria inhabiting diverse environments, including biotic and abiotic surfaces. Type 1 pili are present in at least 90% of all known uropathogenic strains of *Escherichia coli* (UPEC), which are in turn the main cause of urinary tract infections (UTIs) in humans.

The assembly of type 1 pili is a paradigm of the general “chaperone/usher pathway”, in which the periplasmic chaperone FimC and the assembly platform (“usher”) FimD in the outer membrane are strictly required for pilus assembly. FimC prevents aggregation of the individual pilus subunits, catalyzes their folding and delivers them to the outer membrane, while FimD controls the temporal and spatial order of the assembly events and directly accelerates pilus subunit polymerization. While the process of pilus assembly initiation and the subsequent polymerization steps have been thoroughly investigated, the question of how the assembly is terminated had so far been only poorly understood.

The goal of this thesis was to investigate the final phase of type 1 pilus assembly, with the main focus on the role of the subunit FimI, which had not been detected as a component of type 1 pili. First, it was found that deletion of the gene encoding FimI resulted in the release of pili into the culture medium, as detected by electron microscopy and immunoblotting. This was the first experimental evidence that *fimI* is required for anchoring type 1 pili to the outer membrane. Based on this result, we assumed that FimI it is also the last subunit to be incorporated into pilus and that a single copy of FimI terminates pilus assembly. To test this hypothesis, the influence of increased periplasmic FimI concentrations on the morphology of type 1 pili was investigated. It was found that *fimI* overexpression *in vivo* suppresses the assembly of pilus fibers. Furthermore, FimI terminates FimD-catalyzed *in vitro* polymerization of

FimA, the main structural pilus subunit, both when present from the very beginning or added during the assembly reaction.

Finally, the “kinetic lock” model was proposed as a mechanism for type 1 pilus termination and anchoring to the outer membrane. Based on the assumption that the chaperone FimC caps the last subunit of the growing pilus and thereby prevents pilus release to the culture medium, we compared the kinetics of FimC dissociation from FimI in the absence and presence of the major subunit FimA, the subunit that directly interacts with FimI. It was found that the rate of FimC dissociation from the FimC:FimI binary complex ( $t_{1/2} = 71 \pm 5$  s) is about 200-fold faster than that from the ternary FimC:FimI:FimA complex ( $t_{1/2} = 4.0 \pm 0.3$  h). This considerable difference suggests that FimI binding to the last FimA subunit at the pilus base locks FimC in a FimI-bound conformation, which not only prevents incorporation of new subunits into the pilus, but also quarantees stable anchoring of the pilus to the outer membrane.

In addition, the three-dimensional structure of the FimC:FimI:FimA ternary complex was determined at 2.8Å resolution. Its crystallographic analysis and comparison with the modeled FimC:FimA:FimA<sub>t</sub> complex revealed a structural basis for the kinetic lock, *i.e.*, direct contacts between FimC and FimA enforced by FimI that prevent FimC dissociation from the ternary complex. These contacts (including one salt bridge between Arg38 of FimA and Glu62 of FimC) are only possible because the donor strand of FimI is flexible in its proximal part, in contrast to the donor strand of FimA. This flexibility permits the choice of an energetically more favorable subunit:subunit orientation, while this orientation is sterically forbidden in the modeled FimC:FimA:FimA<sub>t</sub> complex.

Overall, the results revealed two key aspects of type 1 pilus structure and biogenesis, both mediated by the so-far little understood FimI subunit: termination of assembly and stable pilus anchoring to the bacterial outer membrane.

## ZUSAMMENFASSUNG

Typ 1 Pili stellen, sowohl in pathogenen als auch nicht-pathogenen Gram-negativen Bakterien, eine der häufigsten Oberflächenstrukturen dar. Diese starren, hoch-oligomeren, proteinösen Anhängsel sind in der äusseren Membran der Bakterien verankert. Sie stellen für die Bakterien äusserst effiziente Werkzeuge zur Anheftung an sowohl biotische als auch abiotische Oberflächen dar. Typ 1 Pili werden bei mindestens 90 % aller bekannten uropathogenen Stämme von *Escherichia coli* (UPEC) gefunden, die ihrerseits wiederum Hauptursache für Harnwegsinfektionen des Menschen sind.

Der Zusammenbau von Typ 1 Pili stellt ein Musterbeispiel für den allgemeinen, im englischen als „chaperone-usher pathway“ bezeichneten Assemblierungsmechanismus dar wobei der periplasmatische Faltungshelfer FimC und die Assemblierungsplattform („usher“) FimD essentiell für den Zusammenbau der Pili sind. FimC verhindert die Aggregation einzelner Pilusuntereinheiten, katalysiert ihre Faltung und dirigiert sie zur äusseren Membran während FimD die zeitliche und räumliche Reihenfolge der Assemblierungsschritte kontrolliert und die Polymerisierung der Untereinheiten direkt beschleunigt. Während der Prozess der Initiation des Zusammenbaus der Pili und die nachfolgenden Polymerisierungsschritte bereits gründlich untersucht wurden, blieb die Frage wie die Assemblierung beendet wird bisher wenig verstanden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der abschliessenden Phase des Pilus-Zusammenbaus mit dem Hauptaugenmerk auf der Funktion der Untereinheit FimI, die bisher nicht als Bestandteil von Typ 1 Pili nachgewiesen werden konnte. Zunächst konnte mittels Elektronenmikroskopie und Immunoblotting gezeigt werden, dass eine Deletion des FimI-kodierenden Gens zu einer Freisetzung der Pili in das Kulturmedium führt. Dies war der erste experimentelle Hinweis darauf, dass FimI zur Verankerung der Pili in der äusseren Membran benötigt wird. Von diesem Ergebnis ausgehend nahmen wir an, dass FimI die letzte, in den Pilus eingebaute Untereinheit

darstellt und dass ein einziges FimI-Molekül den Zusammenbau eines jeden Pilus beendet. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde der Einfluss erhöhter periplasmatischer FimI-Konzentrationen auf die Pilusmorphologie untersucht. Es stellte sich heraus, dass eine Überexpression von *fimI in vivo* den Pilus-Zusammenbau unterdrückt. Weiterhin war FimI in der Lage, die FimD-katalysierte Polymerisierung von FimA (der Hauptuntereinheit der Pili) *in vitro* zu unterbinden und zwar unabhängig davon ob FimI von Beginn an oder erst im Verlauf der Polymerisierungsreaktion zugegeben wurde.

Schliesslich wurde das Modell des „kinetischen Schlosses“ für den Mechanismus des Beendens der Piluspolymerisierung und für die Verankerung in der Membran eingeführt. Basierend auf der Annahme, dass der Faltungshelfer FimC an der letzten Untereinheit des wachsenden Pilus gebunden bleibt und somit eine Freisetzung der Pili in das Kulturmedium verhindert, wurden die Kinetiken der FimC-Dissoziation von FimI in An- bzw. Abwesenheit von FimA untersucht, der Pilusuntereinheit, die direkt mit FimI interagiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der FimC-Dissoziation im binären FimC:FimI-Komplex ( $t_{1/2} = 71 \pm 5$  s) etwa 200mal grösser ist als im ternären FimC:FimI:FimA-Komplex ( $t_{1/2} = 4.0 \pm 0.3$  h). Dieser beträchtliche Unterschied impliziert, dass die Bindung von FimI an die zuletzt in den Pilus eingebaute FimA-Untereinheit FimC in einer FimI-gebundenen Konformation festhält wodurch nicht nur der Einbau weiterer Untereinheiten in den Pilus verhindert sondern auch die stabile Verankerung in der Membran sichergestellt wird.

Desweiteren wurde die dreidimensionale Struktur des ternären FimC:FimI:FimA-Komplexes mit einer Auflösung von 2.8 Å gelöst. Die kristallographische Analyse und der Vergleich mit einer Modellstruktur des FimC:FimA:FimA<sub>n</sub>-Komplexes lieferten eine strukturelle Basis für das „kinetische Schloss“ in Form direkter, durch FimI erzwungene Wechselwirkungen zwischen FimC und FimA, die die FimC-Dissoziation im ternären Komplex verhindern. Diese Wechselwirkungen (bspw. ein Salzbrücke zwischen Arg38 von FimA und Glu62 von FimC) sind nur möglich, weil der Donorstrang von FimI – im Gegensatz zum Donorstrang von FimA – in seinem

proximalen Teil flexibel ist. Diese Flexibilität ermöglicht das Einnehmen einer energetisch günstigeren Untereinheit:Untereinheit-Orientierung, die in der Modellstruktur des FimC:FimA:FimA<sub>t</sub>-Komplexes sterisch nicht möglich ist.

Die hier vorgestellten Ergebnisse offenbaren zwei wichtige Aspekte der Struktur und Biogenese von Typ 1 Pili, die beide durch die bis dato wenig verstandene Untereinheit FimI vermittelt werden: Beendigung der Polymerisierung und stabile Verankerung in der äusseren Membran der Bakterien