



Doctoral Thesis

Identification and Characterization of Modulators of the PhyR-NepR-SEcfG cascade in *Sphingomonas melonis* Fr1

Author(s):

Kaczmarczyk, Andreas

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010398184> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

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. 22292

**Identification and Characterization of Modulators of the
PhyR-NepR- σ^{EcfG} cascade in *Sphingomonas melonis* Fr1**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

ANDREAS KACZMARCZYK

MSc ETH Biology (ETH Zurich)

born on 08.10.1983

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Julia A. Vorholt

Prof. Dr. Markus Aebi

Prof. Dr. Matthias Peter

Dr. Anne Francez-Charlot

2014

SUMMARY

In their environment, bacteria constantly face changing conditions and a multitude of stresses, and accordingly have evolved mechanisms to monitor these changes and respond appropriately. Besides specific stress responses, which are activated by and protect against a single stress, many bacteria also possess a so-called general stress response (GSR). The GSR monitors and can be activated by a wide range of different, unrelated stresses and provides protection against a multitude of adverse conditions. Thus, the GSR is a multiple, preventive stress response.

In Alphaproteobacteria, the GSR is regulated by the alternative ECF (extracytoplasmic function) sigma factor σ^{EcfG} . The activity of σ^{EcfG} is controlled through a partner switching mechanism that involves the anti-sigma factor NepR and the anti-anti sigma factor PhyR, which is a response regulator. According to the current model, in unstressed conditions σ^{EcfG} is prevented from RNA polymerase binding through sequestration by its anti-sigma factor NepR. Upon stress, PhyR is phosphorylated and binds NepR, thereby releasing σ^{EcfG} . Because PhyR uses a sigma factor-like domain to bind NepR, this partner switching mechanism has been termed "sigma factor mimicry". Since phosphorylation of the response regulator PhyR is the trigger of the partner switch, one particular question concerned the identity of the histidine kinases that would sense stresses and activate the GSR. The main goal of this thesis was to study the signal transduction pathways that lead to PhyR phosphorylation in *Sphingomonas melonis* Fr1. Because only few genetic techniques were available for this phyllosphere isolate, part of this thesis also involved the development of genetic tools for this organism.

A first step was to study the role of PhyR, NepR and σ^{EcfG} in the GSR of *S. melonis* Fr1. It was demonstrated that the partner switch originally described in *Methylobacterium extorquens* AM1 is conserved in *S. melonis* Fr1 and contributes to multiple stress resistance and competitiveness in the phyllosphere. Furthermore, in collaboration with the group of Fred Allain (ETHZ), structural and mechanistic aspects of the core partner switch were studied, providing further support of the partner-switching model and the concept of "sigma factor mimicry" at the atomic level. Next, the putative histidine kinase-encoding gene at the *phyR* locus was studied, called *phyP*. It was found that rather than acting as a kinase of PhyR, PhyP acts as a phosphatase of PhyR, preventing lethal hyperactivation of the GSR in non-stress conditions. Using genetic and biochemical approaches, it was subsequently found that at least seven histidine kinases, called Paks (PhyR-activating kinases), encoded elsewhere in the genome contribute to the GSR by directly phosphorylating PhyR. It was further demonstrated that Paks are not functionally redundant, but respond to different sets of stresses. All of these histidine kinases belong to two particular classes of histidine kinase, HWE- and HisKA_2-type kinases. Last, several single-domain response regulators were identified that positively or negatively affect the GSR. One of these regulators, SdrG, was shown to positively regulate the GSR upstream of PhyR and to be

directly phosphorylated by the same kinases that phosphorylate PhyR. The other single-domain response regulators negatively affect the GSR upstream of PhyR and SdrG in a way that requires those Paks next to which they are encoded. Thus, these studies established the GSR in *S. melonis* Fr1 as a complex and interwoven network of two-component systems and laid the groundwork for further in-depth studies. It is furthermore proposed that HWE/HisKA_2 kinases might play a more common role as PhyR kinases in other Alphaproteobacteria than anticipated, and that complex two-component signaling might be a conserved feature of the alphaproteobacterial GSR.

ZUSAMMENFASSUNG

In Ihrer Umgebung sind Bakterien sich ständig ändernden Bedingungen und einer Vielzahl von Stressen ausgesetzt; entsprechend haben sie Mechanismen entwickelt, diese Bedingungen zu überwachen und angemessen darauf zu reagieren. Neben spezifischen Stressantworten, die durch einen einzelnen Stress aktiviert werden und spezifisch vor diesem schützen, besitzen Bakterien häufig zusätzlich eine sogenannte allgemeine Stressantwort ("general stress response", GSR). Die GSR überwacht ein breites Spektrum an unterschiedlichen Stressen und bietet Schutz gegen eine Vielzahl von ungünstigen Bedingungen. Die GSR wird deshalb auch als multiple und präventive Stressantwort bezeichnet.

In Alphaproteobakterien ist die GSR durch den alternativen ECF ("extracytoplasmic function") Sigma-Faktor σ^{EcFG} reguliert. Die Aktivität des Sigma-Faktors wird durch einen Partner-Austausch-Mechanismus kontrolliert, der den Anti-Sigma-Faktor NepR und den Anti-Anti-Sigma-Faktor PhyR einschliesst. PhyR gehört zur Klasse der sogenannten Antwort-Regulatoren ("response regulators"). Das gegenwärtige Modell postuliert, dass σ^{EcFG} in Abwesenheit von Stress durch den Anti-Sigma-Faktor NepR gebunden wird und somit die Bindung des Sigma-Faktors an die RNA-Polymerase verhindert. Unter aktivierenden Bedingungen wird PhyR phosphoryliert und bindet NepR, wodurch die Freigabe von σ^{EcFG} erfolgt. Da PhyR eine Sigma-Faktor-ähnliche Domäne verwendet, um NepR zu binden, wurde dieser Mechanismus als Sigma-Faktor-Mimikry bezeichnet. Da die Phosphorylierung des Antwort-Regulators PhyR der Auslöser des Partner-Austausch-Mechanismus ist, stellt sich die wichtige Frage, welche Kinasen für diese Modifikation verantwortlich sind und die GSR aktivieren. Das Hauptziel dieser Arbeit war die Identifizierung der Kinasen und anderer Modulatoren von PhyR im Bakterium *Sphingomonas melonis* Fr1. Da nur sehr wenige genetische Methoden für dieses erst kürzlich von Pflanzen isolierte Bakterium existierten, beinhaltete ein Teil dieser Arbeit die Entwicklung solcher genetischer Werkzeuge.

Ein erster Schritt war, die Rolle von PhyR, NepR und σ^{EcFG} in der GSR von *S. melonis* Fr1 zu studieren. Es konnte gezeigt werden, dass der Partner-Austausch-Mechanismus, der ursprünglich für *Methylobacterium extorquens* AM1 beschrieben wurde, in *S. melonis* Fr1 konserviert ist und zu multipler Stressresistenz sowie zur Wettbewerbsfähigkeit in der Phyllosphäre beiträgt. Desweiteren wurden in Kollaboration mit der Gruppe von Fred Allain (ETHZ) verschiedene strukturelle und mechanistische Aspekte des Partner-Austausch-Mechanismus untersucht, welche das ursprüngliche Modell und das Konzept der Sigma-Faktor-Mimikry auf atomarer Ebene unterstützten. Als Nächstes wurde die Rolle der vermeintlichen Kinase, die in der *phyR* Region kodiert ist und PhyP genannt wurde, untersucht. Es wurde gezeigt, dass PhyP keine Kinase, sondern vielmehr eine Phosphatase von PhyR ist und die letale Überaktivierung der GSR verhindert. Mithilfe genetischer und biochemischer Methoden konnte in der Folge gezeigt werden, dass mindestens sieben Kinasen, die an anderer Stelle

im Genom kodiert sind, zur Aktivität der GSR beitragen, indem sie unmittelbar PhyR phosphorylieren. Diese Kinasen wurden Paks genannt, was für PhyR-aktivierenden Kinasen ("PhyR-activating kinases") steht. Ausserdem wurde gezeigt, dass diese Kinasen nicht vollkommen redundant sind, sondern differenzierte Rollen in unterschiedliche Bedingungen wahrnehmen. Interessanterweise gehören all diese Kinasen zu einer bestimmten Klasse, den sogenannten HWE- und HisKA_2-Typ Kinasen. Schliesslich wurden mehrere sogenannte Einzel-Domänen-Antwort-Regulatoren ("single-domain response regulators") identifiziert, die die GSR positive oder negative beeinflussen. Einer dieser Regulatoren, genannt SdrG, reguliert die GSR in einer PhyR genetisch vorgeschalteten Weise und wird von denselben Kinasen phosphoryliert, die auch PhyR phosphorylieren. Die anderen Einzel-Domänen-Antwort-Regulatoren beeinflussen die GSR in negativer Weise und sind PhyR, genetisch gesehen, ebenfalls vorgeschaltet; weiterhin hängt dieser Einfluss von jenen Kinasen (Paks) ab, die nebenstehend zu den jeweiligen Einzel-Domänen-Antwort-Regulatoren kodiert sind. Diese Arbeit etabliert demzufolge die GSR in *S. melonis* Fr1 als komplexes und verflochtenes Netzwerk von Zwei-Komponenten-Systemen und legt das Fundament für zukünftige eingehendere Studien. Es wird ausserdem vorgeschlagen, dass HWE- und HisKA_2-Typ Kinasen eine allgemeinere Rolle in der GSR spielen könnten als bisher angenommen und dass komplexe Signaltransduktionswege eine konservierte Eigenschaft der alphaproteobakteriellen GSR sein könnten.