



Doctoral Thesis

## **Role of General Stress Response in Trehalose Biosynthesis for Functional Rhizobia-Legume Symbiosis**

**Author(s):**

Ledermann, Raphael

**Publication Date:**

2017

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000202317> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**Role of general stress response in trehalose biosynthesis for  
functional rhizobia-legume symbiosis**

A thesis submitted to attain the degree of  
**DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH**  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**Raphael Lucien Ledermann**

M.Sc. in Biology, ETH Zurich

born on 10.01.1988

citizen of Affoltern i.E., Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Hans-Martin Fischer

Prof. Dr. Julia A. Vorholt

Prof. Dr. Beat Christen

Dr. Xavier Perret

2017

## Abstract

To cope with changing environments, bacteria need to monitor thoroughly a plethora of different parameters. This includes external factors such as osmotic pressure, pH, temperature, irradiation, or nutrient availability but also internal factors such as energy state. Depending on the species, each parameter has a window, in which optimal growth occurs. Non-optimal conditions are generally referred to as stress and may result in either limited growth, dormancy, or death of the bacterium. Although they can be very diverse, most stresses cause damage to macromolecules such as proteins, lipids (membranes), or nucleic acids. To limit the adverse effects of stress conditions, an unfavorable condition is sensed and an appropriate response is mounted. For many stressful conditions, a specific response occurs. Examples include (i) responses to reactive oxygen and nitrogen species, which result in the production of detoxifying enzymes (*e.g.* catalases, peroxidases, superoxide dismutases), (ii) the SOS response, mounted as a reaction to DNA damage (*e.g.* after irradiation), which results in production of DNA repair enzymes (*e.g.* recombinases, excision repair endonucleases, ligases, DNA polymerases), and (iii) the heat shock response which produces *e.g.* chaperones to enhance protein stability and proteases to degrade misfolded proteins. Besides such specific responses, some bacteria also can mount a general stress response (GSR). GSR systems have been found in phylogenetically distinct bacteria, and likewise, the regulators of GSR systems are not related. Instead, common to GSR is cross protection. This term describes the fact that a GSR is mounted in response to a variety of stresses and results in the production of different factors and in physiological adaptations alleviating negative effects of a range of stresses. Hence, induction of the GSR by one stress condition renders the bacterium more tolerant against completely unrelated stresses as well.

In  $\alpha$ -proteobacteria, the GSR core regulators are the alternative  $\sigma$  factor  $\sigma^{\text{EcfG}}$ , its cognate anti- $\sigma$  factor NepR, and the anti- $\sigma$  factor antagonist PhyR. A variety of sensors, often sensory histidine kinases, are responsible for detection of different types of stresses, which ultimately lead to (direct or indirect) PhyR phosphorylation. This causes a conformational switch of PhyR, exposing its  $\sigma$  factor-like domain, which has a higher affinity for NepR than the actual  $\sigma$  factor  $\sigma^{\text{EcfG}}$ . Hence, phosphorylated PhyR titrates NepR away from  $\sigma^{\text{EcfG}}$ , which was previously bound and thus rendered inactive by NepR. Thereby freed  $\sigma^{\text{EcfG}}$  redirects transcription to stress response genes.

A subclass of  $\alpha$ -proteobacteria, generally referred to as rhizobia, are capable of establishing an endosymbiosis with legume plants. Thereby, bacteria enter plant roots after specific chemical cross talk and end up in plant cells of genuine plant organs called root nodules. There, they fix atmospheric dinitrogen to ammonia, which is exchanged with the plant for reduced carbon sources and other nutrients. When either *ecfG* or *phyR* is deleted, the soybean (*Glycine max*) symbiont *Bradyrhizobium diazoefficiens* fails to establish a wild type-like symbiosis. To study the role of the GSR in the *B. diazoefficiens*–soybean symbiosis, we first developed a set of novel genetic tools for this bacterium. These include (i) fluorescent and enzymatic tags, stably integrated into the chromosome for *in planta* observations of the bacteria, (ii) a streamlined system for targeted gene deletion and (iii) constructs allowing controlled inducible gene expression. With the help of these novel tools, we show that the GSR of *B. diazoefficiens* is mounted against a variety of stresses (salts, hyperosmosis, elevated temperature, alkaline pH). Furthermore, the GSR is also induced during early time point of symbiosis, when bacteria are trapped in curled root hairs and form microcolonies before they enter the root via the so-called infection threads (ITs). However, the GSR is neither active in rhizosphere-colonizing bacteria nor in nitrogen-fixing endosymbionts (bacteroids). Likewise, we found that the aberrant symbiosis of GSR mutants is due to their ineffective IT formation ability.

The genome of *B. diazoefficiens* encodes a set of 11 sensory histidine kinases (HhkA through HhkK) which all comprise a characteristic HRxxN amino acid sequence motif and are candidates for activation of the GSR in stressed free-living cells and root hair-entrapped bacteria. Because single deletion mutants lacking individual *hhk* genes showed a wild type-like phenotype when inoculated on soybean plants, we suspected functional redundancy and started to generate multiple deletion mutants. When the symbiotic phenotype of septuple and decuple mutants was determined, we found an increasing delay in nodulation with increasing number of *hhk* kinase gene deletions. Furthermore, some of the multiple mutants lost the ability to mount the GSR in response to selected stresses encountered in free-living bacteria. This further supports a partial redundancy in function between different Hhk kinases in sensing the same stress.

Finally, we investigated the  $\sigma^{\text{EcfG}}$  regulon to find gene (products) needed for proper IT formation. We deleted a series of candidate genes and found that deletion or misregulation of two  $\sigma^{\text{EcfG}}$ -controlled genes involved in trehalose biosynthesis, *otsA* and *otsB*, phenocopied  $\Delta\text{phyR}$  and  $\Delta\text{ecfG}$  mutants. OtsA is a trehalose-6-phosphate synthase using glucose-6-phosphate and UDP-glucose as substrates while OtsB is a trehalose-6-phosphate phosphatase. Besides *otsA* and *otsB*, *B. diazoefficiens* encodes two alternative trehalose biosynthesis pathways. However, mutants with all respective genes deleted were not disturbed with respect to trehalose accumulation in free-living cells and symbiotic performance. On the other hand, overexpression of *Escherichia coli* *treF*, coding for a cytoplasmic trehalase, in a *B. diazoefficiens* wild-type background resulted in a similar phenotype as deletion of *otsA* and/or *otsB*. Furthermore, complementation assays with *otsA* and *otsB* controlled by different promoters indicated that fine-tuned spatio-temporal expression of these genes mediated by  $\sigma^{\text{EcfG}}$ -dependent regulation is crucial for functional symbiosis.

Overall, this thesis documents that the *B. diazoefficiens*  $\Delta\text{ecfG}$  mutant phenotype in symbiosis with soybean is due to the lack of *otsA* and *otsB* expression. This pathway represents the major source of trehalose in *B. diazoefficiens*. Trehalose is needed during IT formation but its synthesis is detrimental for nitrogen fixation in bacteroids. Likewise, the natural  $\sigma^{\text{EcfG}}$ -dependent regulation of *otsA* and *otsB* ensures just this correct spatio-temporal expression.

## Résumé

Afin de faire face à des changements de leur environnement, les bactéries doivent soigneusement contrôler une pléiade de paramètres. Ces derniers comprennent par exemple la pression osmotique, le pH, les radiations, ou encore la disponibilité en nutriments, mais aussi des facteurs internes tels que le statut énergétique. Selon l'espèce considérée, chacun de ces paramètres varie dans une gamme qui assure une croissance optimale. A l'inverse, des conditions non-optimales sont considérées comme des stress qui peuvent provoquer une croissance limitée, une entrée en dormance ou encore la mort des bactéries. Bien que variés, la plupart des stress entraînent des dommages au niveau des macromolécules telles que les protéines, les lipides (membranaires), ou les acides nucléiques. Pour pallier ces effets induits par des stress, une condition non-favorable doit être perçue afin de mettre en place une réponse appropriée. Pour chacune des nombreuses conditions de stress, il existe un système de réponse spécifique, par exemple (i) lors des réponses aux espèces activées de l'oxygène et de l'azote qui impliquent la production d'enzymes de détoxification (e.g. catalases, peroxidases, superoxide dismutases), (ii) lors de la réponse SOS, suite aux dommages à l'ADN, qui impliquent la production d'enzymes de réparation de l'ADN (e.g. recombinaisons, endonucléases de réparation par excision de bases, ligases, ADN polymérases), et (iii) lors de la réponse au choc thermique qui entraîne la production de chaperonnes pour la stabilisation des protéines et de protéases pour la dégradation des protéines mal repliées. En complément à de telles réponses spécifiques, certaines bactéries ont la faculté de mettre en place une réponse générale au stress (GSR). Ces systèmes GSR sont présents chez des bactéries distantes d'un point de vue phylogénétique mais sont régulés par différents acteurs. A l'inverse, la protection croisée constitue le point commun entre ces différents GSR. Le concept de protection croisée illustre le fait que le GSR peut être induit par divers stress, induisant en aval la production de facteurs variés et permettant une adaptation physiologique atténuant les effets négatifs de plusieurs stress. En d'autres termes, l'induction du GSR par un stress donné entraîne chez la bactérie une résilience accrue aussi à d'autres stress que celui inducteur.

Chez les  $\alpha$ -protéobactéries, les régulateurs centraux du GSR sont le facteur alternatif  $\sigma$ ,  $\sigma^{\text{EcfG}}$ , son facteur anti- $\sigma$ , NepR, et l'antagoniste du facteur anti- $\sigma$  PhyR. Des senseurs variés, le plus souvent des récepteurs de type histidine kinase, sont responsables de la perception des différents types de stress, suivi de la phosphorylation de PhyR, s'effectuant de façon directe ou non. Une fois phosphorylée, PhyR subit un changement de conformation, exposant ainsi son domaine de type  $\sigma$  factor, caractérisé par une affinité supérieure à celle de  $\sigma^{\text{EcfG}}$  pour NepR. Ainsi, la forme PhyR phosphorylée entre en compétition avec  $\sigma^{\text{EcfG}}$  pour la liaison à NepR, libérant ainsi  $\sigma^{\text{EcfG}}$ , dont la liaison à NepR le rendait inactif. Finalement, la forme libre de  $\sigma^{\text{EcfG}}$  stimule la transcription de gènes de réponse aux stress.

Chez les  $\alpha$ -protéobactéries, des bactéries communément appelées rhizobia peuvent établir une endosymbiose avec les plantes de la famille des légumineuses. Ainsi, ces bactéries pénètrent les racines de l'hôte à la suite d'une signalisation réciproque et spécifique et sont ensuite présentes sous une forme intracellulaire au sein d'organes spécialisés appelés les nodosités racinaires. À ce niveau, les bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ammonium au bénéfice de l'hôte végétal et en échange de sources de carbone réduit et d'autres nutriments. Lorsque *ecfG* ou *phyR* sont délétés, le symbiote du soja, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, est incapable d'établir une symbiose comme une bactérie sauvage. Afin d'étudier le rôle du GSR au cours de la symbiose *B. diazoefficiens* – soja, nous avons tout d'abord développé une série d'outils nouveaux pour cette bactérie. Ces derniers incluent (i) des fusions enzymatiques et fluorescentes, intégrées de façon stable dans le chromosome, permettant l'observation *in planta* de la bactérie, (ii) un système optimisé et simplifié pour la délétion ciblée de gènes, et (iii) des systèmes permettant l'induction contrôlée de l'expression génique. En

utilisant ces outils, nous avons montré que le GSR de *B. diazoefficiens* est induit en réponse à une variété de stress (stress salin, hyperosmotique, thermique et alcalin). En outre, le GSR est également induit au cours des étapes précoces de la symbiose, notamment lorsque les bactéries sont internalisées sous la forme de micro-colonies par le recourbement des poils racinaires, avant qu'elles ne pénètrent la racine sous la forme de cordons d'infection. Cependant, le GSR n'est ni activé chez les bactéries colonisant la rhizosphère ni dans celles fixent d'azote (bactéroïdes). Finalement, nous avons montré que la déficience symbiotique pour des mutants du GSR peut s'expliquer par leur capacité réduite à former des cordons d'infection.

Le génome de *B. diazoefficiens* permet de prédire un jeu de 11 récepteurs de type histidine kinase (de HhkA à HhkK) qui contiennent tous le motif caractéristique constitué des acides aminés HRxxN. Ces dernières représentent autant de protéines candidates pour l'activation du GSR dans des conditions de stress en vie libre ou lors de l'internalisation dans les poils racinaires. Puisque les simples mutants dépourvus d'un seul gène *hhk* sont caractérisés par un phénotype symbiotique identique aux individus sauvages, nous avons émis l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle et ainsi généré des combinaisons multiples de mutants *hhk*. Au cours de l'analyse des septuple et décuple mutants pendant la symbiose, nous avons montré un retard de nodulation qui augmente avec le nombre de délétions *hhk*. Par ailleurs, certains des mutants multiples *hhk* ont perdu la capacité d'induire le GSR en réponse à un stress donné en conditions de vie libre. Collectivement, ces données confortent donc l'idée qu'une redondance fonctionnelle partielle existe entre les différents récepteurs de types histidine kinase en réponse à un même stress.

Finalement, nous avons étudié le régulon contrôlé par  $\sigma^{\text{EcfG}}$  afin d'identifier les (produits de) gènes nécessaires à la formation des cordons d'infection. Nous avons délété une série de gènes candidats et montré que la délétion ou la dérégulation des gènes *otsA* et *otsB*, tous deux contrôlés par  $\sigma^{\text{EcfG}}$  et impliqués dans la biosynthèse du tréhalose, provoquent des phénotypes identiques à ceux observés pour les mutants *phyR* et *ecfG*. *OtsA* est une trehalose-6-phosphate synthase qui utilise le glucose-6-phosphate et l'UDP-glucose comme substrats. *OtsB*, quant à elle, est une trehalose-6-phosphate phosphatase. Outre la voie *OtsA-OtsB*, il existe aussi deux autres voies alternatives de biosynthèse du tréhalose chez *B. diazoefficiens*. Cependant, les mutants de l'ensemble des gènes impliqués dans ces deux voies alternatives ne sont pas plus perturbés pour l'accumulation du tréhalose dans les cellules en vie libre que pour leur performance symbiotique. Par ailleurs, la surexpression chez un fond sauvage de *B. diazoefficiens* d'une trehalase cytoplasmique issue d'*Escherichia coli*, *treF*, entraîne des phénotypes similaires que ceux provoqués par les délétions d'*otsA* et/ou *otsB*. En outre, les tests de complémentation par *otsA* et *otsB* sous contrôle de différents promoteurs indiquent qu'un contrôle spatio-temporel particulièrement fin de leur expression par les régulations dépendantes du facteur  $\sigma^{\text{EcfG}}$  est crucial pour une symbiose fonctionnelle.

Dans l'ensemble, cette thèse démontre que le phénotype symbiotique observé chez le mutant  $\Delta\text{ecfG}$  est dû à l'absence d'expression d'*otsA* et *otsB*. Cette voie de biosynthèse représente la source prépondérante de tréhalose chez *B. diazoefficiens*. Au cours de la symbiose, le tréhalose est nécessaire au cours de la formation des cordons d'infection mais n'en demeure pas moins néfaste pour la fixation de l'azote par les bactéroïdes, l'expression correcte d'*otsA* et *otsB* au niveau spatio-temporel étant garantie par les régulations dépendantes du facteur  $\sigma^{\text{Ecf}}$