



Doctoral Thesis

Structure and Mechanism of Bacterial Contractile Nanomachines

Author(s):

Medeiros, João M.

Publication Date:

2018

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000314303> →

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. 25541

Structure and mechanism of bacterial contractile nanomachines

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

João Miguel da Costa Medeiros

MSc in Biological Engineering, Universidade Técnica de Lisboa

born on 19.05.1987

citizen of Portugal

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin Pilhofer (examiner)

Prof. Dr. Takashi Ishikawa (co-examiner)

Prof. Dr. Leo Eberl (co-examiner)

2018

Summary

A class of bacterial nanomachines, known as contractile injection systems, has been found to mediate cell-cell interactions in pathogenicity, competition between bacterial species, cooperation within the same species and symbiotic relationships with eukaryotic organisms. The complexity and size of these systems renders their structural determination by conventional means difficult. Electron cryo-tomography, however, has the power to solve the structure of such large macromolecules embedded in their native cellular context.

One main limitation of electron cryo-tomography is its restriction to thin samples, such as the edges of eukaryotic cells or small bacteria. Larger samples require a thinning preparation step prior to imaging. Cryo-focused ion beam milling was recently proposed as a sample thinning method with major advantages over conventional cryo-sectioning approaches. Nevertheless, all published protocols to date relied on customized equipment and failed to agree on the optimal settings for each step.

This thesis reports the implementation of a new robust cryo-focused ion beam milling workflow (**chapters 2 and 3**) that does not require custom-made hardware and can routinely produce high quality samples for electron cryo-tomography. All technical details and operational parameters are shared to facilitate its dissemination and proof-of-concept data is shown for various model organisms.

A second goal of this thesis was to apply the developed methods to advance our understanding of cell-cell interactions mediated by bacterial contractile injection systems. By milling a eukaryotic host while infected with a bacterial symbiont, it was possible to show the *in situ* structure of a novel contractile injection system (**chapter 4**), as well as establish its role in mediating bacterial escape from the phagosome. We then used subtomogram averaging to recover a medium resolution reconstruction of the injection system in its extended and contracted state, allowing for a detailed analysis of its novel structural components.

A marine bacteria species and a tubeworm larva shared another previously known cell-cell interaction of interest. Earlier work showed that these bacteria produced arrays of contractile injection structures that served as a cue to induce

the metamorphosis of the larvae into their adult state. However, it was unclear whether this mechanism depended on any effector or mechanical action. By studying these metamorphosis associated contractile arrays by tomography (**chapter 5**), it was possible to link a proteinaceous effector to the inducement of metamorphosis in marine organisms for the first time. This study also showed the packing of effector molecules into the lumen of the inner tube, opening the possibility for engineering a delivery system in the future.

Zusammenfassung

Eine Klasse bakterieller Nanomaschinen, bekannt als kontraktile Injektionssysteme, wurde als Vermittler von Zell-Zell-Interaktionen in Pathogenität, Wettbewerb zwischen bakteriellen Spezies, Kooperation innerhalb derselben Spezies und symbiotischen Beziehungen mit eukaryotischen Organismen, beschrieben. Die Komplexität und Größe dieser makromolekularen Systeme erschwert die Bestimmung ihrer Struktur mit konventionellen Methoden. Kryo-Elektronentomographie, hingegen, ermöglicht die Bestimmung der Strukturen von solch großen Makromolekülen umhüllt von ihrer natürlichen, zellulären Umgebung.

Eine Hauptlimitierung für Kryo-Tomographie ist die Beschränkung auf dünne Proben, wie die Ränder von eukaryotischen Zellen oder kleine Bakterien. Größere Proben benötigen zunächst einen Dünnungsschritt vor der Abbildung durch Elektronenmikroskopie. Ein fokussierter Ionenstrahl unter Kryo-Bedingungen wurde vor Kurzem als eine Methode zur Probendünnung vorgeschlagen, die große Vorteile gegenüber konventionellen Kryo-Ultradünnschnittmethoden aufweist. Dennoch setzen alle zuvor publizierten Protokolle spezialangefertigte Komponenten voraus und können sich nicht auf optimale Einstellungen für jeden Schritt einigen.

Diese Arbeit berichtet die Implementierung eines neuen, robusten Arbeitsablaufes für die Nutzung eines fokussierten Ionenstrahls unter Kryo-Bedingungen zur Probendünnung (**Kapitel 2** und **3**), der keine spezialangefertigten Komponenten verwendet und regelmäßig qualitativ hochwertige Proben für Kryo-Elektronentomographie produziert. Alle technischen Details und Operationsparameter wurden veröffentlicht, um die Verbreitung der Methode zu ermöglichen, und erste Ergebnisse für eine Reihe von Modellorganismen wurden gezeigt.

Ein zweites Ziel dieser Arbeit war es die entwickelten Methoden anzuwenden, um unser Verständnis von Zell-Zell-Interaktionen, vermittelt durch bakterielle, kontraktile Injektionssysteme, zu fördern. Durch die Dünnung eines eukaryotischen Wirtes, infiziert mit einem bakteriellen Symbionten, war es möglich, die In-Situ-Struktur eines neuartigen, kontraktilen Injektionssystems (**Kapitel 4**) und dessen Rolle im Ausbruch des Bakteriums aus dem Phagosom zu zeigen. Wir verwendeten anschließend „Subtomogram averaging“, um eine Rekonstruktion mittlerer Auflösung des Injektionssystems in dessen längeren

und kontrahierten Zustand zu erhalten, was die detaillierte Analyse neuer struktureller Komponenten ermöglichte.

Ein Meeresbakterium und ein Kalkröhrenwurm teilen eine weitere interessante, zuvor bekannte Zell-Zell-Interaktion. Eine vorangegangene Arbeit hat gezeigt, dass diese Bakterien Komplexe aus kontraktilen Injektionssystemen produzieren, die als Signal zur Induktion der Metamorphose der Wurmlarven zu ihrer ausgewachsenen Form dienen. Durch die Untersuchung dieser Metamorphose-assoziierten kontraktilen Komplexe durch Tomographie (**Kapitel 5**), war es möglich zum ersten Mal einen Proteineffektor mit der Induktion der Metamorphose eines Meeresorganismus zu verbinden. Diese Studie gab zusätzlich Hinweise auf die Ladung des Effektors in das Lumen der inneren Röhre, was das Design einer neuen Verabreichungsform in der Zukunft ermöglichen könnte.