

DISS. ETH No. 18818

**Selectivity of Subunit Association in the Assembly of
Adhesive Type 1 Pili from *Escherichia coli***

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Florian Sven Nico Dworkowski

M.Sc., The University of Oklahoma

Born on March 31st, 1978

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Rudi Glockshuber

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt

2010

1 Abstract

Many pathogenic, gram-negative bacterial cells exhibit outer membrane attached macromolecular, filamentous surface organelles, called pili or fimbriae. Pili are crucial for cell adhesion to the host during infection and thus are considered a veritable drug target. Pili are highly oligomeric protein structures assembled via a common mechanism called the chaperon/usher pathway. Unfolded subunit proteins are captured by a folding chaperone which also mediates transfer of the subunit to an outer membrane assembly platform, the usher, where the subunits are incorporated into the growing fimbriae and translocated through a pore in the usher into the extra-cellular space where it adopts its final quaternary structure. The interaction between the subunits in the mature pilus is based on an N-terminal extension of the adjacent subunit acting in completing an incomplete Ig-like fold of the preceding subunit. This “donor-strand complementation” provides some of the most stable protein:protein interactions known to date. Another striking feature of the pili is that the various subunit proteins are incorporated into the organelle in a defined, strict order.

This thesis concerns the question of how this stringent order of pilus formation is achieved. As a model system the type 1 pilus system, involved in the infection of the human urinary tract by uropathogenic *Escherichia coli* strains, was used. Type 1 pili consist of up to three thousand main structural subunits, called FimA, comprising the helical pilus rod. The adhesin FimH at the distal end of the fibrillum is linked to the rod via the linker proteins FimG and FimF. Except for the adhesin, which has a receptor binding and pilin domain, all subunits are single-domain proteins exhibiting an incomplete Ig-like fold. The chaperone protein in the type 1 pilus system is FimC and the outer-membrane usher is called FimD. Recently another subunit, FimI, responsible for termination of pilus growth, was identified.

By investigation of the kinetic stability of various subunit:donor-strand (ds) complexes we could show that the natural subunit:ds combinations were most stable, albeit the subunits also formed stable complexes with other ds peptides. The stability against unfolding of the natural subunit:ds complexes was so high that it can be assumed these complexes do not dissociate once formed. The assessment of the rates of complex formation yielded similar results, the natural complexes were formed fastest, but other complexes could form as well. From the kinetic data obtained on the different subunit:ds interactions, the probability of spontaneous formation of a mature type 1 pilus, consisting of 500 FimA subunits and one copy of FimH,

FimG, FimF and FimI, with the correct subunit order was calculated to be $1 : 5.2 \cdot 10^{292}$, assuming identical initial subunit concentrations. Consequently, a very efficient proofreading system exists that governs quaternary structure formation in type 1 pili.

Indeed this task is fulfilled by the outer-membrane usher. The N-terminal, periplasmic domain of the usher, FimD_N, was previously shown to bind to the FimC:subunit complexes and the ternary complex FimC:FimH_p:FimD_N was crystallized. It was postulated that FimD_N distinguishes between chaperone bound subunits by binding each FimC:subunit complex with different affinity. To investigate this further, the ternary complex FimC:FimF_t:FimD_N was crystallized. The X-ray structure of the complex confirmed that FimD_N discriminates between different FimC-bound subunits through specific contacts via its N-terminal tail (residues 1-24 of FimD), that adopts a defined structure in the ternary complexes, but is flexibly disordered in free FimD_N. However, the affinities of FimD_N for the different chaperone:subunit complexes do not differ by more than 40-fold. Consequently the formation of correct subunit:subunit contacts is mainly determined by the ability of the usher FimD to selectively catalyze formation of correct subunit:donor-strand pairs.

2 Zusammenfassung

Viele krankheitserregende, gram-negative Bakterien besitzen an der Oberfläche ihrer äusseren Membran fadenförmige, makromolekulare Oberflächenstrukturen, so genannte Pili oder Fimbriae. Diese Pili sind essentiell für die Zell-Adhäsion an das Gewebe des Wirts bei Infektionen und gelten daher als vielversprechendes Ziel im drug-targeting. Pili sind hetero-oligomere Proteinstrukturen, welche mittels des so genannten Chaperone/Usher-Pathway gebildet werden. Ungefaltete Untereinheitenproteine werden von einem Faltungshelferprotein, dem Chaperone, gebunden und zur Assemblierungsplattform in der äusseren Membran transportiert, dem so genannten Usher, wo diese in den wachsenden Pilus integriert und aus der Zelle transportiert werden, wo sie ihre endgültige Struktur annehmen. Die Interaktion zwischen den Untereinheitenproteinen im ausgewachsenen Pilus wird dabei durch die Aufnahme eines verlängerten Aminosäurenstranges am N-terminalen Ende der einzuarbeitenden Untereinheit in die vorhergehende Untereinheit erreicht. Dabei wird die unvollständige, Ig-ähnliche Struktur des Vorgängermoleküls von der nachfolgenden Untereinheit vervollständigt. Diese „donor-strand complementation“ gilt als eine der stärksten bekannten Protein-Protein Wechselwirkung.

Pili besitzen ausserdem die bemerkenswerte Eigenschaft, dass die verschiedenen Untereinheitenmoleküle in einer ganz bestimmten, strikten Reihenfolge in die Struktur eingearbeitet werden.

In dieser Dissertation wird die Frage adressiert, wie diese strikte Ordnung erlangt wird. Als Modellsystem dient das Type 1 Pilus System, welches eine wichtige Rolle in der Infektion von menschlichen Harnwegen durch uropathogene *Escherichia coli*-Stämme spielt. Type 1 Pili bestehen aus bis zu dreitausend Einheiten der hauptstrukturellen Untereinheit FimA, welche den helixförmigen Pilus-Stamm bilden. Das Adhäsion FimH ist über die Verbindungproteine FimG und FimA mit dem Stamm verbunden. Ausser dem Adhäsion, welches sowohl eine Rezeptorbindungs- als auch eine Pilin-Domäne besitzt, bestehen alle Untereinheitenproteine aus einer einzelnen Domäne und besitzen eine unvollständige Ig-ähnliche Faltung. Im Type 1 System wirkt das Protein FimC als Chaperone und das Protein FimD fungiert als Usher in der äusseren Membran. Kürzlich wurde auch ein weiteres Untereinheitenprotein, FimI, beschrieben, welches das Piluswachstum terminiert.

Durch die Untersuchung der kinetischen Stabilität verschiedener Untereinheiten:Donor-strand (ds)-Komplexe waren wir in der Lage zu zeigen, dass die intrinsischen Komplexe die höchste Stabilität aufwiesen. Allerdings bildeten die Untereinheitenproteine auch Komplexe mit nicht vorgesehenen Bindungspartnern. Die Entfaltungsresistenz der natürlichen Komplexe ist dabei so hoch, dass diese nicht mehr dissoziieren wenn sie sich einmal gebildet haben.

Die Erhebung der Raten der Bildung der Komplexe ergab ähnliche Ergebnisse. Die natürlichen Komplexe bildeten sich am schnellsten, allerdings wurden auch die nicht-natürlichen Komplexe gebildet. Mit Hilfe der kinetischen Daten, die für verschiedenen Untereinheiten:Donor-strand Komplexe bestimmt wurden, ist es möglich die Wahrscheinlichkeit für die spontane Ausbildung eines vollständigen Pilus mit der korrekten Sequenz an Untereinheiten, bestehend aus 500 FimA-Untereinheiten und je einer Untereinheit FimH, FimG, FimF and FimI, zu berechnen. Unter der Annahme, dass kein bisher noch unbekannter, zusätzlicher Selektionsmechanismus vorhanden ist, wurde diese Wahrscheinlichkeit, unter der Voraussetzung, dass alle Untereinheitenproteine in gleicher Ausgangskonzentration vorliegen, als $1:5.2 \cdot 10^{292}$ bestimmt. Dies bedeutet im Wesentlichen, dass ohne ein weiteres Kontrollsystem keine Pili gebildet werden.

Diese Aufgabe erfüllt das Usherprotein in der äusseren Membran. Es wurde zuvor gezeigt, dass die N-terminale, periplasmatische Domäne des Ushers in der Lage ist die Chaperone:Untereinheiten-Komplexe zu binden und der ternäre Komplex FimC:FimH_p:FimD_N wurde kristallisiert. Es wurde postuliert, dass FimD_N gezielt Chaperone:Untereinheiten-Komplexe unterscheidet, indem es die Komplexe mit unterschiedlicher Affinität bindet. Um dies zu verifizieren wurde der ternäre Komplex FimC:FimF_t:FimD_N kristallisiert. Die Röntgenstruktur dieses Komplexes bestätigte das FimD_N die verschiedenen FimC-gebundenen Untereinheiten durch spezifische Kontakte seiner 24 N-terminalen Aminosäuren, welche nur im ternären Komplex eine definierte Struktur aufweisen und in freiem FimD_N ungeordnet sind, auswählen kann. Allerdings weichen die Affinitäten von FimD_N für verschiedene Chaperone:Untereinheiten-Komplexe nur um maximal das 40-fache voneinander ab. Hieraus folgt, dass die korrekten Untereinheit:Untereinheit-Kontakte hauptsächlich durch die Fähigkeit des Ushers, selektiv die Bildung von korrekten Untereinheiten:Donor-strand-Paaren zu katalysieren, bestimmt wird.