

Fortbewegungsorganell

A tale of a tail – eine kurze Geschichte der Biosynthese von Flagellen

MARC ERHARDT
INSTITUT FÜR BIOLOGIE, HU BERLIN

VAAM-Forschungspreis 2018

Flagella are the primary organelles of motility and the most prominent extracellular structure of bacteria. The flagellum is a remarkably complex structure and made of several tens of thousands individual building blocks. Many molecular details concerning the organization and assembly mechanisms remain poorly understood. We study the self-assembly processes of the flagellum and aim to understand how nature succeeds in assembling these nanomachines in simple, elegant, yet robust ways.

DOI: 10.1007/s12268-018-0913-x
© Springer-Verlag 2018

■ Viele Bakterien sind in der Lage, sich durch Rotation eines propellerähnlichen Fortsatzes gerichtet fortzubewegen. Dieses Fortbewegungsorganell, das Flagellum, ist eine erstaunlich komplexe makromolekulare Struktur und besteht aus drei Hauptbestandteilen: einem in der Zellohülle verankerten Basalkörper, einem flexiblen, extrazellulären Bindestück (Haken) sowie einem zehn bis

20 Mikrometer langen Filament [1]. Der Basalkörper beinhaltet – neben für die Rotation des Flagellums nötigen Motorproteinen – ein Typ-III-Proteinsekretionssystem (T3SS) und einen Stab (*rod*), der den periplasmatischen Raum überbrückt (Abb. 1).

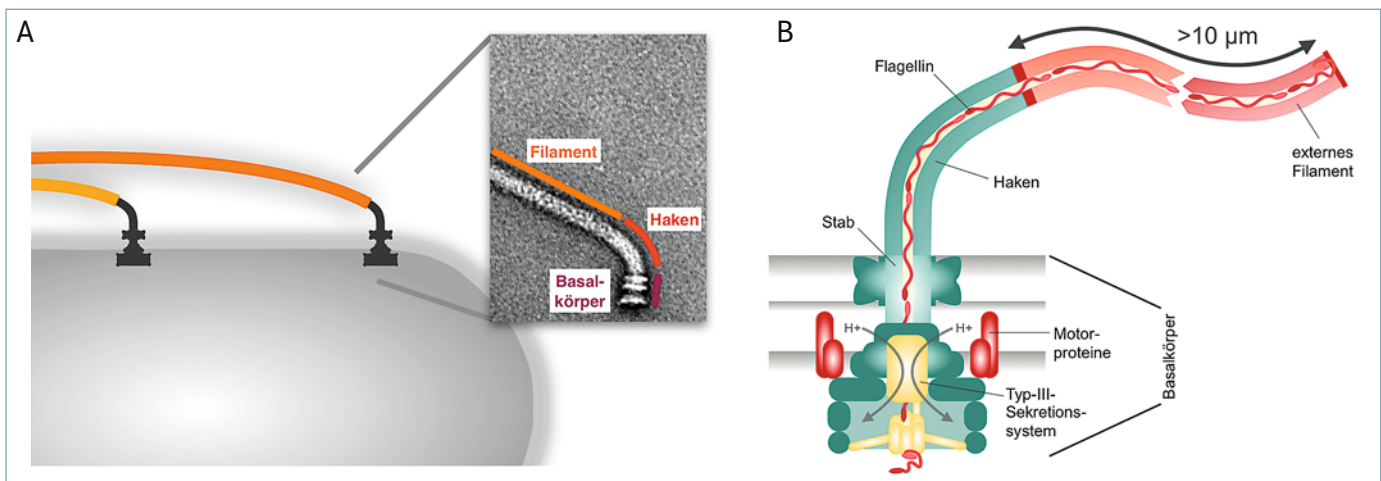
Evolutionär verwandt mit Flagellen ist das Injektisom, eine nadelähnliche Struktur vieler Gram-negativer Pathogene [2]. Sowohl Fla-

gellen als auch das Injektisom benutzen ein stark konserviertes T3SS für die Sekretion strukturelle Bausteine sowie für die Sekretion von Effektorproteinen in das Cytosol eukaryotischer Wirtszellen.

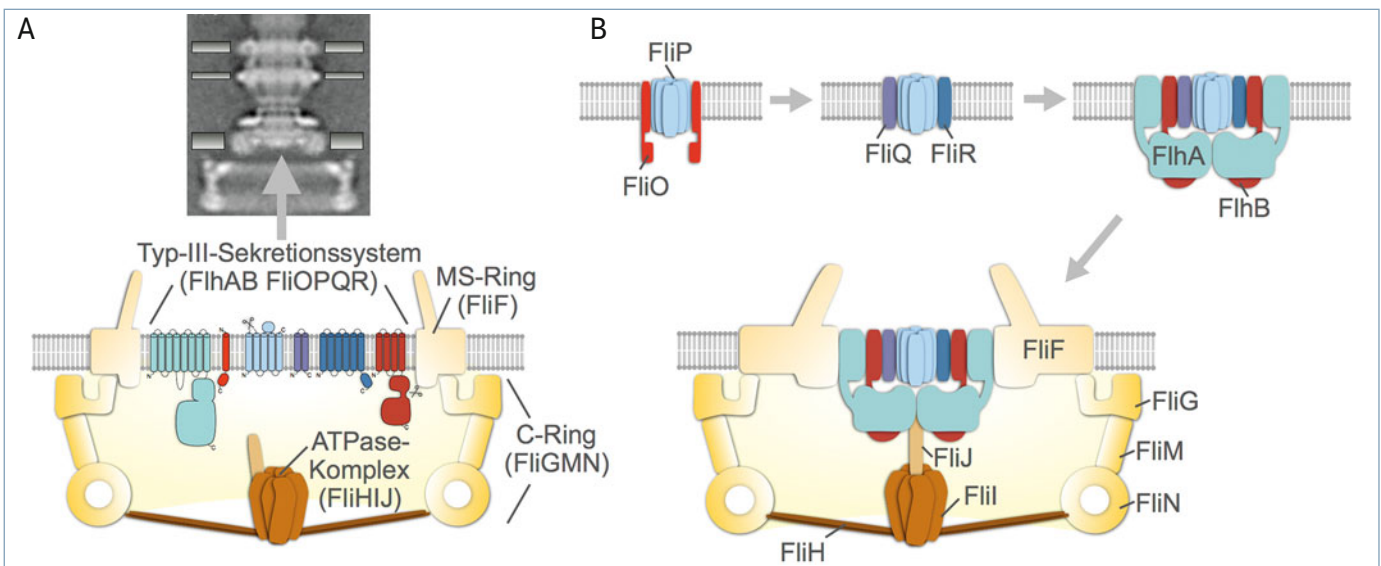
Funktion und Aufbau des Typ-III-Proteinsekretionssystems

Das T3SS besteht aus mehreren Membranproteinen und einer cytoplasmatischen ATPase (Abb. 2A). T3SS verwenden die protonenmotorische Kraft (*proton motive force*, PMF) als Energiequelle für die Sekretion von Proteinen über die innere Membran [3]. Die Funktion der ATPase bei der Proteinsekretion ist unklar. So wurde gezeigt, dass Substratproteine auch in Mutanten der ATPase noch sekretiert werden [3, 4].

Wie genau T3SS die protonenmotorische Kraft an die Proteinsekretion koppeln, ist noch unverständlich. Experimentelle Hinweise deuten darauf hin, dass das Membranprotein FlhA des T3SS für den PMF-abhängigen Proteintransport verantwortlich ist [5]. Zyklische, durch die PMF energetisierte Bewegungen einer cytoplasmatischen Domäne von FlhA



▲ **Abb. 1:** Schematischer Aufbau des bakteriellen Flagellums. **A,** Modellzeichnung und elektronenmikroskopische Aufnahme eines Flagellums (T. Marlovits). Das in der Zellohülle verankerte Flagellum besteht aus drei Hauptbestandteilen: Basalkörper, Haken und Filament. **B,** schematische Darstellung der Hauptbestandteile des Flagellums im Detail (© M. Erhardt).



▲ **Abb. 2:** Koordiniertes Aufbau des flagellumspezifischen Typ-III-Sekretionssystems (T3SS). **A,** elektronenmikroskopische Aufnahme des Basalkörpers von Flagellen (oben; mit freundlicher Genehmigung von David DeRosier, modifiziert nach [13]) und schematische Darstellung des T3SS von Flagellen (unten). Das T3SS besteht aus sechs Membranproteinen, einem cytoplasmatischen ATPase-Komplex und einem cytoplasmatischen Ring, der eine duale Funktion als Rotor des Flagellums sowie in der Bindung von T3SS-Substraten hat. Blauer Pfeil: Position des T3SS in der inneren Membran. **B,** Modell, wie das flagellumspezifische Chaperon FliO den Aufbau des zentralen Porenkomplexes des T3SS koordiniert. Das Chaperon FliO interagiert mit dem Porenprotein FliP und ermöglicht die Bildung eines stabilen Porenkomplexes. FliO wird durch andere Membranbestandteile des T3SS (FliQ und FliR) ersetzt, nachdem ein stabiler FliP-Komplex gebildet wurde. Die Bildung eines Porenkomplexes aus FliP-FliQ-FliR ist die Grundlage für den weiteren Aufbau eines funktionalen T3SS (© M. Erhardt).

könnten die Translokation von Proteinen über die innere Membran ermöglichen.

Die Membranproteine FliP, FliQ und FliR bilden vermutlich den Kanal, durch den die Substratproteine transportiert werden. Wie koordinieren Bakterien den Aufbau des aus mehreren Membranproteinen bestehenden Porenkomplexes? Die meisten Flagellensysteme codieren für ein weiteres Membranprotein, FliO, das allerdings unter bestimmten Bedingungen nicht für die Biosynthese eines Flagellums benötigt wird. So ermöglicht eine Mutation im Porenprotein FliP oder die Überproduktion von FliP die Bildung von Flagellen auch in einer *fliO*-Deletionsmutante [6, 7]. Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie von FliO ergab, dass das Protein frei in der inneren Membran diffundiert. Die Basalkörper von Flagellen und damit das T3SS sind jedoch an einer Position der Zellhülle fixiert, sobald der Stab des Basalkörpers die Zellwand durchdringt. Diese Experimente deuteten darauf hin, dass das FliO-Protein kein direkter Bestandteil des T3SS ist, jedoch eine wichtige Rolle für die Funktion des Porenproteins FliP spielt. In der Tat ist FliP in der Abwesenheit von FliO instabil und kann keine Porenkomplexe bilden. FliO fungiert entsprechend als membrangebundenes Chaperon bei der Bildung des zentralen Porenkomplexes und koordiniert dadurch den korrekten Aufbau des T3SS (**Abb. 2B**, [7]).

Länglenkontrolle von Teilstrukturen des Flagellums

Interessanterweise können Bakterien die Länge von Teilstrukturen der Flagellen präzise im Nanomaßstab messen. Bei *Salmonella enterica* überbrückt der Stab des Basalkörpers eine Distanz von ungefähr 25 Nanometern von der inneren zur äußeren Membran. Die Länge des Stabs wird hierbei durch die Breite des periplasmatischen Raumes begrenzt, die wiederum von der Länge des Braun'schen Lipoproteins bestimmt wird [8].

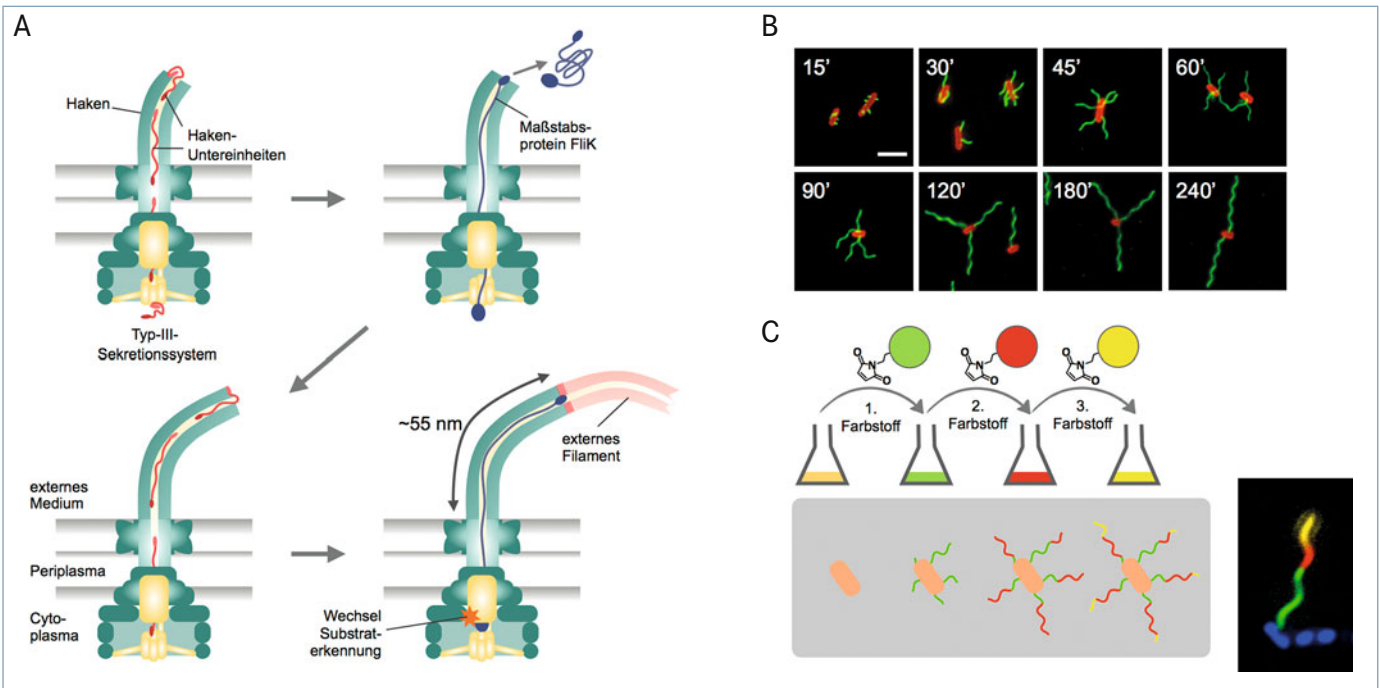
Die Länge des extrazellulären Hakens beträgt ungefähr 55 Nanometer, und die Fertigstellung korreliert mit einem Wechsel in der Substraterkennung des T3SS an der Basis des Flagellums. Vor der Fertigstellung des Hakens und während des Aufbaus des Basalkörpers erkennt und sekretiert das T3SS nur Bausteine des Stabs und des Hakens. Erst nach dem Wechsel in der Substraterkennung werden Bausteine des Filaments sekretiert. Dieser Mechanismus garantiert, dass ein funktionaler Basalkörper vorhanden ist, auf dem das lange Filament des Flagellums aufgebaut werden kann. Wie kann jedoch das Bakterium die Länge einer extrazellulären Struktur (des Hakens) messen und diese Information an das T3SS in der inneren Membran übertragen?

Für die Längenmessung des Hakens ist ein „Linealprotein“, FliK, verantwortlich. So kön-

nen Insertionen im *fliK*-Gen die Länge des Hakens künstlich verlängern [9]. Während des Aufbaus des Hakens wird FliK in unregelmäßigen Abständen in den Kulturüberstand sekretiert. Dabei misst FliK in seiner Funktion als Maßstabsprotein physisch die Länge der Hakenstruktur. FliK bindet mit seinem Aminoterminus an die Kappe des Hakens, während die carboxyterminale Domäne mit dem T3SS interagiert. So überbrückt das Maßstabsprotein während des Sekretionsvorgangs die gesamte Distanz von der Spitze des Hakens bis zur Basis des Flagellums. Mechanistisch verbleibt FliK nur in Haken mit einer Länge von mindestens 55 Nanometern für eine längere Zeit im Sekretionskanal des Flagellums. Dies ermöglicht eine Interaktion der carboxy-terminalen Domäne von FliK mit dem FlhB-Membranprotein des T3SS, was zu einer Konformationsänderung in FlhB und damit zum Wechsel der Substraterkennung führt (**Abb. 3A**, [10]).

Mechanismus des Filamentwachstums

Das Filament von Flagellen besteht aus mehreren Tausend Untereinheiten eines einzelnen Proteins, dem Flagellin. Die Flagellin-untereinheiten werden durch den engen Sekretionskanal bis an die Spitze des Flagellums transportiert, wo sie sich anlagern und damit das Filament verlängern. Das Flagel-



▲ Abb. 3: Mechanismen der Längenkontrolle des Hakens und des Filamentwachstums. **A**, Modell der Längenmessung des Hakens durch unregelmäßige Sekretion des Maßstabsproteins FliK. Das T3SS des Flagellums sekretiert während des Aufbaus des Hakens abwechselnd das Maßstabsprotein FliK und Bausteine des Hakens. Sobald FliK in Haken mit einer Länge von mindestens 55 Nanometern sekretiert wird, verbleibt das Maßstabsprotein lange genug im Sekretionskanal, um einen Wechsel in der Substraterkennung des T3SS zu induzieren (Stern in Orange). Erst nach dem Wechsel in der Substraterkennung sekretiert das T3SS die Bausteine des Filaments (© M. Erhardt). **B**, Die Wachstumsrate von Flagellenfilamenten nimmt mit steigender Filamentlänge ab, wie Markierungsversuche nach Synchronisation der Flagellensynthese zeigen. Rot: membranspezifische Färbung; grün: Anti-Flagellin-Immundefärbung (modifiziert nach [12]). **C**, Eine abschnittsweise Färbung von Flagellenfilamenten ermöglicht es, die Wachstumsrate einzelner Filamente zu bestimmen. Hierfür wird eine Flagellinmutante mit einem Oberflächen-exponierten Cysteinrest in Anwesenheit von sulfhydrylspezifischen (Maleimid-)Farbstoffen kultiviert. Auf Grundlage der bekannten Inkubationszeit mit den jeweiligen Farbstoffen wird direkt die Wachstumsrate in Abhängigkeit der jeweiligen Filamentlänge berechnet. Blau: DNA-Färbung; grün, rot und gelb: Färbung von Filamentfragmenten mit unterschiedlichen Maleimidfarbstoffen (© M. Erhardt).

lenwachstum ist ein erstaunlich schneller Prozess: Innerhalb von wenigen Minuten wird ein mehrere Mikrometer langes Filament aufgebaut. Welcher Mechanismus ermöglicht dieses schnelle Wachstum und den Transport von Flagellinuntereinheiten über eine solche Distanz?

Eine Hypothese war, dass die sekretierten Flagellinuntereinheiten im Sekretionskanal eine miteinander verbundene Kette ausbilden. Hierbei könnte die Faltung der äußersten Untereinheit an der Spitze des Flagellums die Energie bereitstellen, um die gesamte Flagellinkette mit einer konstanten Geschwindigkeit nach außen zu transportieren [11]. Dieser Mechanismus würde zu einem linearen Wachstum des Flagellums führen.

Eine detaillierte Analyse der Wachstumsrate von Flagellen ergab jedoch, dass das anfänglich schnelle Flagellenwachstum (100 Nanometer pro Minute) auf ungefähr 20 Nanometer pro Minute für acht bis zehn Mikrometer lange Filamente abnimmt (**Abb. 3B, C**). Ein auf einer Flagellinkette basierender Mechanismus des Flagellen-

wachstums würde zudem für Ereignisse anfällig sein, die zu einem Bruch der Kette führen. Denn der basale Abschnitt einer unterbrochenen Flagellinkette müsste sehr langsam an die Spitze des Flagellums diffundieren, bevor das Wachstum wieder aufgenommen werden könnte. Lange Pausen im Flagellenwachstum wären die Folge. Eine Analyse der Wachstumsrate während der gleichzeitigen Sekretion von Flagellinmutanten, die keine Kette ausbilden können, zeigte jedoch keine Pausen im Flagellenwachstum.

Zusammengenommen befürworten diese Experimente einen Mechanismus des Flagellenwachstums, der auf einem aktiven, T3SS-abhängigen Sekretionsprozess sowie auf der zweidimensionalen Diffusion der sekretierten Untereinheiten im Sekretionskanal des Flagellums beruht. Dieser Injektions-Diffusions-Mechanismus erklärt die längenabhängige Wachstumsrate und aufgrund der quadratisch abnehmenden Wachstumskinetik außerdem, warum Flagellen auch ohne einen dezidierten Längenkontrollmechanismus nicht unendlich lange wachsen [12].

Noch kaum verstandene Nanomaschinen

Bakterielle Flagellen und das evolutionär verwandte Injektisom sind komplexe, hoch spezialisierte Nanomaschinen und wichtige Virulenzfaktoren vieler pathogener Bakterien. Zwar sind Teilstrukturen dieser Nanomaschinen mittlerweile relativ gut verstanden, jedoch ist weitgehend unklar, wie Bakterien den gleichzeitigen Aufbau mehrerer dieser komplexen Nanomaschinen innerhalb einer Zelle koordinieren. Zudem sind die Proteinsekretionsmechanismen durch das konservierte T3SS noch unklar. Ein molekulares Verständnis dieser Prozesse ist jedoch die Voraussetzung, um neue antimikrobielle Ansätze gegen die Bildung von Flagellen oder die Funktion von T3SS entwickeln zu können.

Danksagung

Ich danke allen Mitarbeitern/innen meiner Arbeitsgruppe für ihren stets hoch motivierten Einsatz und die stimulierenden Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt allen Mentorinnen und Mentoren in Konstanz, Salt Lake

City, Fribourg und Braunschweig, speziell Winfried Boos, Kelly T. Hughes und Petra Dersch. Ich bedanke mich ebenfalls bei der Helmholtz-Gemeinschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Europäischen Kommission und dem Boehringer Ingelheim Fond für die finanzielle Unterstützung. ■

Literatur

- [1] Chevance FFV, Hughes KT (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* 6:455–465
- [2] Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4:811–825
- [3] Paul K, Erhardt M, Hirano T et al. (2008) Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* 451:489–492
- [4] Erhardt M, Mertens ME, Fabiani FD et al. (2014) ATPase-independent type-III protein secretion in *Salmonella enterica*. *PLoS Genet* 10:e1004800
- [5] Erhardt M, Wheatley P, Kim EA et al. (2017) Mechanism of type-III protein secretion: regulation of FlhA conformation by a functionally critical charged-residue cluster. *Mol Microbiol* 104:234–249
- [6] Barker CS, Meshcheryakova IV, Kostyukova AS et al. (2010) FlhO regulation of FlhP in the formation of the *Salmonella enterica* flagellum. *PLoS Genet* 6:e1001143
- [7] Fabiani FD, Renault TT, Peters B et al. (2017) A flagellum-specific chaperone facilitates assembly of the core type III export apparatus of the bacterial flagellum. *PLoS Biol* 15:e2002267
- [8] Cohen EJ, Ferreira JL, Ladinsky MS et al. (2017) Nanoscale-length control of the flagellar driveshaft requires hitting the tethered outer membrane. *Science* 356:197–200
- [9] Shibata S, Takahashi N, Chevance FFV et al. (2007) FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler. *Mol Microbiol* 64:1404–1415
- [10] Erhardt M, Singer HM, Wee DH et al. (2011) An infrequent molecular ruler controls flagellar hook length in *Salmonella enterica*. *EMBO J* 30:2948–2961
- [11] Evans LDB, Poulter S, Terentjev E et al. (2013) A chain mechanism for flagellum growth. *Nature* 504:287–290
- [12] Renault TT, Abraham AO, Bergmiller T et al. (2017) Bacterial flagella grow through an injection-diffusion mechanism. *eLife* 6:e23136
- [13] Francis NR, Sosinsky GE, Thomas D et al. (1994) Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* 235:1261–1270

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Marc Erhardt
 Institut für Biologie – Bakterienphysiologie
 Humboldt-Universität zu Berlin
 Philippstraße 13, Haus 22
 D-10115 Berlin
 Tel.: 030-2093-49780
 marc.erhardt@hu-berlin.de
<https://www.baktphys.hu-berlin.de>

AUTOR



Marc Erhardt

Jahrgang 1981. 2002–2006 Biologiestudium an den Universitäten Ulm und Konstanz. 2006 Diplomarbeit an der University of Utah, Salt Lake City, USA. 2011 Promotion an der Universität Konstanz. 2011–2012 Postdoktorand an der Université de Fribourg, Schweiz. 2013–2017 Nachwuchsgruppenleiter am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig. Seit 2017 Professor für Bakterienphysiologie an der HU Berlin.