



HAL
open science

Physiological roles of Eukaryotic Hanks type Ser/Thr kinase in transition to stationary phase in *Bacillus subtilis*

Ahasanul Kobir

► **To cite this version:**

Ahasanul Kobir. Physiological roles of Eukaryotic Hanks type Ser/Thr kinase in transition to stationary phase in *Bacillus subtilis*. Agricultural sciences. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. English. NNT : 2012PA112259 . tel-00911812

HAL Id: tel-00911812

<https://theses.hal.science/tel-00911812>

Submitted on 30 Nov 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

La phosphorylation des protéines est un attachement covalent d'un groupement phosphate à une protéine et elle est l'une des modifications post-traductionnelles intracellulaires les plus courantes et les mieux caractérisées chez les procaryotes et les eucaryotes (Pawson *et al.*, 2005). La phosphorylation des protéines participe à la régulation cellulaire et plus particulièrement à des voies de transduction du signal (Hanks *et al.*, 1998 et Cozzone *et al.*, 1998). La phosphorylation des protéines sur la sérine, la thréonine, et la tyrosine (Ser / Thr / Tyr) a été largement étudiée chez les eucaryotes (Ptacek *et al.*, 2005 et Manning *et al.*, 2002), mais on sait très peu sur son l'ampleur et les rôles physiologiques chez les bactéries et archées (Deutscher *et al.*, 2005a). Il est intéressant de noter que la régulation de la virulence bactérienne est souvent lié à la signalisation via phosphorylation sur Ser / Thr / Tyr (Cozzone *et al.*, 2005).

Dans certains cas, des kinases et phosphatases bactériennes interfèrent avec la transduction du signal eucaryote, pour rendre l'hôte moins résistant aux infections bactériennes (Hatakeyama *et al.*, 2005 et Selbach *et al.*, 2003). Récentes études phosphoprotéomiques ont identifié des nombreux sites de phosphorylation chez les bactéries : 103 chez *Bacillus subtilis*, 105 chez *Escherichia coli*, 73 chez *Lactococcus lactis*, 81 chez *Halobacterium salinarum*, 117 chez *Klebsiella pneumoniae*, 55 chez *Pseudomonas aeruginosa*, 53 chez *P. putida*, 163 chez *Streptococcus pneumoniae* et 516 chez *Mycobacterium tuberculosis* (mise à jour à partir de Mijakovic *et al.*, 2012). Chez *M. tuberculosis* un total de 21 sérines et / ou thréonines phosphorylés ont été identifiés dans les régions intracellulaires de protéines kinases PknA, PknH et PknL (Molle *et al.*, 2006 et Canova *et al.*, 2008). Il a été suggéré que la phosphorylation de ces protéines kinases régule des propriétés de virulence de *M. tuberculosis*. Les études de phosphoprotéome ont généré de longues listes de phosphoprotéines, et les prochaines étapes importantes consisteront à identifier les kinases / phosphatases qui phosphorylent / déphosphorylent ces protéines et les rôles physiologiques

des événements de phosphorylation. Le premier objectif devrait être atteint en comparant les phosphoprotéines de souche sauvage et KO de kinase / phosphatase. Deuxièmement, la dynamique de la phosphorylation pourrait être étudiée plus profondément, afin de voir comment le phosphoprotéome change en fonction de certaines conditions physiologiques. Cela peut se faire par une approche appelée SILAC (Ong *et al.*, 2002). Enfin, une tâche ardue consistera à identifier les rôles physiologiques des événements de phosphorylation. Ce travail de thèse a été consacré à cette tâche chez *B. subtilis*, un organisme modèle pour les bactéries à Gram-positives et bas contenu de GC (Kouwen *et al.*, 2007). Dans cet organisme modèle, plusieurs phénomènes complexes de régulation tels que la sporulation, la compétence naturelle, la dégradation enzymatique, réparation de l'ADN et la mutagenèse, la réglementation et la régulation réponse SOS catabolique ont été étudiés (Macek et Coll., 2007 & Michael *et al.*, 2003). Du point de vue biotechnologique, il est également un organisme très important car il est utilisé comme usine cellulaire pour la production d'enzymes. *B. subtilis* a été optimisé pour la sécrétion des protéines hétérologues pour la production d'enzymes actives et stables (Brockmeier *et al.*, 2006). Parmi les bactéries, cet organisme se distingue par des études approfondies sur la phosphorylation des protéines sur tyrosine (Mijakovic *et al.*, 2005). Phosphoprotéines identifiés chez les bactéries ont une large distribution fonctionnelle, la majorité d'entre eux ayant des rôles enzymatiques (Macek et Coll., 2007). Certains phosphoprotéines bactériennes sont impliqués dans le métabolisme du carbone, la motilité, la synthèse des antibiotiques, la réponse SOS, métabolisme de l'ADN et la réponse au stress, mais les fonctions d'une partie importante des phosphoprotéines dans les bactéries sont encore inconnus (Soufi *et al.*, 2008b). Pour cette étude, trois phosphoprotéines importantes ont été choisis: a) deux régulateurs globaux de la phase de transition DegS et AbrB et, b) une recombinase générale RecA, qui joue un rôle majeur dans la réparation des cassures à double brin et la recombinaison homologue. Les kinases bactériennes régulent souvent les processus

physiologiques dans la phase de transition de la croissance bactérienne. Phosphorylation sur les résidus d'acides aminés spécifiques, tels que sérine, thréonine, tyrosine, histidine et aspartate permet de contrôler l'activité de leurs protéines cibles, directement ou indirectement. Au moins trois systèmes de phosphorylation ont été révélés chez les bactéries: systèmes à deux composants, PTS impliqué dans l'absorption du sucre et de la phosphorylation, et finalement la phosphorylation sur sérine / thréonine et tyrosine. Bien que les sérine / thréonine kinases sont identifiés dans de nombreuses espèces bactériennes, les rôles physiologiques de la plupart de ces kinases ne sont pas claires. En ce qui concerne la phosphorylation sur sérine / thréonine, certaines fonctions de régulation de la fonction de phase stationnaire dans *B. subtilis* sont particulièrement bien étudié, par exemple, le partenaire de modules de commutation en réponse sporulation et le stress (Gaidenko *et al.*, 1999 et 2002; Madec *et al.*, 2002). *B. subtilis* possède un type de ser/thr kinase : les kinases de la famille Hanks : PrkC, YbdM et YabT, dont la plupart restent non caractérisés, avec l'exception de PrkC.

Dans cette étude, des essais de phosphorylation *in vitro* ont été utilisées pour identifier lequel de ces kinases sont capables de phosphoryler DegS, AbrB et RecA et ce qui pourrait changer dans leurs rôles biologiques après phosphorylation. Dans ce manuscrit nos conclusions sont les suivantes:

Dans le projet DegS: systèmes à deux composants, DegS / U est un régulateur d'expression de gènes dans la phase de transition chez *B. subtilis*. Ce système de transduction de signal est utilisé par les bactéries pour répondre à des changements dans l'environnement. Ce système de transduction du signal est constitué de deux parties, une histidine kinase (DegS) et un régulateur de réponse cytoplasmique (DegU). DegS reçoit le signal et par conséquence il est autophosphorylée. Ensuite le phosphate est transféré sur DegU. Dans ce travail, le rôle de la

phosphorylation récemment identifié des DegS sur sérine-76 situés a été étudiée avec l'hypothèse de travail que la phosphorylation de la sérine par la kinase de type Hanks pourrait être un signal d'activation de DegS.

DegS est une kinase inhabituelle. Au lieu de recevoir un signal externe, elle reçoit et intègre certains types de signaux différents qui déclenchent son rôle de régulateur transcriptionnel. Lors de l'activation, DegS s'autophosphoryle sur un résidu histidine, mais pas sur la sérine 76. DegS s'est avéré être phosphorylé *in vitro* par des kinases de type Hanks. Il semble peu probable que tous les kinases de type Hanks présents dans *B. subtilis* contribuent également à la phosphorylation de sérine DegS 76. Parmi les trois sérine / thréonine kinases testées, YbdM (nouveau nom est PrkD) et YabT étaient capables de phosphoryler DegS. Parmi elles, seule YbdM était spécifique de la sérine-76 et il est donc plus susceptible d'être la kinase physiologiquement pertinente. DegS, par conséquent, est devenu le premier substrat identifié pour YbdM. Les résultats émergents ont soutenu notre hypothèse de travail: la mutation phosphomimétique *degS* S76D conduit à une autophosphorylation augmentée et le transfert de phosphate vers DegU. Pour confirmer cela, nous avons introduit des gènes codant *degS* S76A (non phosphorylable) et S76D (phosphomimetic) à la place de l'allèle sauvage et nous avons testé l'effet de ce remplacement sur la physiologie de la bactérie. Les résultats suggèrent une augmentation dans le taux de DegU-P dans la souche DegS S76D, qui a affecté la formation de colonies complexes et le développement des compétences. Le point au-dessus des résultats vers phosphorylation de la sérine kinase de type Hanks en étant un signal d'activation pour DegS, et la forme phosphomimetic des résultats DegU dans les niveaux intermédiaires de la phosphorylation *in vivo* DegU. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de la sérine DegS 76 par le YbdM augmente le niveau de phosphorylation de DegU. Cette modification post-traductionnelle serait donc un déclencheur supplémentaire pour ce système à deux composants. Dans cette étude, nous avons établi le premier exemple de « cross talk » entre

une kinase de type Hanks et une kinase à deux composants. Malgré le fait que le système DegS / U a été étudié pendant plus de 25 ans, de nouvelles découvertes sont toujours possibles.

Dans le projet RecA: RecA est bien connu comme une recombinase générale de l'ADN qui joue un rôle central dans la réparation de l'ADN, la recombinaison homologe, métabolisme de l'ADN, l'induction de la réponse SOS et mutagenèse induite par les bactéries. Quand la cellule bactérienne est soumise à l'action nocive des agents endommageant l'ADN, la réponse SOS est allumée. Ce processus est déclenché par simple brin endommagé qui lie RecA qui à son tour sert de co-protéase pour cliver LexA, un répresseur transcriptionnel. Avec LexA répresseur est enlevé, le régulon SOS est activé. Protéine homologue à RecA chez les Eucaryotes est Rad51 et son rôle physiologique est bien étudié. La phosphorylation de Rad51 est également bien établi (Shimizu *et al*, 2009; Flott *et al*, 2011; Yata *et al*, 2012). D'autre part, chez *B. subtilis* RecA n'a pas été aussi bien étudiée et la phosphorylation de RecA n'a pas été signalée auparavant.

Dans ce travail, le rôle de la phosphorylation récemment identifié de RecA sérine-2 situé dans le domaine N-terminal a été étudié avec l'hypothèse de travail que la phosphorylation dépendante de YabT pourrait être un signal d'activation de RecA pour favoriser la formation de foci sur les sites de lésion au cours de développement des spores.

Nous avons d'abord examiné si les kinases de type Hanks peuvent phosphoryler RecA *in vitro*. RecA a été phosphorylée par deux kinases de type Hanks : YabT et YbdM. Seulement YabT était spécifique de la sérine-2, et donc plus susceptible d'être la kinase physiologique pertinente. Étonnamment, nous avons constaté que YabT pouvait se lier sur l'ADN à simple brin ainsi que l'ADN à double brin. Ce résultat intéressant a focalisé notre attention pour caractériser cette kinase inhabituelle. De l'analyse structurale, nous avons constaté une

absence de domaine extracellulaire dans YabT. En plus, YabT contient plusieurs charges positives (Lys / Arg riche) dans la région chevauchant partiellement avec le domaine kinase. Cela signifie que cette kinase ne reçoit pas un signal de la membrane extracellulaire. Enfin, nous avons pu confirmer que les résidus 284-315 YabT constituent son motif de fixation de l'ADN, et que la fixation sur l'ADN active la fonction kinase de YabT.

Il a été constaté que YabT est exprimé pendant le début de la sporulation (Nicolas *et al.*, 2012). Durant la même période, les niveaux de RecA étaient relativement élevés et constants. YabT et RecA interagissent dans un essai double hybride. À l'aide de GFP-YabT observée en microscopie de fluorescence, nous avons constaté que YabT se situe dans le septum asymétrique. Nous avons supposé que YabT est ancrée à la membrane septale via son hélice transmembranaire, et il peut être activé par l'interaction avec l'ADNss aux sites de lésion, pour ensuite phosphoryler RecA. *In vivo*, la phosphorylation de RecA favorise la formation des foci au début de la production de spores. D'autre part, le remplacement de RecA par un dérivé non phosphorylable, ou l'inactivation de YabT, conduit à une baisse des spores viables produites en présence de lésions de l'ADN exogène. Des résultats semblables ont été également trouvés pour son homologue eucaryotique Rad51 et Rad55 qui sont phosphorylés par leur sérine / thréonine kinases Plk1, Mec1 et Tel1 en réponse à l'altération de l'ADN. Ce processus favorise la réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Les résultats de cette étude suggèrent que YabT exerce un mécanisme similaire à celui des kinases eucaryotes Plk1, Tel1 et Mec1 (Yata *et al.*, 2012;.. Traven & Heierhorst, 2005 et Flott *et al.*, 2011). Ainsi, nous pouvons conclure que RecA présente des similitudes fonctionnelles avec son homologue RAD51 eucaryal et Rad55, mais est également semblable dans sa régulation par modifications post-traductionnelles.

Le mécanisme exact de recrutement RecA au site de la lésion ainsi que la composition de foci de RecA ne sont pas bien compris. D'autre part, le rôle exact de la phosphorylation dans ce

processus est loin d'être claire, et d'autres travaux seront nécessaires à l'avenir pour élucider ces mécanismes. Les recherches futures devraient également se concentrer sur de confirmation *in vivo* de l'interaction kinase-substrate, ce qui nécessiterait une étude quantitative en phosphoprotéomique (en cours dans notre groupe).

Dans le projet AbrB: AbrB est une protéine qui fixe l'ADN et un régulateur global d'expression des gènes chez *B. subtilis*. Il régule plus de 100 gènes qui commencent l'expression au cours de la phase de transition à la fin de la croissance végétative et le début de la phase stationnaire (les milieux nutritifs limitatifs) et pendant la sporulation (Perego *et al.*, 1991; Zuber *et al.*, 1987;.. Schultz *et al.*, 2009). Dans ce travail, nous avons considéré la possibilité qu'AbrB pourrait être régulée par la phosphorylation sur sérine-86 au cours de la phase de transition. Ainsi, dans cette étude, l'hypothèse de travail était que la phosphorylation AbrB pourrait affecter ses propriétés de fixation d'ADN. AbrB est phosphorylée *in vitro* par trois kinases de type Hanks (PrkC, YbdM et YabT), mais aucun d'entre eux n'est spécifique pour le résidu 86. Les trois kinases sont exprimées au cours de la transition et la phase stationnaire chez *B. subtilis* (Nicolas *et al.*, 2012). Nous avons essayé de comprendre l'effet de la phosphorylation de la sérine 86 de l'AbrB sur sa capacité de fixer l'ADN. En accord avec l'hypothèse de travail, le mutant phospho-mimétique d'AbrB conduit à une diminution de l'affinité de fixation d'ADN observée dans l'essai de « gel-shift ». Les résidus de tétramérisation d'AbrB se trouvent (48-55) dans le domaine N-terminal et (88-94) dans le domaine C-terminal (Fude *et al.*, 2005). Le site de phosphorylation d'AbrB sérine-86 n'est pas compris dans la région de tétramérisation, mais n'est pas loin. Nous avons étudié la tétramérisation de AbrB et ses mutants par tamis moléculaire. WT AbrB, AbrB S86A et AbrB S86D forment les tétramères en solution. Deux conclusions peuvent être tirées de ces résultats: les deux mutants étaient repliés correctement, et l'état de phosphorylation d'AbrB n'a pas affecté la formation des tétramères.

Par conséquent, les résultats *in vitro* suggèrent que la phosphorylation d'AbrB n'agit pas sur l'oligomérisation, mais affecte à la fixation de l'ADN, malgré le fait que le résidu phosphorylé se trouve dans le domaine d'oligomérisation.

Pour confirmer le potentiel régulateur de cet événement de phosphorylation *in vivo*, nous avons introduit des gènes codant *abrB S86A* et *abrB S86D* à la place de l'allèle de type sauvage et testé l'effet sur des différents tests physiologiques. Dans cette étude *in vivo*, nous avons choisi certains gènes rapporteurs importants, dont les rôles physiologiques ont été déjà établi. En accord avec les données *in vitro*, les résultats confirment une diminution de l'affinité pour l'ADN dans la souche mutante phospho-mimétique (*abrB S86D*) qui présentaient des phénotypes dans la production d'exoprotéase, la compétence et la sporulation pendant la transition vers la phase stationnaire. Ces résultats suggèrent un lien entre la phosphorylation d'AbrB sur 86 et son activité *in vivo*.

Pour une meilleure compréhension de la phosphorylation sur la sérine AbrB-86, de nombreuses questions restent ouvertes. Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur la sérine-86 phosphorylation et l'impact sur la fixation de l'ADN. Nous pouvons proposer que la phosphorylation de la sérine-86 d'AbrB pourrait modifier la conformation de sa partie C-terminale, ce qui pourrait affecter son efficacité de fixation de l'ADN. Etant donné que la phosphorylation de la sérine AbrB-86 est non spécifique *in vitro*, autres sites de phosphorylation peuvent exister sur AbrB, que nous n'étions pas en mesure de détecter dans notre laboratoire. Il est également possible que la phosphorylation d'AbrB sur la sérine-86 pourrait modifier l'expressions de gènes associés à la phase stationnaire, et par conséquent leurs fonctions physiologiques. Les recherches futures devraient se concentrer sur une analyse complète du transcriptome de AbrB et ses mutants, qui est actuellement en cours. Ainsi, dans le cadre de cette étude, nous pouvons proposer que la phosphorylation de la sérine 86 d'AbrB

puisse constituer un mécanisme régulateur supplémentaire, qui est nécessaire pour désactiver ce régulateur ambiactive pendant la phase de transition.

Bien que le nombre de phosphoprotéines identifiés chez les bactéries augmente rapidement, seule une petite partie de ces événements de phosphorylation ont été physiologiquement caractérisée. Identification des phosphoprotéines, la détection et la quantification des peptides contenant du phosphate et de la localisation de leurs sites de phosphorylation n'est en aucun cas un défi facile, mais il est éclipsé par rapport à la tâche gigantesque de l'attribution d'un rôle physiologique de chaque événement de phosphorylation. Ce dernier reste le principal défi dans le domaine de phosphoproteomique bactérienne, et la présente étude est une contribution à cet objectif.