

## Zelloberflächenstrukturen

# Wie Archaeen Kontakt mit der Umwelt aufnehmen

SONJA-VERENA ALBERS, ANNA-LENA HENCHE  
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR TERRESTRICHE MIKROBIOLOGIE, MARBURG

### VAAM-Forschungspreis 2012

Members of the third domain of life, the Archaea, exhibit a number of different cell surface structures which are similar in assembly and function to bacterial type IV pili. These pili have been shown to be involved in processes like attachment, motility, and the exchange of DNA in Archaea. Intriguingly, the archaeal flagellum, called the archaeellum, functionally resembles the bacterial flagellum, although it is structurally alike type IV pili.

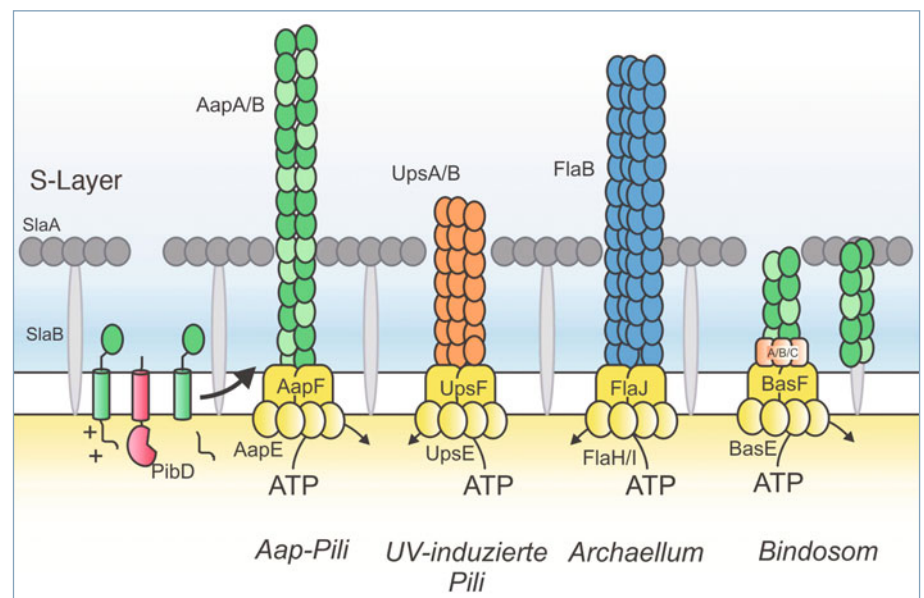
DOI: 10.1007/s12268-012-0193-9  
© Springer-Verlag 2012

■ Die Zelloberfläche der meisten Archaeen besteht aus einem zweidimensionalen Proteinkristall, dem S-Layer (*surface layer*). Das S-Layer verleiht den Zellen Stabilität, da sie keine Zellwand besitzen, wie sie für Bakterien typisch ist. Zwar besitzen methanogene Archaeen Peptidoglykan, dieses gleicht aber nicht dem Murein der Bakterien, sondern besteht aus „Pseudomurein“. Ein zweites Merkmal archaeeller Zellen sind die Etherlipide, die die Membran formen, anders als die Esterlipide in Bakterien und Eukaryoten [1].

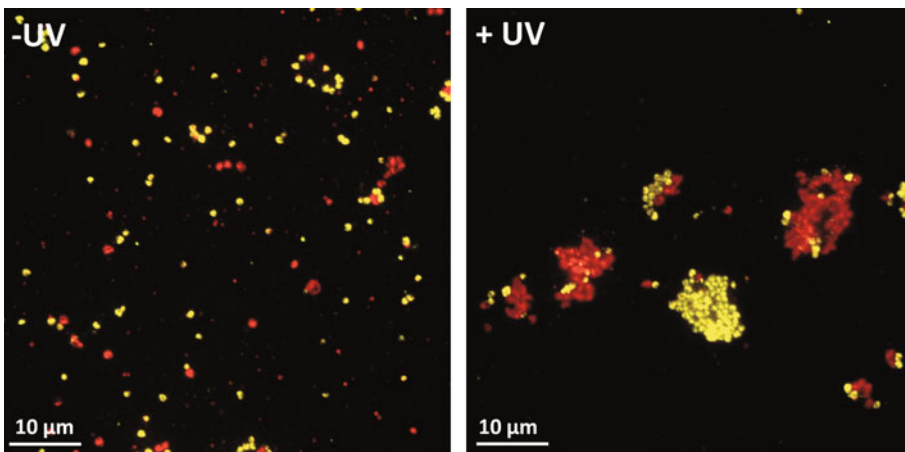
Alle drei Domänen des Lebens besitzen Zelloberflächenstrukturen, etwa Pili. Die meisten beschriebenen Zelloberflächenstrukturen bei Archaeen ähneln strukturell und evolutionär den bakteriellen Typ-IV-Pili [2]. In Bakterien erfüllen diese Pili eine Vielzahl von Funktionen, wie z. B. Bewegung, Anheftung an Oberflächen und die Aufnahme von DNA. Sie spielen damit eine wichtige Rolle in der Pathogenität Gram-negativer Bakterien. In Archaeen wurden bisher Funktionen in der Schwimm- und Oberflächenmotilität, bei der Adhäsion und dem Austausch von DNA nachgewiesen. Es gibt einige Merkmale, die zwischen den bakteriellen und den archaeellen Typ-IV-Pili konserviert sind: So besitzen alle ein besonderes Signalpeptid, das vor der Assemblierung in das Pilusfilament prozessiert werden muss. Ähnlich wie das Signalpeptid, das sekretorische Proteine zum

Sec-Translokon leitet, enthält das Typ-IV-Pilin-Signalpeptid eine positiv geladene N-Domäne, eine hydrophobe H-Domäne, die die Insertion

in die Membran ermöglicht, und eine C-Domäne, hinter der das Signalpeptid abgetrennt wird. Im Gegensatz zu Sec-abhängigen Signalpeptiden wird jedoch bei Typ-IV-Präpili- nen nur die positiv geladene N-Domäne abgespalten, womit die H-Domäne Teil des reifen Proteins bleibt und eine essenzielle Funktion für die korrekte Assemblierung des Pilus hat. Die Typ-IV-Präpilin-Peptidase der Archaeen, die für die Prozessierung der Typ-IV-Präpiline verantwortlich ist, PibD (Sulfolobales) oder FlaK (Methanogene), ist homolog zum bakteriellen PilD, und beide haben eine ähnliche Erkennungssequenz [3, 4]. Dies ermöglichte es uns, das Programm FlaFIND zu schreiben (<http://signalfind.org/flafind.html>), mit dem wir sowohl archaeelle als auch bakterielle Typ-IV-Piline und ihre Prozessierungsstelle vorhersagen können [5]. Eine Analyse archaeeller Genome zeigte, dass diese viele Operons



▲ **Abb. 1:** Modell der Zellmembran von *Sulfolobus acidocaldarius* und *S. solfataricus*. Die Zelle umgibt ein S-Layer aus zwei Proteinen: SlaA bildet die äußere Hülle, und SlaB verankert das S-Layer in der Membran. Die unprozessierten Vorläufer der Aap-Piline, Ups-Piline, Archaeelline und zuckerbindenden Proteine (Bindosom) werden in die Membran integriert, durch die Peptidase prozessiert und dann in die verschiedenen Zelloberflächenstrukturen eingegliedert. Die Assemblierungssysteme bestehen in allen vier Fällen aus zwei Komponenten: einer zytoplasmatischen ATPase und einem integralen Membranprotein (AapE/F, UpsE/F, FlaI/J und BasE/F), die jeweils in einem homooligomeren Zustand vorliegen und homolog zu den bakteriellen Typ-IV-Pili-Komponenten sind. Das Bas-System besitzt zudem drei Pseudopiline, BasA/B/C, die eine Rolle bei der Verankerung der Bindeproteine in der Zellwand spielen.



▲ **Abb. 2:** Mischungen von *Sulfolobus*-Spezies induziert durch UV-Strahlung ( $50 \text{ J/m}^2$ ). Die Zellen wurden mit spezifischen FISH-Proben gefärbt. UV-induzierte Aggregate bilden nur Zellen der gleichen Spezies (rechts). Gelb: *S. acidocaldarius*; rot: *S. tokodaii*.

besitzen, die möglicherweise Pili exprimieren können, da in diesen Genomen mögliche Piline in der direkten Umgebung von PilB- und PilC-Homologen gefunden wurden. PilB, eine Membran-assoziierte ATPase, und PilC, ein polytopisches Membranprotein, bilden die Grundstruktur von Typ-IV-Pili-Assemblierungssystemen und sind hierfür essenziell. Interessanterweise scheinen für die Assemblierung von archaeellen Typ-IV-Pili meistens nur ein bis zwei Piline, ein PilB- und PilC-Homolog und ein oder zwei Proteine unbekannter Funktion, notwendig zu sein (**Abb. 1**), während in Bakterien mindestens zwölf Proteine benötigt werden. Darum wird die detaillierte Analyse des Assemblierungsmechanismus des archaeellen Systems auch dazu beitragen, wichtige Fragen zur Assemblierung bakterieller Filamente zu beantworten.

### **Sulfolobus als Modellsystem für die Analyse archaeeller Typ-IV-Pili**

Verschiedene *Sulfolobus*-Arten aus unterschiedlichen geothermalen Gebieten weltweit bevorzugen Wachstumstemperaturen von 75 bis 80 °C und eine saure Umgebung (pH 2 bis 3). *S. solfataricus*, *S. islandicus* und *S. acidocaldarius* sind derzeit die einzigen genetisch manipulierbaren Crenarchaeoten; sie gelten daher als Modellorganismen dieses Phylums. Zudem besitzen die verschiedenen *Sulfolobus*-Stämme eine Vielzahl von Typ-IV-Pilus-Zellanhängen: das Archaeellum, adhäsive Pili, UV-induzierbare Pili und das Bindosom (**Abb. 1**).

### **Das Archaeellum**

Das Flagellum bei Archaeen wird mittlerweile als „Archaeellum“ bezeichnet [6], denn es

führt zwar die Funktionen eines Flagellums wie Schwimmen und Oberflächenbewegung aus, entspricht strukturell jedoch einem Typ-IV-Pilus. Die Untereinheiten des Archaeellums, die Archaeelline, werden zunächst wie die Präpiline von PibD/FlaK modifiziert und an der Basis des Filaments assembliert. Zudem werden sie N-glykosyliert, was bisher nicht bei bakteriellen Flagellinen, aber bei Piliinen beobachtet wurde. Das Archaeellum besitzt alle typischen Untereinheiten eines Typ-IV-Pili-Assemblierungssystems, da PilB- und PilC-Homologe vorhanden sind (**Abb. 1**). Es ist eine faszinierende Struktur, da es, obwohl es ein Typ-IV-Pilus ist, rotieren kann, was zunächst für *Halobacterium salinarum* gezeigt wurde. Diese Rotation des Archaeellums wird nicht durch einen Protonen- oder Natriumgradienten angetrieben, sondern ist abhängig von ATP-Hydrolyse [7]. Diese Merkmale machten es notwendig, dieser Struktur einen neuen Namen zu geben und sie sowohl von den bakteriellen Flagellen als auch von den Typ-IV-Pili abzugrenzen.

Im Gegensatz zu den Euryarchaeoten, deren Archaeellum-Operon bis zu 14 Proteine beinhalten kann, haben Crenarchaeoten eine relativ einfache Organisation mit sieben bis acht Proteinen. In *S. acidocaldarius* wurde kürzlich mittels Deletionsmutanten-Analyse gezeigt, dass alle sieben Proteine essenziell für die Assemblierung des Archaeellums sind [8]. Mittels Thermomikroskopie wurde demonstriert, dass das Archaeellum die einzige Oberflächenstruktur ist, mit denen *Sulfolobus*-Zellen schwimmen (bis zu 70 Mikrometer pro Sekunde). Archaeellen werden vorwiegend in der stationären Phase exprimiert, wenn Nährstoffmangel auftritt. Negative und

positive Regulatoren sind über Proteinphosphorylierung an der präzise abgestimmten Expression des Archaeellums beteiligt, deren genauer Wirkmechanismus Bestandteil aktueller Forschung unserer Arbeitsgruppe ist.

### **UV-induzierbare Pili**

Alle bisher sequenzierten *Sulfolobales* besitzen ein konserviertes Pili-Operon, das nur nach Bestrahlung mit UV-Licht hoch exprimiert wird. Sowohl in *S. solfataricus* als auch *S. acidocaldarius* führt die Expression der UV-Pili zu Zellaggregation, sodass drei bis sechs Stunden nach Bestrahlung bis zu 90 Prozent der Zellen in Aggregaten vorliegen [9, 10]. Dies ist ein aktiver und reversibler Prozess: Zehn Stunden nach UV-Bestrahlung sind keine Zellaggregate mehr zu finden; nahezu alle Zellen in den Aggregaten waren lebendig. Die Deletion dieser Pili-Gene zeigte, dass die Zellen in den Aggregaten DNA austauschen und somit Schäden an der genomischen DNA, die durch die UV-Bestrahlung entstanden waren, effizienter reparieren konnten. Dieses System stellt demzufolge ein Kolonie-basierendes DNA-Reparatursystem dar. Da verschiedene *Sulfolobus*-Stämme in denselben Habitaten ko-existieren können, ist eine stammspezifische Zellaggregation sinnvoll (**Abb. 2**). Dies konnten wir bestätigen und vermuten, dass die N-Glykane bei der spezifischen Erkennung eine Rolle spielen.

### **Ein Pilus als Abstandshalter**

In *S. acidocaldarius* kommt ein dritter Pilus vor, der *archaeal adhesive pilus* (Aap). Er ist in großer Anzahl auf der Zelloberfläche vorzufinden. Im Gegensatz zum Archaeellum wird der Aap-Pilus hauptsächlich in der exponentiellen Phase exprimiert, wenn die Wachstumsbedingungen für die Zellen optimal sind. Der Aap-Pilus ist hauptsächlich für die Adhäsion an verschiedene Oberflächen verantwortlich und spielt auch eine wichtige Rolle bei der Bildung von Biofilmen [11]. In Aap-Deletionsmutanten war die Zelldichte in *S. acidocaldarius*-Biofilmen sehr hoch und die Biofilme dadurch wesentlich flacher als Wildtyp-Biofilme. Die Aap-Pili könnten im Biofilm eine Art „Abstandshalterfunktion“ haben, um den optimalen Fluss von Nährstoffen zu ermöglichen. Interessanterweise verhalten sich UV-Pili im Biofilm als Antagonisten zu den Aap-Pili, da UV-Pili-Deletionsmutanten einen locker strukturierten Biofilm bilden, während die An- oder Abwesenheit des Archaeellums

keinen Einfluss auf die Struktur des Biofilms hat [11].

### Das Bindosom

Ein Bindosom, ein Komplex aus Zuckerbindeproteinen, wurde bisher nur in *S. solfataricus* gefunden: Drei Zuckerbindeproteine, die jeweils Teil eines ABC-Transporters sind, besitzen eine Typ-IV-Pilin-Signalsequenz. Das *bindosome assembly system* (Bas) besteht aus drei Pilinen, einer PilB-ATPase und einem PilC-Homolog und ist essenziell für die Reifung der Zuckerbindeproteine in der Membran. Ohne das Bas-System werden die Zuckerbindeproteine zwar korrekt prozessiert, N-glykosyliert und können den jeweiligen Zucker binden, aber nicht aktiv am Transport teilnehmen, sodass *S. solfataricus* nur auf diesen Zuckern wächst, wenn das Bas-System in *trans* exprimiert wird [12]. Das Bindosom beeinflusst die Stabilität des *S. solfataricus*-S-Layers, daher wird angenommen, dass die Bindeproteine in einer Pilus-ähnlichen Struktur mit dem S-Layer interagieren und so Teil der Zellhülle sind.

### Archaeen als einfaches Modellsystem

Archaeen besitzen eine Vielzahl verschiedener Typ-IV-Pili, deren Funktion und einfacher Aufbau das Spektrum bekannter Einsatzge-

biete dieser Oberflächenstrukturen erweitern und durch ihre relativ einfache Zusammensetzung ein tieferes Verständnis ihrer Assemblierung ermöglichen. Zudem ist das Archaeolum ein einzigartiger Typ-IV-Pilus, da dieser rotieren kann, und stellt somit ein faszinierendes Modellsystem für einen einfachen Motor dar.

### Danksagung

Vielen Dank für die Forschungsförderung an die Max-Planck-Gesellschaft (MPG), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und die Nederlandse Wetenschaps Organisatie (NWO). ■

### Literatur

- [1] Albers S-V, Meyer BH (2011) The archaeal cell envelope. *Nat Rev Microbiol* 9:414–426
- [2] Albers S-V, Pohlschröder M (2009) Diversity of archaeal type IV pilin-like structures. *Extremophiles* 13:403–410
- [3] Bardy SL, Jarrell KF (2003) Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol Microbiol* 50:1339–1347
- [4] Albers S-V, Szabó Z, Driessen AJM (2003) Archaeal homolog of bacterial type IV prepilin signal peptidases with broad substrate specificity. *J Bacteriol* 185:3918–3925
- [5] Szabó Z, Stahl AO, Albers S-V et al. (2007) Identification of diverse archaeal proteins with class III signal peptides cleaved by distinct archaeal prepilin peptidases. *J Bacteriol* 189:772–778

- [6] Jarrell KF, Albers S-V (2012) The archaeallum: an old structure with a new name. *Trends Microbiol* doi:10.1016/j.tim.2012.04.007
- [7] Streif S, Staudinger WF, Marwan W et al. (2008) Flagellar rotation in the archaeon *Halobacterium salinarum* depends on ATP. *J Mol Biol* 384:1–8
- [8] Lassak K, Neiner T, Ghosh A et al. (2012) Molecular analysis of the crenarchaeal flagellum. *Mol Microbiol* 83:110–124
- [9] Fröls S, Ajon M, Wagner M et al. (2008) UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Mol Microbiol* 70:938–952
- [10] Ajon M, Fröls S, van Wolferen M et al. (2011) UV-inducible DNA exchange in hyperthermophilic archaea mediated by type IV pili. *Mol Microbiol* 82:807–817
- [11] Henche A-L, Koerdt A, Ghosh A et al. (2012) Influence of cell surface structures on crenarchaeal biofilm formation using a thermostable green fluorescent protein. *Environ Microbiol* 14:779–793
- [12] Zolghadr B, Weber S, Szabó Z et al. (2007) Identification of a system required for the functional surface localization of sugar binding proteins with class III signal peptides in *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* 64:795–806

### Korrespondenzadresse:

PD Dr. Sonja-Verena Albers  
Molekularbiologie von Archaeen  
Max-Planck-Institut für terrestrische  
Mikrobiologie  
Karl-von-Frisch-Straße 10  
D-35043 Marburg  
Tel.: 06421-178426  
Fax: 06421-178429  
albers@mpi-marburg.mpg.de

### AUTORINNEN



Anna-Lena Henche (links) und Sonja-Verena Albers

#### Anna-Lena Henche

Jahrgang 1986. 2006–2011 Biologiestudium an der Universität Marburg, Bachelor- und Masterarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg, dort seit 2011 Doktorarbeit in der Max-Planck Research Group Molecular Biology of Archaea.

#### Sonja-Verena Albers

Jahrgang 1972. 1991–1996 Biologiestudium an der Universität Würzburg, Diplomarbeit am MPI für Biochemie, München, bei Prof. Dr. W. Zillig. 1997–2001 Doktorarbeit in der Abteilung Molecular Microbiology an der Universität Groningen, Niederlande. 2001–2003 Postdoc an der Universität Groningen; dort 2003–2006 VENI-Stipendium, 2006–2008 VIDI-Stipendium. Seit 2008 Leiterin einer unabhängigen Nachwuchsgruppe Molecular Biology of Archaea am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg.