

Wirkungsbericht 2022 zur Professur Kryo-Elektronenmikroskopie von

Professor Martin Pilhofer



Vielen Dank!

Die Professur Kryo-Elektronenmikroskopie von Martin Pilhofer wurde durch grosszügige Donationen unter anderem der NOMIS Stiftung ermöglicht. Ebenso haben die Baugarten Stiftung und die Familie von Finck massgeblich zur Aufrüstung des bestehenden und zur Anschaffung eines neuen Kryo-EM-Geräts an der ETH Zürich beigetragen.

Für die grosszügige Unterstützung danken wir im Namen aller Beteiligten ganz herzlich!

Im 2019 wurde die Professur für Kryo-Elektronenmikroskopie an der ETH Zürich mit Professor Martin Pilhofer besetzt.

Labor Martin Pilhofer

Derzeitige Zusammensetzung der Forschungsgruppe

Postdoktoranden: 5
 Doktoranden: 11
 Technische Mitarbeiterin: 1
 Laborleiterin: 1
 Projektleiter: 1
 Mitarbeiter/in Administration: 1



Neue Gruppenmitglieder

Seit letztem Herbst sind einige neue Forschende zur Gruppe dazugestossen.



Anastasiia Kokhanovska

Technische Mitarbeiterin

BSc in Biotechnologie, Kiev Polytechnic Institute
 Nationalität: Ukraine



Marlen Petersen

Doktorandin (Weiss Subgroup)

MSc University of British Columbia Vancouver
 Nationalität: Deutschland



Jessie Malit

Doktorand

MSc University of Hong Kong
 Nationalität: Philippinen

Highlights

Im September 2022 wurde vom SNSF (Swiss National Science Foundation) ein Projektantrag bewilligt. Das Projekt befasst sich mit der Erforschung der Struktur und des Mechanismus von kontraktilen Injektionsystemen, dem Kernthema der Forschungsgruppe.

Die Ergebnisse der vergangenen Jahre sollen genutzt werden, um den Kontraktionsmechanismus und etwaige Konformationsänderungen in der Basenplatte dieser Systeme zu untersuchen. Die Basenplatte bindet spezifisch an Zielzellen, was dann das Anpieksen der Zielzellen und die Übertragung der Effektormoleküle ermöglicht (mehr dazu unten). Ausserdem soll ein kontraktils Injektionssystem in Archaeen (urtümlichen Mikroben) studiert werden, wo bislang keine ähnlichen Systeme beobachtet wurden.

Forschungsaktivitäten und Ausblick

Das Ziel von Martin Pilhofer und seinem Team ist es, die Interaktionen von Mikroben mit anderen Zellen zu untersuchen. Besonderes Interesse gilt dabei der Untersuchung der makromolekularen Strukturen, die diese Zell-Zell-Wechselwirkungen vermitteln. Durch Kombination der Schlüsseltechnologie Kryo-Elektronentomographie (KryoET) mit anderen bildgebenden Verfahren und funktionellen Tests integriert die Gruppe Informationen von der molekularen bis zur zellulären und interzellulären Ebene.

Die Forschung konzentriert sich im Wesentlichen auf die folgenden drei Bereiche:

1. Erforschung von verschiedenen Zell-Zell-Interaktionen.
2. Weiterentwicklung der Kryo-Elektronenmikroskopie und anderen bildgebenden Verfahren.
3. Untersuchung von Harnwegsinfekten durch die Untergruppe Weiss.

Bakterielle Zell-Zell-Interaktionen

Basis für die Interaktion zwischen Bakterien und anderen Zellen ist die Übertragung von sogenannten Effektormolekülen aus den Bakterien in andere Zellen. Damit dies erfolgen kann, braucht es makromolekulare Maschinen, also Zellorganellen, welche dafür sorgen, dass die Effektormoleküle aus dem Bakterium herausgeschleust werden und in die Zielzelle gelangen. Dabei weisen die verschiedenen Bakterienarten ganz unterschiedliche Strategien für diese Sekretionsmechanismen auf. Eine davon ist das kontraktile Injektionssystem, bei welchem das Bakterium die Zielzelle ansticht und so seine Effektormoleküle überträgt. Die Aufdeckung der zugrundeliegenden Mechanismen mithilfe der Kryo-ET schafft die notwendigen Voraussetzungen, um das Krankheitsgeschehen bei Infektionen zu verstehen und in einem zweiten Schritt geeignete Präventionsmethoden oder Therapien zu entwickeln. Auch in der Umwelt sind diese Interaktionen wichtig, wie zum Beispiel bei der Bildung von Biofilmen und bei der Interaktion von Cyanobakterien mit einer Vielzahl von anderen Organismen.

Zusammenfassung der aktuellen Forschungsarbeiten

Untersuchung

- kontraktile Injektionssysteme in drei Arten von marinen Bakterien, multizellulären Cyanobakterien, Streptomyzeten und Archaeen;
- von Interaktionen zwischen bakteriellen Episymbionten (Epixenosomen) und ihrem Wirt (Ciliaten);
- der Interaktionen zwischen marinen Bakterien und Choanoflagellaten;
- des Sekretionsmechanismus von Tc-Toxinen;
- von metabolischen Filamenten und Meiose in Hefe;
- von Zell-Zell Kommunikation in multizellulären Cyanobakterien;
- von Zell-Zell-Interaktionen in heißen Quellen und in einer Wüstenoase;
- von evolutionär interessanten Ciliatensymbiosen im Zuger See.



Die neu entdeckte Injektions-Nanomaschine von Blaualgen sitzt an einem aussergewöhnlichen Ort, und zwar in der Thylakoidmembran (grün). (Grafik: aus Weiss G., et al, Nature Microbiology 2022)

Highlights 2021–2022

Im letzten Jahr haben Martin Pilhofer und sein Team wesentliche Fortschritte bei der Identifizierung und Charakterisierung von neuen bakteriellen kontraktile Injektionssystemen gemacht. Diese Resultate werden das Verständnis der Struktur, Mechanismen und Evolution von bakteriellen kontraktile Injektionssystemen wesentlich verbessern. Zwei wegweisende Studien dazu wurden im Januar 2022 in *Nature Microbiology* publiziert (Weiss et al. und Xu et al., siehe Publikationsliste).

In diesen Arbeiten werden zwei neuartige Injektionssysteme beschrieben: eines aus Cyanobakterien (Blaualgen), und eines aus dem Meeresbakterium *Algoriphagus machipongonensis*.

Die neu entdeckten sogenannten kontraktile Injektionssysteme (CIS, von engl. contractile injection systems) funktionieren grundsätzlich anders als zuvor beschriebene und besitzen ein paar einzigartige Merkmale. Dadurch geben sie auch Aufschluss über die evolutionären Unterschiede zwischen verschiedenen Injektionssystem-Klassen. Mehr Informationen zu diesen Arbeiten und den erforschten kontraktile Injektionssystemen finden sich auf <https://ethz.ch/de/news-und-veranstaltungen/eth-news/news/2022/03/wie-bakterien-mit-speer-kanonen-feuern.html>.

Eine weitere Studie wurde kürzlich auf einem Preprint Server mit der Scientific Community geteilt (Casu et al., siehe Publikationsliste). Diese Arbeit identifizierte eine neue Funktion von kontraktile Injektionssystemen in Streptomyzeten, welche für die Identifikation und Produktion von Antibiotika von hoher Bedeutung sind. Kontraktile Injektionssysteme leiten in diesen Streptomyzeten unter Stressbedingungen den Zelltod ein und spielen im komplexen Lebenszyklus eine wesentliche Rolle.

Weiterentwicklung der Kryo-Elektronenmikroskopie

Die Kryo-ET stellt eine Schlüsselmethode dar und erlaubt Einblicke in die Struktur von Zell-Zell-Interaktionen im Nanometer-Bereich. Die Methode kann gut mit anderen Bildgebungsverfahren kombiniert werden, um die Interaktionen auf mehreren «Skalen» oder bei unterschiedlicher Vergrößerung zu verstehen. So liefern Datensätze der Lichtmikroskopie Informationen im Mikrometer-Bereich, während Methoden der Strukturbiologie Einblicke auf atomarer Ebene im Nanometer-Bereich und darunter gewähren.

Die Kryo-Elektronentomographie birgt zwei Herausforderungen: Einerseits die Kombination und Korrelation der Datensätze, andererseits die Anwendung an komplexen Proben, wie zum Beispiel Organoiden, Umwelt- oder Patientenproben. Diese Herausforderungen werden zurzeit mit hoher Priorität bearbeitet.

Highlights 2021–2022

Zusammen mit zehn weiteren Professorinnen und Professoren der ETH hat Martin Pilhofer als Hauptantragssteller bei der SNSF und ETH um die Finanzierung eines neuartigen Mikroskops (Arctis) ersucht. Das Mikroskop wird es erlauben, Proben mit einem Plasma-Ionenstrahl für die Kryo-EM vorzubereiten. Spezielle Vorteile ergeben sich dabei für Patienten- sowie Umweltproben, welche aufgrund ihrer grossen Volumina mit heutigen Methoden gar nicht oder nur sehr schwer bearbeitet werden können. Die Gesuche wurden im Herbst 2022 bewilligt.

Zusammenfassung der aktuellen Forschungsarbeiten

Entwicklung

- von Instrumenten und Abläufen zur Kryo-Lichtmikroskopie, in Zusammenarbeit mit Carl Zeiss und Leica Microsystems

Weiterentwicklung von Abläufen/Methoden

- um Proben spezifisch auf den Objektträger zu «drucken» (Micropatterning);
- um komplexe Proben mittels Hochdruck einzufrieren;
- um Bakterien in Umweltproben anzureichern und mittels Mikroskopie zu identifizieren. Hier wird speziell an einer neuartigen Methode gearbeitet, mittels welcher Zellen einzeln isoliert und untersucht/identifiziert werden können, nachdem sie mit der Kryo-EM dargestellt wurden;
- für die automatisierte Probenherstellung für die Kryo-ET mithilfe eines fokussierten Ionenstrahls (cryo-focused ion beam milling);
- zur Datenaufnahme mittels Kryo-ET.

Untersuchung von uropathogenen Erregern

Untergruppe Weiss:

Die Untergruppe Weiss besteht aus Projektleiter Gregor Weiss, Doktorandin Karolina Roganowicz und Doktorandin Marlen Petersen und befasst sich mit den Erregern von Harnwegsinfektionen.

Die überwiegende Mehrheit der Harnwegsinfektionen wird durch uropathogene E. coli (UPEC) verursacht. UPEC wurden nicht nur im Urin von Patienten gefunden, sondern auch im Zytoplasma von Uroepithelzellen. In dieser intrazellulären Nische sind UPEC gut gegen Antibiotika oder die Wirtsabwehr geschützt, was zu wiederkehrenden und anhaltenden Infektionen führen kann. Das Hauptziel der Gruppe ist es, den intrazellulären Lebenszyklus von Uropathogenen mit Hilfe eines integrativen Ansatzes basierend auf der Infektionsbiologie und der Strukturbiologie zu verstehen. Eine Kombination aus Lichtmikroskopie und KryoET ermöglicht es, den Infektionszyklus auf mehreren Ebenen zu analysieren.

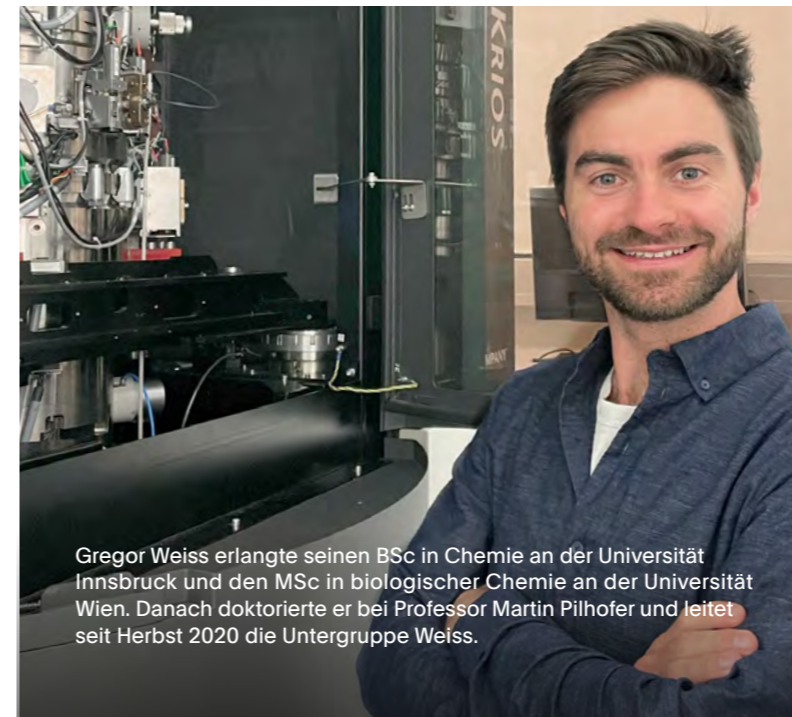
Vom Personalized Health and Related Technologies (<https://www.sfa-phrt.ch>), dem strategischen Forschungsschwerpunkt der Institutionen des ETH-Bereichs, wurde 2021 das Projekt "Towards the

development of cryo-electron tomography as diagnostic tool for recurrent urinary tract infections" unterstützt. In diesem Forschungsprojekt in Zusammenarbeit mit dem Universitätskinderhospital Zürich geht es darum, die KryoET als diagnostisches Instrument für die direkte Analyse von intrazellulären bakteriellen Gemeinschaften in Uroepithelzellen von Patienten mit akuten Harnwegsinfektionen weiterzuentwickeln. Die KryoET ermöglicht Einblicke in die makromolekularen Strukturen infizierter Patientenzellen in noch nie dagewesener Auflösung. In einem ersten Schritt sollen Arbeitsabläufe für die Verarbeitung von Uroepithelzellen aus dem Urin von Patienten für die anschliessende KryoET-Bildgebung etabliert werden. Die Arbeiten werden dazu beitragen, neue Virulenzfaktoren zu entdecken, die bei intrazellulären bakteriellen Gemeinschaften eine Rolle spielen. Längerfristig sollen so neue Ansätze für die Behandlung von Harnwegsinfektionen möglich werden.

Diese Studie wurde inzwischen von der Kantonalen Ethikkommission Zürich positiv beurteilt und die Untergruppe hat begonnen, Urin von Patienten systematisch auf infizierte Uroepithelzellen zu untersuchen. Hierfür wurde eine Aufreinigungsmethode mittels mikrofluidischer Chips im Labor etabliert.

Highlights 2021–2022

Gregor Weiss und seine Gruppe haben von der Lopez Loreta Foundation einen Forschungsbeitrag in der Höhe von EUR 1 Mio. erhalten. Damit soll die Anwendung der KryoET auf klinische Proben weiterentwickelt werden. Insbesondere wird ein Schwerpunkt auf die direkte Analyse von Gewebeproben (Biopsien) gelegt, um die aktuellen diagnostischen Methoden mit diesem hochauflösenden Bildgebungsverfahren zu ergänzen.



Gregor Weiss erlangte seinen BSc in Chemie an der Universität Innsbruck und den MSc in biologischer Chemie an der Universität Wien. Danach doktorierte er bei Professor Martin Pilhofer und leitet seit Herbst 2020 die Untergruppe Weiss.

Publikationen

Komplette Liste auf www.pilhoferlab.ethz.ch/publications

* = equal contribution/co-first author

bold = Pilhofer Lab members

✉ = corresponding author

2022

Casu B, Sallmen JW, ✉ Schlimpert S, ✉ **Pilhofer M**

Cytoplasmic contractile injection systems mediate cell death in *Streptomyces*
[bioRxiv](https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.08.09.503279v1) (www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.08.09.503279v1)

Wohlfarth JC, **Feldmüller M**, Schneller A, Kilcher S, Burkolter M, **Pilhofer M**, Schuppler M, ✉ Loessner MJ

Gram-positive bacteria evade phage predation through endolysin-mediated L-form conversion
[bioRxiv](https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.05.24.493201v1) (www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.05.24.493201v1)

*Kieninger AK, ***Tokarz P**, **Pilhofer M**, ✉ **Weiss GL**, ✉ Maldener I

SepN is essential for assembly and gating of septal junctions in *Nostoc* sp. PCC 7120
[bioRxiv](https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.01.26.477872v1) (www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.01.26.477872v1)

***Weiss GL**, ***Eisenstein F**, Kieninger AK, **Xu J**, **Minas HA**, **Gerber M**, **Feldmüller M**, Maldener I, Forchhammer K, ✉ **Pilhofer M**

Structure of a thylakoid-anchored contractile injection system in multicellular cyanobacteria

[Nature Microbiology](https://www.nature.com/articles/s41564-021-01055-y) (www.nature.com/articles/s41564-021-01055-y)

Read perspectives in [ScienceNews](https://www.sciencenews.org/article/bacteria-molecular-syringe-cells-microscopy) (https://www.sciencenews.org/article/bacteria-molecular-syringe-cells-microscopy) and [Nature Microbiology](https://www.nature.com/articles/s41564-022-01078-z) (www.nature.com/articles/s41564-022-01078-z)

***Xu J**, ***Ericson CF**, **Feldmüller M**, Rutaganira FUN, **Eisenstein F**, **Lien YW**, King N, ✉ **Pilhofer M**

Identification and structure of an extracellular contractile injection system from the marine bacterium *Algoriphagus machipongonensis*

[Nature Microbiology](https://www.nature.com/articles/s41564-022-01059-2) (www.nature.com/articles/s41564-022-01059-2)

Read perspectives in [ScienceNews](https://www.sciencenews.org/article/bacteria-molecular-syringe-cells-microscopy) (www.sciencenews.org/article/bacteria-molecular-syringe-cells-microscopy) and [Nature Microbiology](https://www.nature.com/articles/s41564-022-01078-z) (www.nature.com/articles/s41564-022-01078-z)

Kontakt



Martin Pilhofer
Institute of Molecular Biology & Biophysics
Prof. Dr. Martin Pilhofer
Otto-Stern-Weg 5
HPK F 13
8093 Zürich

Tel.+41 44 633 39 63
pilhofer@mol.biol.ethz.ch



ETH Zürich Foundation
Theresia Büsser
Weinbergstrasse 29
8006 Zürich

Tel. +41 44 633 43 10
theresia.buesser@ethz-foundation.ch

ETH Zürich Foundation
Weinbergstrasse 29
CH-8006 Zürich

T +41 44 633 69 66
E info@ethz-foundation.ch

 ethz-foundation.ch