

# Structure and function of the lectin FimH from Escherichia coli

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Eras, Jonathan

**Publication date:**

2017

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010872712>

**Rights / license:**

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

DISS. ETH NO. 24155

**STRUCTURE AND FUNCTION OF THE LECTIN FIMH FROM ESCHERICHIA COLI**

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

presented by

**JONATHAN ERAS**

*M.Sc. in Biochemistry, TU Munich*

born on 17.03.1986

citizen of *Germany*

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Rudi Glockshuber, examiner*  
*Prof. Dr. Eilika Weber-Ban, co-examiner*  
*Prof. Dr. Julia Vorholt, co-examiner*  
*Prof. Dr. med. Olivier Devuyst, co-examiner*

2017

## SUMMARY

Adhesive type 1 pili of uropathogenic *Escherichia coli* strains are filamentous, extracellular protein complexes that enable bacterial attachment to epithelial cells of the urinary tract. Adhesion to the epithelium is mediated by the lectin FimH at the tip of type 1 pili. FimH is a two-domain protein. It consists of a lectin domain (FimH<sub>L</sub>) that binds terminal mannoses in N-linked glycans on epithelial target receptors, and a pilin domain (FimH<sub>P</sub>) that interacts with the lectin domain and anchors FimH to the rest of the pilus. The subunits in the pilus are linked non-covalently by a mechanism in which the incomplete immunoglobulin-like fold of the pilin domain is complemented by an N-terminal peptide extension, called donor strand (Ds), of the successive subunit. FimH shows the remarkable ability to increase its apparent affinity to target glycans when its domains become separated under tensile mechanical force. The main goal of the thesis was to elucidate this mechanism by a comprehensive structural analysis and by comparing the ligand binding dynamics of the isolated lectin domain (FimH<sub>L</sub>) with those of the full-length protein using *n*-heptyl  $\alpha$ -D mannopyranoside (HM) as a model ligand.

We first established an experimental system to produce a stable FimH monomer with the properties of FimH in the context of the assembled pilus. For this purpose, the complex between FimH and the pilus assembly chaperone FimC was purified and mixed with an excess of a synthetic peptide (DsG) that corresponds to the N-terminal extension of the subsequent pilus subunit FimG. After displacement of FimC by DsG, the resulting FimH-DsG complex could be purified in milligram quantities. Comparison of the kinetics of ligand binding and dissociation of FimH<sub>L</sub> (representing the domain-separated state of FimH under tensile mechanical force) and FimH-DsG revealed that the isolated lectin domain binds HM with a 3300-fold higher affinity compared to full-length FimH. This dramatic difference in affinity primarily resulted from a more than 100'000-fold slower dissociation of HM from FimH<sub>L</sub> compared to full-length FimH, with dissociation half-lives of 58 minutes for FimH<sub>L</sub> compared to 30 milliseconds for full-length FimH. The solved X-ray structures of FimH-DsG in the absence and presence of the ligand HM demonstrated that the interactions between the pilin and the lectin domain are not affected by ligand binding and intramolecularly catalyze spontaneous ligand release in full-length FimH. In contrast, the X-ray

## SUMMARY

---

structure of the FimH<sub>L</sub>-HM complex showed that the FimH<sub>L</sub> surface loops interacting with the pilin domain underwent large conformational changes that no longer allow the interaction between FimH<sub>L</sub> and the pilin domain. This was confirmed by the X-ray structure of the domain separated state of a variant of full-length FimH in complex with HM. The results showed that domain separation in FimH only occurs under mechanical stress, allowing bacterial movement along the urinary epithelium in the absence of mechanical force.

The results of the first part predicted that FimH variants with weakened interdomain-interactions should show higher ligand binding affinities. In the second part of the thesis, mutations were introduced into FimH to generate variants of full-length FimH in which the domain-separated state is favored. This was achieved with two strategies. First, by introducing single amino acid replacements into the FimH pilin domain that were predicted to disturb the domain interactions, and second, by amino acid insertions in the linker region between the domains. As predicted, two FimH variants with the amino acid substitutions Ala188Asp or Ala188Trp in the pilin domain showed a 10- to 20-fold increase in affinity to HM, while the affinity increased up to 2100-fold with increasing number of inserted residues in the linker between the FimH domains. The results could be confirmed qualitatively by recording the free energy of domain interaction in the FimH variants, revealing that affinity for HM increased with decreasing interaction energy.

In the third part of the thesis it could be shown that the glycoprotein uromodulin (Tamm-Horsfall protein), the most abundant protein in human urine, is a natural ligand of FimH. Uromodulin thus most likely contributes to protection against urinary tract infections by competing with urinary epithelium cells for binding to FimH. Kidney cells secrete uromodulin as a filamentous oligomer that is highly glycosylated. The uromodulin fibers were purified and showed a binding stoichiometry of two to three FimH<sub>L</sub> molecules per uromodulin monomer with an apparent dissociation constant of  $(4.0 \pm 1.0) \cdot 10^{-7}$  M. The three-dimensional architecture of uromodulin filaments was investigated with cryo-electron tomography. The results indicate that the fibers adopt a regular zigzag architecture in which successive monomers are rotated by 180° relative to each other and the C-terminal ZP domain of uromodulin forms the core of the fibril.

## ZUSAMMENFASSUNG

Adhesive Typ 1 Pili von uropathogenen *Escherichia coli* Stämmen sind filamentöse, extrazelluläre Proteinkomplexe, die es Bakterien ermöglichen, sich an Epithelzellen im Harntrakt von Wirtsorganismen zu binden. Die Anheftung der Bakterien an das Epithelgewebe wird durch das Lektin FimH an der Spitze von Typ 1 Pili vermittelt. FimH besitzt zwei Domänen: eine Lektin-Domäne (FimH<sub>L</sub>), die an terminale Mannose Reste von N-Glykanen der Zielrezeptoren des Epithels bindet, und eine Pilin-Domäne (FimH<sub>P</sub>), die mit der Lektin-Domäne interagiert und FimH mit dem Rest des Pilus verbindet. Die Untereinheiten im Pilus sind über einen nicht-kovalenten Mechanismus miteinander liiert. Dabei wird die zunächst unvollständige Faltung einer Untereinheit durch einen kurzen N-terminalen Abschnitt der folgenden Untereinheit, den Donorstrang, vervollständigt. FimH zeigt die erstaunliche Eigenschaft einer erhöhten Affinität zu Zielglycanen bei Trennung seiner beiden Domänen unter mechanischer Zugkraft. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist es, diesen Mechanismus aufzuklären: einerseits durch eine umfassende strukturelle Charakterisierung, andererseits durch einen Vergleich der Ligandenbindungs-Dynamik der isolierten Lektin-Domäne (FimH<sub>L</sub>) und des Volllängen-Proteins zu einem Modell-Liganden, *n*-heptyl  $\alpha$ -D Mannopyranosid (HM).

Dazu wurde zunächst ein experimentelles System für die Herstellung eines stabilen FimH Monomers etabliert, das sich nicht von FimH im natürlichen Zustand an der Spitze von Pili unterscheidet. Zu diesem Zweck wurde der Komplex zwischen FimH und seinem Assemblierungshelfer FimC (Chaperon) gereinigt und mit einem Überschuss des synthetischen Peptides (DsG) gemischt, das die N-terminale Verlängerung der folgenden Untereinheit FimG darstellt. Nach Verdrängung des Chaperons durch DsG konnte der resultierende FimH-DsG-Komplex in großen Mengen gereinigt werden. Ein Vergleich der Kinetiken der Ligandenbindung und Dissoziation der FimH<sub>L</sub>-Domäne, die den Domänen getrennten Zustand von FimH unter mechanischer Zugkraft darstellt, mit FimH-DsG zeigte, dass die isolierte Lektin-Domäne HM mit einer um den Faktor 3300 höheren Affinität im Vergleich zum Volllänge-FimH bindet. Dieser außerordentlich große Unterschied der Affinitäten kommt daher, dass HM von FimH<sub>L</sub> um fünf Größenordnungen langsamer dissoziiert im Vergleich zum Volllänge-FimH. Dabei ergeben sich Halbwertszeiten der

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Dissoziation von 58 Minuten für FimH<sub>L</sub> im Vergleich zu 30 Millisekunden für das Volllänge-FimH. Die gelösten Kristallstrukturen von FimH·DsG mit und ohne gebundenen Liganden HM verdeutlichen, dass die Wechselwirkungen zwischen der Pilin Domäne und der Lektin Domäne nicht durch die Ligandenbindung beeinflusst werden. Diese Wechselwirkungen katalysieren im Volllänge-FimH die spontane Ablösung des Liganden. Im Gegensatz dazu zeigte die Kristallstruktur des FimH<sub>L</sub>·HM Komplexes, dass flexible Bereiche von FimH<sub>L</sub>, die mit der Pilin Domäne interagieren, große konformationelle Änderungen aufweisen und dadurch die Wechselwirkung zwischen FimH<sub>L</sub> und der Pilin Domäne nicht mehr möglich war. Dies konnte durch die Kristallstruktur einer Variante des Volllänge-FimH in Komplex mit HM, bei der die beiden Domänen getrennt waren, bestätigt werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Trennung der Domänen in FimH nur unter mechanischer Zugkraft erreicht werden kann. Dies ermöglicht die Fortbewegung von Bakterien entlang des Harnepitheliums in Abwesenheit mechanischer Zugkräfte.

Die Ergebnisse des ersten Teils lassen die Vorhersage zu, dass FimH Varianten mit geschwächter Wechselwirkung zwischen den Domänen höhere Affinitäten zu Liganden aufweisen sollten. Im zweiten Teil der Arbeit wurden Mutationen in FimH eingefügt, um Volllänge-Varianten von FimH zu erzeugen, die den Domänen-getrennten Zustand darstellen. Dies wurde durch zwei Strategien umgesetzt. Einerseits wurden einzelne Aminosäurereste, die einen Einfluss auf die Domänenwechselwirkung haben sollten, in der Pilin Domäne von FimH ausgetauscht, andererseits wurden Konstrukte hergestellt, bei denen Aminosäuren zwischen beide Domänen eingefügt wurden. Die Vorhersage wurde bestätigt. Zwei FimH Varianten, bei denen die Aminosäuren von Ala 188 zu Asp oder Ala 188 zu Trp in der Pilin Domäne ausgetauscht wurden, zeigten 10- bis 20-fach höhere Affinitäten zu HM, während die Affinität mit zunehmender Anzahl eingefügter Reste in der Linkerregion zwischen den beiden FimH Domänen um das bis zu 2100-fache zunahm. Diese Ergebnisse konnten qualitativ durch die Bestimmung der freien Energie der Domänen-Wechselwirkung der Varianten bestätigt werden, da die Affinität zu HM mit verminderter Wechselwirkungsenergie stärker wurde.

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Im dritten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Glykoprotein Uromodulin (Tamm-Horsfall-Protein), das in großen Mengen im menschlichen Urin vorkommt, ein natürlicher Ligand von FimH ist. So beugt Uromodulin möglicherweise Harnwegsinfektionen vor, indem es mit Epithelzellen im Harntrakt um die Bindung von FimH konkurriert. Nierenzellen sekretieren Uromodulin als hoch-glykosiliertes Filament. Diese Uromodulin Fibrillen wurden gereinigt und eine Bindungsstöchiometrie von drei bis vier FimH<sub>L</sub> Molekülen pro Uromodulin-Monomer mit einer apparenten Dissoziationskonstante von  $(4.0 \pm 1.0) \cdot 10^{-7}$  M bestimmt. Der dreidimensionale Aufbau von Uromodulin Filamenten wurde mittels Elektronenkryotomographie untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Fibrillen eine regelmäßige Zickzack Anordnung zeigen, bei der Monomere um 180° entlang der Achse gegeneinander rotieren und dass die C-terminalen ZP Domänen von Uromodulin den Kern der Fibrillen bilden.