



Doctoral Thesis

Signal Transduction in the General Stress Response in *Sphingomonas Melonis* Fr1

Author(s):

Gottschlich, Lisa

Publication Date:

2018

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. 25603

Signal transduction in the general stress response in *Sphingomonas melonis* Fr1

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

presented by

Lisa Gottschlich

Diploma in Biochemistry,
Goethe University Frankfurt
Germany

born on 06.09.1988
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Julia A. Vorholt
Prof. Dr. Urs Jenal
Prof. Dr. Martin Ackermann

2018

Abstract

Bacteria can counteract stressful environmental fluctuations with specific stress responses as well as the so-called general stress response (GSR). The latter can be activated by different unrelated factors and renders the bacteria more resistant towards multiple stress stimuli ("cross-protection"). Alternative sigma factors serve as the master regulators of the GSR. In alphaproteobacteria, the GSR is regulated by an ECF (extracytoplasmic function) sigma factor, whose activity is controlled by a conserved partner-switching mechanism, which involves an anti-sigma factor and a response regulator, acting as an anti-sigma factor antagonist. The conformational equilibrium of the latter is shifted towards the active state upon phosphorylation mediated by signal-integrating histidine kinases. In the active conformation, the N-terminal sigma factor-like domain becomes available for sequestering the anti-sigma factor from the sigma factor, a mechanism which has been termed "sigma factor mimicry". The sigma factor then binds to the RNA polymerase and thereby redirects transcription. In contrast to this conserved core mechanism, signal perception, the transcriptional output of the GSR, as well as implementation of additional regulators depend on the lifestyle and the evolutionary history of the different alphaproteobacteria. In the plant-protecting alphaproteobacterium *Sphingomonas melonis* Fr1, seven GSR-activating HWE/HisKA2 histidine kinases (PakA-G) have been identified. In addition, *S. melonis* Fr1 harbors the single domain response regulator SdrG, which positively regulates the GSR.

In this thesis, the activation mechanism of SdrG was characterized. Phosphorylation induces a shift towards the active conformation, which includes repositioning of aromatic residues in and around the conserved "FATGUY" motif. The phosphorylated Asp-residue is mainly stabilized by a conserved Lys-residue. In a subsequent part, SdrG was found to act together with PhyP in a GSR-activating phosphorelay. Instead of the previously assumed function of PhyP as a phosphatase, it was found that the protein transfers phosphoryl groups from SdrG to PhyR. Based on this finding, PhyP was renamed as PhyT (PhyR phosphotransferase). Furthermore, it was found that PhyT sequesters PhyR from direct phosphorylation by the Paks through complex formation. Using transcriptome analyses, the core EcfG regulon under low stress conditions was identified, including genes encoding typical stress response proteins, but also proteins associated for example with metabolism, transport and envelope modulation. In addition, genes encoding regulatory proteins, as well as proteins of unknown function were found. Transcriptional adaptation of the GSR in *S. melonis* Fr1 upon exposure to a mixture of three stress inducers resulted in an enlarged EcfG regulon and a stronger induction of the genes present in the core regulon. The transcriptome analyses resulted in the identification of the EcfG-dependent NepR (anti-sigma factor)-like negative GSR feedback regulator NepR2. Furthermore, the data revealed that

exposure to the stress mix caused an SdrG- and Pak-dependent downregulation of genes encoding motility- and biofilm formation-associated proteins. Overall, it was shown that the GSR in *S. melonis* Fr1 is subject to a multilayered regulation to optimize resource allocation, while preventing lethal overactivation of the GSR.

Zusammenfassung

Bakterien können sich Stress-induzierenden Umweltveränderungen sowohl durch spezifische als auch durch eine sogenannte generelle Stressantwort (GSR) entgegensetzen. Letztere kann durch verschiedene, beziehungsweise unabhängige Faktoren aktiviert werden und führt zu einer höheren Resistenz von Bakterien gegenüber multiplen Stress Stimuli (Kreuzimmunität). Alternative Sigmafaktoren gelten als Masterregulatoren der GSR. In Alphaproteobakterien wird die GSR durch einen ECF (extracytoplasmische Funktion) Sigmafaktor reguliert, dessen Aktivität durch einen konservierten "Partner-Austausch"-Mechanismus kontrolliert wird. Dieser beinhaltet neben dem Sigmafaktor einen anti-Sigmafaktor, sowie einen sogenannten "Response Regulator", der als anti-Sigmafaktor-Antagonist agiert. Letzterer wird durch Signal-integrierende Histidinkinasen phosphoryliert, was eine Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts in Richtung der aktiven Konformation zur Folge hat. Daraufhin wird die N-terminale, Sigmafaktor-ähnliche Domäne des anti-Sigmafaktor Antagonisten zugänglich für eine Bindung durch den anti-Sigmafaktor. Dieser Vorgang wird auch als "Sigmafaktor Mimikry" bezeichnet. Folglich kann der Sigmafaktor an die RNA Polymerase binden und somit die Transkription entsprechend anpassen. Im Gegensatz zu diesem konservierten Prinzip, sind die Signalerkennung, die transkriptionelle Antwort, sowie zusätzliche Regulatoren an die Lebensweise, sowie die evolutionäre Geschichte verschiedener Alphaproteobakterien angepasst. Im Pflanzen-schützenden Bakterium *Sphingomonas melonis* Fr1 konnten sieben GSR-aktivierende HWE/HisKA2 Histidinekinasen (PakA-G) identifiziert werden. Zudem besitzt *S. melonis* Fr1 einen Einzeldomänen "Response Regulator", SdrG, der als positiver GSR Regulator fungiert.

In dieser Arbeit wurde der Aktivierungsmechanismus von SdrG charakterisiert. Durch Phosphorylierung wird eine Verschiebung in Richtung der aktiven Konformation induziert. Dieser Prozess beinhaltet eine Reorientierung aromatischer Aminosäuren im und um das konservierte "FATGUY" Motif. Das phosphorylierte Aspartat wird hauptsächlich durch ein konserviertes Lysin stabilisiert. Im nächsten Schritt hat sich gezeigt, dass SdrG zusammen mit PhyP in einem GSR-aktivierenden Phosphorelay agiert. Anders als zunächst angenommen, fungiert PhyP nicht als Phosphatase, sondern als ein Protein, das Phosphorylgruppen von SdrG auf PhyR transferiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde PhyP in PhyT (PhyR Phosphotransferase) umbenannt. Zudem zeigte sich, dass PhyT einen Komplex mit PhyR bildet und dadurch eine direkte Phosphorylierung durch die Paks verhindert. Durch Transkriptomanalyse wurde das grundlegende EcfG-Regulon unter geringer Stressbelastung charakterisiert. Dieses beinhaltet Gene, die sowohl typische Stressantwort Proteine kodieren, als auch solche, die zum Beispiel mit Metabolismus,

Transportprozessen und der Modulierung der bakteriellen Hülle assoziiert werden können. Zusätzlich wurden Gene gefunden, die regulatorische Proteine oder Proteine unbekannter Funktion kodieren. Es konnte gezeigt werden, dass sich *S. melonis* Fr1 auf transkriptioneller Ebene an die Konfrontation mit einem aus drei Komponenten bestehenden Stressgemisch anpasst. Ein vergrößertes EcfG-Regulon wurde beobachtet, sowie eine stärkere Induktion derjenigen Gene, die bereits Teil des grundlegenden EcfG-Regulons sind. Die Transkriptomanalyse hat auch zur Identifizierung des EcfG-abhängigen NepR (anti-Sigmafaktor)-artigen, negativen GSR Feedback Regulators NepR2 geführt. Zudem wurde festgestellt, dass das Stressgemisch in Abhängigkeit von SdrG und den Paks zu einer Herunterregulation von Genen führt, welche Proteine kodieren, die mit Motilität und Biofilm Bildung assoziiert werden können. Insgesamt wurde gezeigt, dass die GSR in *S. melonis* Fr1 einer vielschichtigen Regulation unterliegt. Auf dieser Grundlage kann die Ressourcenzuteilung optimiert werden, während eine Überaktivierung der GSR verhindert werden kann.