

© 2023 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 26: 1-12, 2023.
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.617>

El AB“Y” de la fosforilación de tirosinas en bacterias: descripción de las enzimas implicadas y su impacto en la fisiología procarionte

Ángel Andrade^{1*}, Óscar M. Alonso¹ y Faviola Tavares-Carreón²

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Francisco I. Madero Pte. s/n, Monterrey 64460, Nuevo León, México. ²Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universidad s/n Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, 66450, Nuevo León, México. E-mail: *angel.andradet@uanl.edu.mx

RESUMEN

La fosforilación de proteínas en residuos de serina, treonina y tirosina representa un paradigma central de la señalización celular. No obstante, en procariontes esta modificación postraducciona (MPT) fue desestimada durante varias décadas. Diversos estudios fosfoproteómicos bacterianos, así como la identificación y caracterización exhaustiva de las enzimas responsables de la fosforilación de proteínas en estos organismos ha derivado en una nueva visión del alcance regulatorio asociado a esta MPT. En particular, esta revisión se centra en la fosforilación en residuos de tirosina, las enzimas cinasas y fosfatasa implicadas en este proceso, su mecanismo de acción y el impacto de su actividad sobre la fisiología bacteriana.

Palabras clave: fosforilación en tirosinas, tirosina cinasa bacteriana, tirosina fosfatasa.

AB“Y” of bacterial tyrosine phosphorylation: description of contributing enzymes and its impact in bacterial physiology.

ABSTRACT

Protein phosphorylation in serine, threonine and tyrosine residues is a central paradigm in cell signaling. However, in prokaryotes this post-translational modification (PTM) was dismissed until last two decades. Several bacterial phosphoproteomic studies along with identification and characterization of the enzymes responsible of protein phosphorylation in these organisms, has triggered a fresh view on the research area pointing out to this PTM as an important regulatory mechanism in bacteria. Particularly, in this review we will focus on tyrosine phosphorylation, the kinases and phosphatases achieving incorporation and removal of phosphate moiety, and their mechanism of action and impact on the bacterial physiology.

Keywords: tyrosine phosphorylation, bacterial tyrosine kinase, tyrosine phosphatase.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos realizan continuas adaptaciones metabólicas en respuesta a los cambios ambientales que enfrentan (Stock, Robinson & Goudreau, 2000; Cousin *et al.*, 2013), siendo la fosforilación de proteínas un mecanismo expedito (en comparación con la regulación transcripcional), cuyo carácter de modificación covalente le confiere un tiempo de vida prolongado (Mijakovic, Grangeasse & Turgay, 2016). La fosforilación de proteínas es una modificación post-traducciona (MPT) dinámica y reversible, es decir que el grupo fosfato puede ser incorporado o removido de un péptido mediante la actividad de enzimas especializadas denominadas cinasas y fosfatasa, respectivamente (Macek *et al.*, 2019).

Comúnmente la fosforilación de proteínas conlleva la activación de éstas, promoviendo su actividad enzimática, su localización subcelular o su interacción con otras proteínas. En contraparte, la reacción inversa (desfosforilación) restaura el sistema y lo prepara para responder a un evento de señalización posterior. De acuerdo con lo anterior, es posible asociar la actividad de las enzimas cinasas y fosfatasa como una especie de interruptores moleculares que encienden y apagan elementos celulares en respuesta a diversos estímulos.

Durante varias décadas se consideró que la fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina se encontraba restringida a organismos eucariontes y que en bacterias la MPT predominante correspondía a la fosforilación de residuos de histidina y aspartato, evento canónico de los bien caracterizados sistemas de dos componentes (SDC) (Stock, Robinson & Goudreau, 2000). En los SDC, la proteína cinasa sensora en respuesta a un estímulo resulta autofosforilada (histidina) y posteriormente transfiere el grupo fosfato a la proteína reguladora de respuesta (aspartato), ésta última suele operar como un regulador transcripcional de genes blanco específicos (para consultar una revisión reciente (Jacob-Dubuisson, Mechaly, Bettton & Antoine, 2018)).

No obstante, durante las últimas décadas estudios genómicos evidencian que la prevalencia de genes codificantes de cinasas de serina, treonina y tirosina en procariontes es muy semejante a la de los genes de cinasas de histidina (de los SDC) (Kannan, Taylor, Zhai, Venter & Manning, 2007). Adicionalmente, análisis globales basados en la espectrometría de masas a partir de diferentes organismos modelo procariontes, han demostrado que una fracción significativa de sus proteomas es sujeta a fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina (Macek *et al.*, 2019). Actualmente, diferentes grupos de investigación evalúan las implicaciones de esta MPT en la fisiología procarionte.

A la fecha, la contribución de la señalización a través de la fosforilación en serina y treonina en bacterias se ha asociado con diferentes procesos como son la síntesis de pared y

división celular, el metabolismo secundario y la patogénesis (Pereira, Goss & Dworkin, 2011; Dworkin, 2015; Macek *et al.*, 2019; Schastnaya *et al.*, 2021). Las enzimas que realizan esta MPT son las cinasas de serina/treonina (S/T) bacterianas, que forman parte de las cinasas denominadas tipo-Hanks, es decir comparten similitudes catalíticas y estructurales con sus homólogos eucariontes (Pereira *et al.*, 2011). Algunas cinasas S/T procariontes presentan un dominio extracelular que puede ser activado tras el acoplamiento de un ligando, lo que promueve su oligomerización, autofosforilación y la posterior transferencia del grupo fosfato a las proteínas blanco (Manuse, Fleurie, Zucchini, Lesterlin & Grangeasse, 2016). Además, se ha descrito que algunas cinasas S/T fosforilan factores transcripcionales y/o proteínas reguladoras de respuesta de los SDC impactando así en la expresión genética global (Horstmann *et al.*, 2014; Libby, Goss & Dworkin, 2015). Para conocer más de las implicaciones de la fosforilación en S/T y las cinasas tipo-Hanks asociadas referirse a (Bonne Kohler *et al.*, 2020; Nagarajan, Lenoir & Grangeasse, 2022).

La presente revisión se centra en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y su impacto en la fisiología procarionte.

CINASAS DE TIROSINA BACTERIANAS

La similitud de secuencia de las cinasas S/T bacterianas con sus contrapartes eucariontes facilitó la identificación de genes homólogos en los genomas procariontes. Sin embargo, en el caso de las cinasas de tirosina una aproximación semejante no permite identificar a las enzimas equivalentes en bacterias salvo contadas excepciones, por ejemplo, los trabajos pioneros que caracterizaron a las tirosina cinasas procariontes atípicas, WaaP y MasK (con dominios semejantes a los de cinasas eucariontes), en *Pseudomonas aeruginosa* (Zhao & Lam, 2002) y *Myxococcus xanthus* (Thomasson *et al.*, 2002), respectivamente.

Fue hasta finales de la década de los 90 que Grangeasse y colaboradores describieron una nueva enzima en *Acinetobacter johnsonii* capaz de auto-fosforilarse en tirosina, Ptk (Grangeasse *et al.*, 1997). A partir de este reporte proteínas homólogas a Ptk se describieron en diferentes bacterias y se confirmó la actividad de tirosina cinasa en este grupo de enzimas, distinguiéndose de las cinasas tipo-Hanks eucariontes, tanto por su estructura como por su mecanismo catalítico (Grangeasse, Nessler & Mijakovic, 2012). Por lo anterior y debido a la prevalencia de genes homólogos a *ptk* en la mayoría de los genomas bacterianos, este grupo de enzimas se unificó como una nueva familia de proteínas denominada cinasas de tirosina bacterianas o BY-cinasas (por sus siglas en inglés, *Bacterial tyrosine-kinases*) (Chao, Wong & Av-Gay, 2014). Además se desarrolló una base de datos específica denominada BYKdb (<https://bykdb.lyon.inserm.fr/BYKdb/>) (Jadeau *et al.*, 2008; Jadeau *et al.*, 2012).

La ausencia de homólogos de BY-cinasas en genomas eucariontes o de arqueas sugiere que el ancestro común de las cinasas tipo-

Hanks S/T adquirió la capacidad de fosforilar tirosinas posterior a que los grupos Eukarya y Bacteria divergieran, mientras que en Bacteria se desarrolló un mecanismo independiente para fosforilar tirosinas (Grangeasse *et al.*, 2012).

ESTRUCTURA DE LAS BY-CINASAS

Las BY-cinasas se dividen estructuralmente en 3 regiones, **(i)** el dominio N-terminal compuesto por dos hélices transmembranales delimitan un bucle que se extiende hacia el espacio periplásmico (Proteobacteria y Actinobacteria), o al espacio extracelular (Firmicutes), se considera que este bucle participa en la percepción de algún estímulo o ligando (Figura 1A). Acorde con lo anterior, mutaciones en un motivo rico en prolinas localizado justo antes del inicio de la segunda hélice transmembranal impactan en la actividad de las BY-cinasas (Grangeasse, Terreux & Nessler, 2010). **(ii)** El dominio citoplásmico C-terminal, que corresponde al dominio catalítico y contiene los motivos que unen al ATP; Walker A (A/Gx₅GK[S/T]) y Walker B (hhhhDxxP), donde x y h corresponden a cualquier residuo y a un residuo hidrofóbico, respectivamente; además de un motivo Walker A' (hhhhDxDxR) implicado en la unión del cofactor Mg²⁺. Los motivos Walker son comunes entre las proteínas que unen nucleótidos (Leipe, Koonin & Aravind, 2003), sin embargo, el motivo Walker A de las BY-cinasas solo mantiene bien conservados a los aminoácidos GK[S/T] (Bechet *et al.*, 2009). **(iii)** El denominado *cluster* de tirosinas (YC), se localiza en la porción final del extremo C-terminal (últimos 10-20 residuos), y contiene un grupo de 3 a 7 tirosinas, todas éstas sustrato de auto-fosforilación (Grangeasse *et al.*, 2012).

De manera general, en Proteobacteria y Actinobacteria, las BY-cinasas se encuentran codificadas por un solo gen que codifica el dominio transmembranal y citosólico de la enzima. En contraste, en Firmicutes los dominios se encuentran codificados por genes independientes, es decir, cada dominio corresponde a péptidos individuales (Grangeasse, Cozzone, Deutscher & Mijakovic, 2007). No obstante, la interacción de ambos péptidos es necesaria para constituir una enzima funcional. Se considera que esta división de los dominios en Firmicutes permite la amplificación de la respuesta, ya que un mismo dominio transmembranal puede interaccionar con más de un dominio citosólico, y a su vez un dominio citosólico con diferentes dominios transmembranales.

En consecuencia, el bucle del dominio transmembranal en Firmicutes y en Actinobacteria es más corto en comparación con el de Proteobacteria. En este último grupo en la parte N-terminal de su dominio citosólico se localiza una región de aproximadamente 20 aminoácidos rica en residuos de arginina y lisina (*cluster* RK), ausente en el grupo de Firmicutes (Grangeasse *et al.*, 2012).

Las diferencias descritas entre las BY-cinasas llevan a varias hipótesis sobre su evolución dentro del dominio Bacteria,

a) una posibilidad es que su ancestro común constaba de un solo péptido que posteriormente se separó en dos en el clado de los Firmicutes, y **b)** de manera alternativa, es posible que este ancestro estuviera compuesto por dos péptidos, cuyos genes codificantes se fusionaron en el grupo que dio origen a Actinobacteria y a Proteobacteria (Grangeasse *et al.*, 2007).

Por otra parte, los análisis filogenéticos sugieren que las BY-cinasas y las proteínas más relacionadas las ATPasas de arsenito (ArsA) y MinD, divergieron a partir de una ATPasa procarionte común (Grangeasse *et al.*, 2012). Ambos grupos enzimáticos comparten los motivos Walker y la actividad de ATPasa. Las proteínas ArsA son necesarias para expulsar a los iones de arsenito y de antimonio, por otra parte, MinD se ha caracterizado como una ATPasa necesaria para la división celular en bacterias (Rosen, Bhattacharjee, Zhou & Walmsley, 1999; Ma, King & Rothfield, 2004).

MECANISMO CATALÍTICO DE LAS BY-CINASAS

A pesar de que aún se desconoce a detalle el mecanismo de acción de las BY-cinasas se piensa que el dominio N-terminal en respuesta a algún estímulo promueve la activación del dominio citosólico. O bien que la fosforilación del YC induce a un cambio conformacional que permite al bucle del dominio N-terminal recibir estímulos externos (Collins *et al.*, 2006; Bechet *et al.*, 2009).

De acuerdo con las estructuras resueltas de las BY-cinasas Etk y Wzc de *Escherichia coli* y CapAB de *Staphylococcus aureus* se propone un mecanismo de acción para la familia de las BY-cinasas. Los residuos conservados de lisina y arginina del motivo Walker A, junto con los aspartatos de los motivos Walker B y A' unen el fosfato del nucleótido y coordinan el Mg²⁺ (Grangeasse *et al.*, 2010). Un residuo aromático conservado cercano al sitio activo (F547 en Etk) funciona como base para localizar el anillo de la adenina del nucleótido (Lee, Zheng, She & Jia, 2008), y un residuo no polar (F221 en CapA) establece una interacción hidrofóbica con la base del nucleótido y activa el dominio catalítico (Olivares-Illana *et al.*, 2008).

La implementación de versiones de BY-cinasas con mutaciones en el sitio activo reveló la formación de un anillo octamérico, en el que las tirosinas del YC de cada subunidad se encuentran unidas al sitio activo de las subunidades adyacentes, con base en estas evidencias estructurales se propuso que estas enzimas llevan a cabo un proceso de trans-autofosforilación entre las subunidades que componen el oligómero (Bechet *et al.*, 2010; Hajredini & Ghose, 2021) y que el anillo aromático de una de las tirosinas del YC interacciona con los residuos de los motivos Walker B y A' de la subunidad continua (Figura 1A). En particular, el grupo hidroxilo de la tirosina blanco a fosforilación interactúa con el segundo aspartato del motivo Walker A', el que probablemente opera como un catalizador

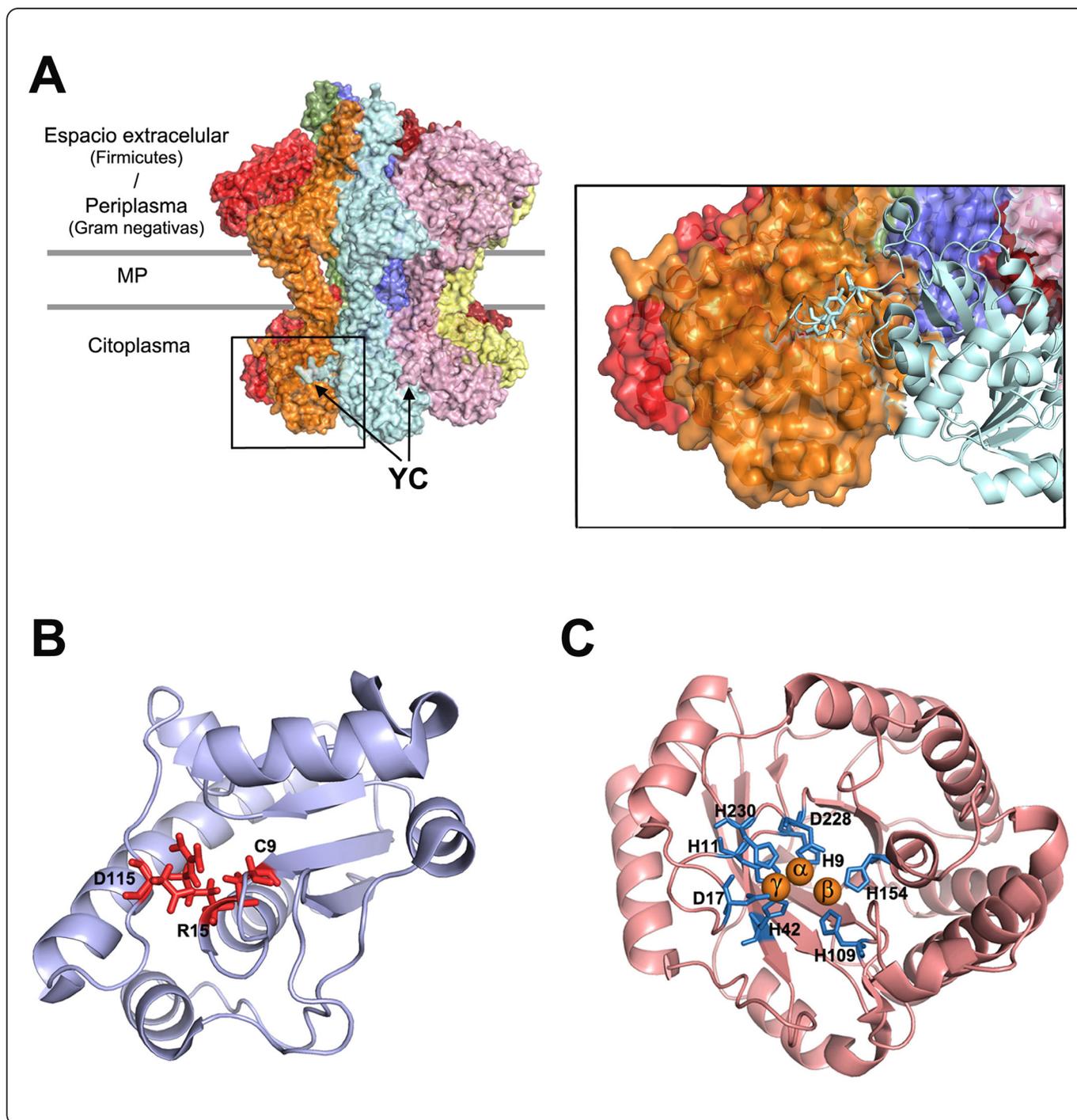


Figura 1. Enzimas bacterianas asociadas a fosforilación de tirosinas. (A) Octámero de BY-cinasa Wzc de *E. coli* (PDB: 7NHR), representación en superficie. Cada subunidad del oligómero se encuentra en diferente color. El YC de la región C-terminal de dos subunidades se indica por las flechas. Izquierda, ampliación del recuadro marcado, la superficie de la subunidad coloreada en cian se retiró para poder visualizar la incorporación de su YC en el sitio catalítico de la subunidad contigua (naranja). Las tirosinas (Y715, Y717 y Y718) de la subunidad en color cian se muestran como barras. (B) Representación en listones de la LMW-PTP Wzb de *E. coli* (PDB: 2FEK), los residuos catalíticos (C9, R15 y D115) se muestran en barras rojas. (C) Representación en listones de la PHP de *Lactococcus lactis* subsp. Lactis (PDB: 4GC3), los 3 cationes divalentes (α , β y γ) se muestran como esferas naranjas y los residuos de aspartato e histidina asociados a éstos se indican en barras azules (H9, H11, D17, H42, H109, H154, D228 y H230). La visualización de las estructuras y la preparación de las imágenes se realizaron con PyMol 2.0. Figura, creatividad personal.

ácido en el proceso de trans-autofosforilación (Grangeasse *et al.*, 2012).

El motivo citoplásmico conservado ExxRxxR se ha descrito como importante para estabilizar el estado oligomérico de las BY-cinasas (Olivares-Illana *et al.*, 2008; Bechet *et al.*, 2010; Schwechheimer *et al.*, 2020). Y la fosforilación múltiple del YC de las subunidades del anillo octamérico reduce su estabilidad e induce la disociación de las subunidades y la consiguiente transferencia del grupo fosfato a los sustratos endógenos (Nakamoto *et al.*, 2021; Alphonse, Djemil, Piserchio & Ghose, 2022), y/o su desfosforilación por alguna tirosina fosfatasa específica (Temel *et al.*, 2013; Hajredini & Ghose, 2021). Una vez que los dominios citosólicos de las BY-cinasas se encuentran desfosforilados se promueve la oligomerización y el ciclo reinicia (Alphonse *et al.*, 2022).

A diferencia de las cinasas eucariontes, el mecanismo de las BY-cinasas no está ligado al estado de fosforilación de un residuo de tirosina específico, sino a un nivel de fosforilación general del YC. Puesto que la eliminación de una tirosina del YC no afecta la función de la enzima, las alteraciones fisiológicas tienen lugar solo en la ausencia de múltiples residuos de tirosina del YC (Paiment, Hocking & Whitfield, 2002; Morona, Morona, Miller & Paton, 2003).

FOSFATASAS DE TIROSINA BACTERIANAS

La actividad de las proteínas cinasas contribuye a la regulación de vías de transducción de señales y de funciones celulares clave en procariontes. La fosforilación tiene un carácter dinámico y las proteínas tirosina fosfatasa (PTP, por sus siglas en inglés) son las enzimas encargadas de regular el efecto de esta PTP, a través de la remoción del grupo fosfato de las proteínas fosforiladas y de las mismas BY-cinasas (Temel *et al.*, 2013).

A la fecha, en bacterias se han identificado numerosas PTP, la mayoría con gran similitud a las enzimas eucariontes (Böhmer, Szedlacsek, Taberero, Ostman & Den Hertog, 2013). De manera general, las PTP procariontes se categorizan en (i) PTP convencionales de tipo eucariota y fosfatasa de doble especificidad (DSP, por sus siglas en inglés), con actividad contra fosfoserina y fosfotreonina, además de fosfotirosina; (ii) PTP de bajo peso molecular (LMW-PTP, por sus siglas en inglés); y (iii) las fosfatasa polimerasa-histidinol (PHP, por sus siglas en inglés), éste último grupo se encuentra representado por una familia de fosfoesterasas comúnmente presentes en Firmicutes (Bechet *et al.*, 2009).

MECANISMO CATALÍTICO DE PTP, DSP Y LMW-PTP

A pesar de sus diferencias en tamaño, las enzimas PTP convencionales, DSP y LMW-PTP tienen un mecanismo de acción común, éstas comparten el motivo catalítico conservado

C(X)₅R, localizado en el denominado bucle P, región de unión del grupo fosfato. Los residuos de cisteína y arginina del motivo catalítico son fundamentales para la reacción de desfosforilación (Cirri *et al.*, 1993) (Figura 1B).

La hidrólisis de los ésteres de fosfato de tirosina se lleva a cabo en dos pasos. En primer lugar, tras la formación del complejo enzima-sustrato, la arginina del bucle P interacciona electrostáticamente con la carga negativa de la fosfotirosina, y la cisteína catalítica realiza un ataque nucleofílico hacia el átomo de fósforo del sustrato. La unión del sustrato y la ruptura del enlace éster provoca que el aspartato catalítico (localizado en el bucle D), se aproxime al sitio activo y el aspartato actúe como un ácido en la reacción (Taddei *et al.*, 1994), para la liberación del sustrato desfosforilado al transferirle un protón.

La reacción de sustitución resulta en la unión del grupo fosfato a la cisteína catalítica a través de un enlace covalente tio-fosfato (Zhang *et al.*, 1994). En una segunda reacción de desplazamiento el anión aspartato resultante de la primera reacción, funciona como una base al activar a una molécula de agua para que tenga lugar la hidrólisis del tio-fosfato, se regenera la enzima y se libera fosfato inorgánico (Kolmodin & Åqvist, 2001).

MECANISMO CATALÍTICO DE LAS PHP

Las proteínas PHP son parte de la superfamilia amidohidrolasa (AHS, por sus siglas en inglés). Las proteínas AHS incorporan iones metálicos en su sitio activo lo que les permite activar moléculas de agua y realizar el ataque nucleofílico contra los enlaces amida o éster de los sustratos fosforilados (Seibert & Raushel, 2005). Sin embargo, las enzimas PHP se distinguen de las AHS por presentar un plegamiento distorsionado conformado por barriles (β/α)₇, además de un sitio activo con 3 cationes divalentes (denominados α , β y γ), unidos a través de residuos de histidina y aspartato conservados (Ghodge *et al.*, 2013) (Figura 1C). El sitio de unión del sustrato en las PHP consta de una región cargada positivamente conformada por cationes divalentes y residuos de arginina que permiten la interacción con el grupo fosfato, además de un centro hidrofóbico con residuos aromáticos (tirosina y/o fenilalanina) que facilitan la unión del anillo imidazol a través de interacciones de apilamiento tipo π (Ghodge & Raushel, 2018).

La reacción enzimática originalmente descrita en las PHP fue la de fosfatasa de L-histidinol fosfato, penúltimo paso en la biosíntesis de la L-histidina (Alifano *et al.*, 1996). Y fue hasta hace dos décadas que la caracterización de los genes asociados con la regulación de la cápsula de *Streptococcus pneumoniae* evidenció la actividad de fosfotirosina fosfatasa en la proteína CpsB perteneciente a la familia PHP (Morona, Morona, Miller & Paton, 2002). Contrario a las PTP o LMW-PTP, las PHP muestran una actividad óptima a un pH básico y dependen de un ion metálico, por lo general Mn²⁺.

PÉPTIDOS BACTERIANOS QUE CONTIENEN FOSFO-TIROSINAS

Actualmente se desconoce la naturaleza específica de los sustratos de las BY-cinasas, no obstante, estas enzimas deben de distinguir sus proteínas sustrato y los motivos peptídicos que contienen los residuos de tirosina blancos de fosforilación. Cabe mencionar que la ubicación del grupo fosfato en la posición O⁴ del anillo fenólico de los residuos de tirosina, brinda una característica estructural y energética para los dominios de unión específicos a través de interacciones hidrofóbicas o de tipo π . De acuerdo con estas características los dominios catalíticos de las cinasas y de las fosfatasa específicas para fosfo-tirosinas resultan más profundos (~6 Å), en comparación con los dominios de unión a fosfo-serinas y/o fosfo-treoninas (Hunter, 2014).

La búsqueda de motivos peptídicos en las secuencias reportadas en la base de datos de sitios de fosforilación en bacterias, dbPSP (por sus siglas en inglés) (Pan *et al.*, 2015), no consiguió evidenciar una secuencia consenso conservada en los péptidos que contienen fosfo-tirosinas (situación semejante se presenta en los péptidos que incluyen fosfo-serinas y fosfo-treoninas) (Shi *et al.*, 2020). Sin embargo, de entre los 3,835 registros de fosfo-tirosinas depositados en dbPSP se distingue que éstos localizan preferencialmente a un residuo de glicina en la posición +1 y de lisina en la posición -2, respecto a la fosfo-tirosina (Shi *et al.*, 2020). En concordancia, la implementación de la herramienta *Phosphosite logo generator* sobre el fosfoproteoma de tirosinas de *Shigella flexneri* mostró resultados semejantes con una mayor frecuencia de residuos de glicina en las posiciones +1 y -1, y de lisina en la posición -2, respecto a la fosfo-tirosina (Standish *et al.*, 2016). De manera semejante, el análisis de los sitios de fosfo-tirosinas en *S. pneumoniae* indica una sobre representación de glicina particularmente en las posiciones -3 y -1, respecto a la fosfo-tirosina (Sun *et al.*, 2010). Además, el fosfoproteoma de tirosinas de *E. coli* muestra una sobre representación de glicina en la posición -1 y de aspartato en la posición +1, respecto a la fosfo-tirosina (Hansen *et al.*, 2013). La comparación iterativa realizada con el algoritmo Motif-X de los fosfo-sitios de *E. coli* coincide con el enriquecimiento del residuo lisina en diferentes posiciones relativas a la fosfo-tirosina (+3, +4, +5 y -6) (Hansen *et al.*, 2013), lo que sugiere un rol potencial como aceptor de electrones para este amino ácido positivo.

La falta de similitud de los motivos procariontes que contienen fosfo-tirosinas en relación con los motivos eucariontes posiblemente corresponde a las diferencias estructurales y catalíticas de las BY-cinasas respecto a sus contrapartes eucariontes. Por lo tanto, se requiere la identificación y caracterización funcional de más fosfo-sitios procariontes para entender la especificidad de los sustratos de las BY-cinasas.

LA FOSFORILACIÓN DE TIROSINAS Y SU IMPACTO EN DIFERENTES FUNCIONES CELULARES

Las primeras descripciones de la fosforilación de tirosinas en bacterias corresponden a los trabajos relacionados con la biogénesis de los polisacáridos capsulares (PC) (Mijakovic *et al.*, 2003; Whitmore & Lamont, 2012). Esto derivado de que la mayoría de los genes codificantes de BY-cinasas y PTP procariontes se encuentran en regiones genómicas implicadas en la biosíntesis de exopolisacáridos (EPS) (Lee & Jia, 2009; Grangeasse *et al.*, 2012) y aunque todavía se desconocen varios aspectos, se considera de manera extendida que la autofosforilación de las BY-cinasas y su consiguiente desfosforilación por parte de las PTP contribuye a la síntesis y exportación de la cápsula bacteriana, y en la formación de biopelícula (Bechet *et al.*, 2010; Schwechheimer *et al.*, 2020) (Figura 2). El estado fosforilado de las BY-cinasas impacta en su capacidad de oligomerizar y se propone que su multimerización, como un octámero, permite que las BY-cinasas operen como una especie de plataforma que localiza a las enzimas flipasa y polimerasa, responsables de la translocación y polimerización de los PC, respectivamente (Bechet *et al.*, 2010). Además, la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa (Ugd), que participa en la síntesis de precursores de los PC, se describió como sustrato de las BY-cinasas Wzc y Etk de *E. coli*. La fosforilación de Ugd modifica su actividad enzimática y la consecuente cantidad de PC en la superficie de la bacteria (Lacour, Bechet, Cozzone, Mijakovic & Grangeasse, 2008).

En *S. aureus*, un elegante estudio evidenció una delicada y coordinada regulación durante la biosíntesis de los PC y el peptidoglucano de la pared celular, en la que la actividad de la BY-cinasa CapAB es requerida en distintos pasos del consumo de los precursores lipídicos de los CP (Rausch *et al.*, 2019). De manera semejante se ha descrito que la proteína BY-cinasa CpsCD de *S. pneumoniae* coordina la síntesis de los PC y el peptidoglucano y que su fosforilación en tirosinas impacta en el tamaño de la cápsula (Nakamoto *et al.*, 2021). Además, en *S. pneumoniae* se ha reportado que la proteína CpsCD interactúa y modula la movilidad de la proteína ParB (asociada a la segregación del cromosoma) por lo que se propone que la fosforilación de la proteína CpsCD señala para coordinar la síntesis de la cápsula y la segregación del cromosoma durante la división celular, lo que garantiza que las células hijas adquieran su envoltura capsular (Henriques, Rodrigues, Carido, Ferreira & Filipe, 2011; Nourikyan *et al.*, 2015). La ausencia de la BY-cinasas CpsCD provoca la acumulación intracelular de PC de bajo peso molecular y condiciona un efecto letal como consecuencia del secuestro de un precursor del peptidoglucano (Nakamoto *et al.*, 2021). La contribución de la fosforilación de tirosinas en la división celular está conservada en *S. flexneri* donde se ha descrito la fosforilación en tirosinas en la proteína FtsA (Standish *et al.*, 2016), particularmente en un residuo de tirosina previamente identificado como importante para su

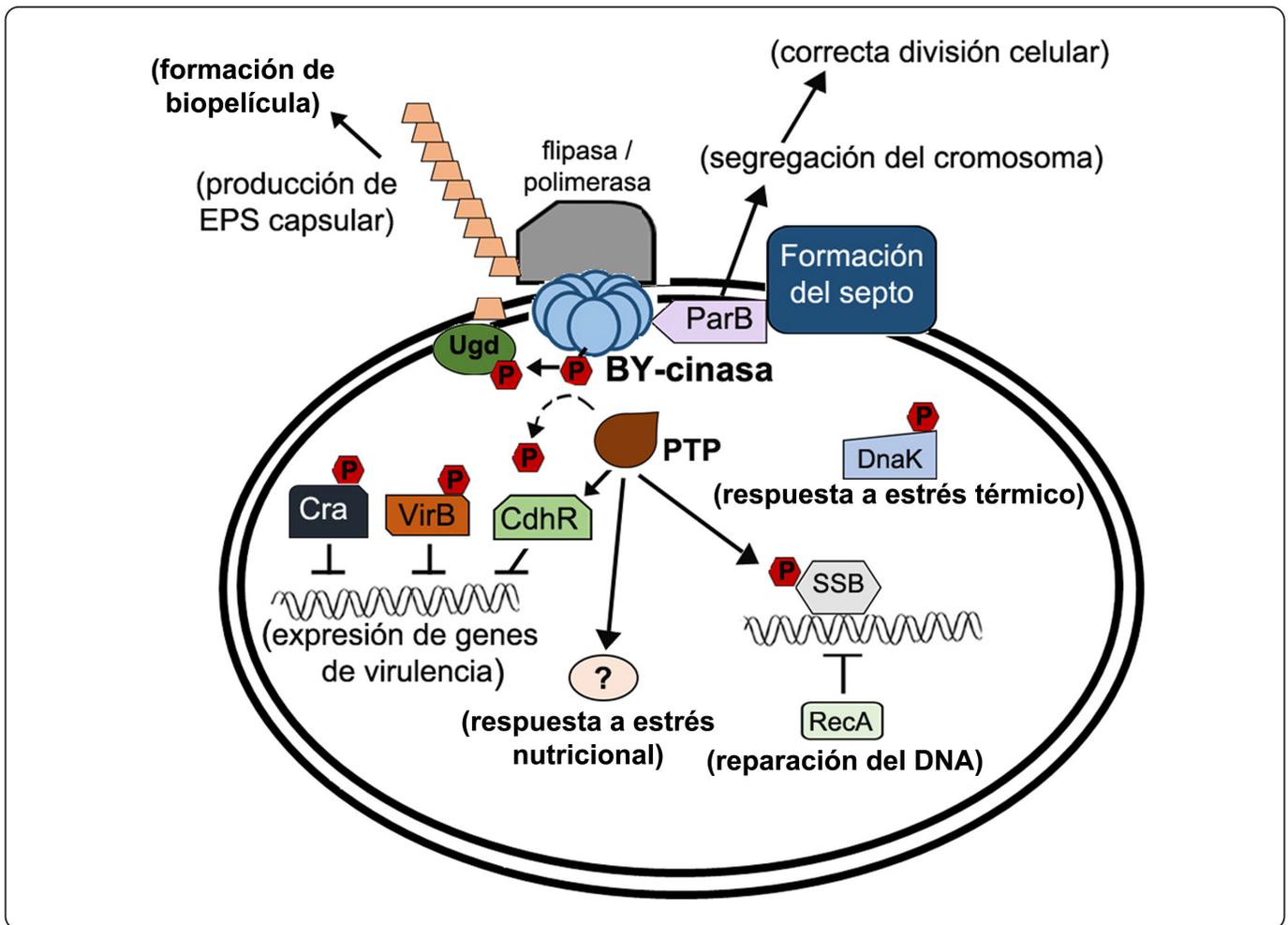


Figura 2. Fosforilación de tirosinas y regulación de procesos celulares. Octómero de BY-cinasa se indica en azul claro. La enzima fosfatasa (café) se indica como PTP. La formación del oligómero de BY-cinasa funciona como una plataforma para la flipasa y polimerasa de EPS capsular (gris) y se asocia con la localización de la maquinaria responsable de la formación del septo incluyendo ParB. Se indican sustratos a fosforilación en tirosinas descritos en diferentes organismos (Ugd, Cra, VirB, CdhR, SSB y DnaK). Los diferentes procesos celulares en los que éstos contribuyen se escriben entre paréntesis. Figura, creatividad personal.

interacción con FtsZ proteína que interviene en la formación del septo (Pichoff & Lutkenhaus, 2007).

Otro aspecto al que se ha ligado la fosforilación en tirosinas es la respuesta a diferentes tipos de estrés (Figura 2). En *Bacillus subtilis* se determinó que la proteína de unión al DNA de cadena sencilla, SSB, incrementa significativamente su afinidad por el DNA en su estado tirosina fosforilado, limitando el reclutamiento de RecA (proteína asociada a la reparación del DNA), lo que sugiere que el estado desfosforilado de SSB (a través de la actividad de la tirosina fosfatasa YwqD), es requerido durante la respuesta al daño del material genético (Mijakovic *et al.*, 2006). Además, se ha reportado que la fosforilación de la chaperona DnaK de *B. subtilis* es requerida durante la respuesta al estrés térmico (Shi, Ravikumar, Derouiche, Macek & Mijakovic, 2016). En *Deinococcus radiodurans*, se ha descrito que la

fosforilación de RecA (proteína implicada en la respuesta SOS) en residuos de tirosina y treonina también impacta en su unión al DNA de doble cadena y en la resistencia del microorganismo a la radiación (Rajpurohit, Bihani, Waldor & Misra, 2016). Por otra parte, en *Burkholderia cenocepacia* se reportó que la eliminación de la LMW-PTP BtpA disminuye la capacidad de crecimiento de la bacteria tras su exposición a un estrés nutricional (Andrade, Tavares-Carreón, Khodai-Kalaki & Valvano, 2016). Asimismo, una cepa de *B. contaminans* mutante de la proteína BY-cinasa BceF tiene una menor tasa de recuperación posterior a un estrés por radiación UV (Ferreira *et al.*, 2013).

Cabe mencionar que la fosforilación de reguladores transcripcionales afecta la expresión de múltiples genes, por ejemplo, en *B. subtilis* el estado tirosina fosforilado del represor SalA induce un cambio conformacional que deriva en una mayor

afinidad por sus sitios blanco (Derouiche *et al.*, 2015). De manera opuesta, en *E. coli* enterohemorrágica la fosforilación del represor Cra, un regulador transcripcional global implicado en el metabolismo de carbono, parece disminuir su capacidad de unión al DNA, lo que permite la expresión de genes de virulencia en esta bacteria (Robertson, Hazen, Kaper, Rasko & Hansen, 2018). En *S. flexneri* también se ha reportado que la fosforilación del regulador VirB afecta la expresión de genes de virulencia y su capacidad invasiva (Standish *et al.*, 2016). En *Porphyromonas gingivalis* se propone que la desfosforilación del regulador transcripcional CdhR (por la LMW-PTP, Ltp1) permite la expresión de la fimbria Mfa1, necesaria para la formación de biopelícula y de comunidades con *S. gordonii* (Liu, Miller, Wang, Merchant & Lamont, 2017).

CINASAS DE TIROSINA BACTERIANAS QUE NO PERTENECEN A LA FAMILIA DE LAS BY-CINASAS

Como se mencionó, la mayoría de las cinasas de tirosina bacterianas caracterizadas pertenecen a la familia de las BY-cinasas, no obstante, se han descrito algunos otros grupos de enzimas capaces de llevar a cabo la reacción de fosforilación de tirosinas (Tabla I). Entre los primeros reportes de cinasas de tirosina no relacionadas a BY-cinasas se encuentra WaaP de *P. aeruginosa*, enzima que presenta un mecanismo funcional semejante al de las cinasas eucariontes y cuya actividad es fundamental para la fosforilación de la región central del lipopolisacárido (Zhao & Lam, 2002). Además de MasK de *M. xanthus*, proteína que también comparte identidad con las cinasas eucariontes y cuya actividad se ha ligado con el control de la motilidad dependiente del pili tipo IV (Thomasson *et al.*, 2002). Recién se describió una nueva familia de cinasas de tirosina denominada Ubk (cinasa bacteriana ubicua, por sus siglas en inglés), estas proteínas tienen baja similitud con las BY-cinasas y cuentan con homólogos en múltiples genomas bacterianos. YdiB de *B. subtilis* es un representante de la

familia Ubk cuya actividad se ha relacionado con la resistencia al estrés oxidativo (Nguyen *et al.*, 2017). La proteína Ubk de *S. pneumoniae* se describe como esencial para el crecimiento óptimo y la morfogénesis celular de esta bacteria (Pelletier *et al.*, 2019). Por otra parte, en *Mycobacterium tuberculosis* un grupo de cinasas de serina y treonina de la familia Pkn presentan también actividad cinasa hacia tirosinas (Kusebauch *et al.*, 2014), y aunque estas enzimas se relacionan con diferentes aspectos metabólicos aún se desconoce la contribución específica de su actividad como cinasas de tirosina por lo que son necesarios futuros estudios que ayuden a clarificar la contribución de las diferentes enzimas cinasas y su posible interconexión durante la señalización procarionte asociada a la fosforilación de las tirosinas.

COMENTARIOS FINALES

Diversos mecanismos de fosforilación de proteínas ocurren de manera natural en las células bacterianas y resultan necesarios para modular sus procesos fisiológicos en respuesta a los estímulos ambientales, no obstante, el inherente carácter dinámico de las MPT y la intercomunicación entre los diferentes sistemas de fosforilación dificulta la identificación y el análisis cuantitativo de los múltiples sustratos asociados.

En particular, la fosforilación de las tirosinas en bacterias representa una de las MPT más recientemente descritas y por consiguiente se mantiene como un área poco entendida. Al respecto se han conseguido avances considerables en el ámbito estructural y catalítico de las principales enzimas asociadas con la fosforilación en tirosinas, las BY-cinasas. Diferentes evidencias indican que estas enzimas operan como oligómeros acoplado su ensamble/desensamble con su actividad de autocinasa en coordinación con la actividad de sus enzimas fosfatasa específicas. Principalmente estudiadas respecto al metabolismo de polisacáridos extracelulares. Se sugiere que

Tabla I. Tirosina-cinasas bacterianas.

Proteínas	Familias	Organismos	Referencias
Ptk	BY-cinasa	<i>A. johnsonii</i>	(Grangeasse <i>et al.</i> , 1998)
Etk	BY-cinasa	<i>E. coli</i>	(Ilan <i>et al.</i> , 1999)
Wzc	BY-cinasa	<i>E. coli</i>	(Vincent <i>et al.</i> , 1999)
CapAB	BY-cinasa	<i>S. aureus</i>	(Olivares-Illana <i>et al.</i> , 2008)
CpsCD	BY-cinasa	<i>S. pneumoniae</i>	(Morona <i>et al.</i> , 2002)
WaaP	Kdo/WaaP	<i>P. aeruginosa</i>	(Zhao & Lam, 2002)
YdiB	Cinasa bacteriana ubicua (Ubk)	<i>B. subtilis</i>	(Nguyen <i>et al.</i> , 2017)
MasK	Cinasa de especificidad dual (Serine/Threonine and Tyrosine kinase)	<i>M. xanthus</i>	(Thomasson <i>et al.</i> , 2002)
PknD	Cinasa de especificidad dual (Serine/Threonine and Tyrosine kinase)	<i>M. tuberculosis</i>	(Kusebauch <i>et al.</i> , 2014)

el mecanismo de acción de las BY-cinasas se asemeja a una especie de cronómetro molecular el cual sincroniza la síntesis y exportación de los PC. La coordinación temporal de las BY-cinasas hacia eventos extra-citoplasmáticos es posible que también opere con respecto a los procesos intracelulares que regula la fosforilación en tirosinas, como son la división celular y la respuesta a diferentes condiciones de estrés. En este sentido, la distribución ubicua de las BY-cinasas y su significativa disimilitud respecto a las enzimas tirosina cinasas eucariontes, son aspectos que han incentivado la búsqueda de inhibidores específicos que se pudieran implementar en un contexto infeccioso para limitar la capacidad de proliferación y/o respuesta al estrés de las bacterias patógenas.

Uno de los principales retos que enfrenta el área es el limitado número de fosfopéptidos y además restringidos a pocas especies bacterianas. Por otra parte, los datos proteómicos suelen representar escenarios únicos derivados de una condición particular o un punto temporal del crecimiento celular. Se espera que en un futuro próximo el perfeccionamiento en las técnicas de espectrometría de masas y el enriquecimiento de fosfopéptidos, facilite la detección de MPTs en microorganismos para entender con mayor detalle el papel regulatorio de estas modificaciones, así como su interconectividad durante la regulación del ciclo celular, el crecimiento y la interacción con los hospederos eucariontes.

AGRADECIMIENTOS

Oscar M. Alonso es estudiante del Posgrado en Ciencias con orientación en Microbiología Médica de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y es becario CONAHCYT [1146782]. Angel Andrade es apoyado por CONAHCYT [FORDECYT-PRONACES/CF-2019-40760].

REFERENCIAS

Alifano, P., Fani, R., Lio, P., Lazcano, A., Bazzicalupo, M., Carlomagno, M. S. & Bruni, C. B. (1996). Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol. Rev.*, **60**, 44-69. DOI: 10.1128/mr.60.1.44-69.1996

Alphonse, S., Djemil, I., Piserchio, A. & Ghose, R. (2022). Structural basis for the recognition of the bacterial tyrosine kinase Wzc by its cognate tyrosine phosphatase Wzb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **119**, e2201800119. DOI: 10.1073/pnas.2201800119

Andrade, A., Tavares-Carreón, F., Khodai-Kalaki, M. & Valvano, M. A. (2016). Tyrosine Phosphorylation and Dephosphorylation in *Burkholderia cenocepacia* Affect Biofilm Formation, Growth under Nutritional Deprivation, and Pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 843-856. DOI: 10.1128/AEM.03513-15

Bechet, E., Gruszczuk, J., Terreux, R., Gueguen-Chaignon, V., Vigouroux, A., Obadia, B., Cozzzone, A. J., Nessler, S. & Grangeasse, C. (2010). Identification of structural

and molecular determinants of the tyrosine-kinase Wzc and implications in capsular polysaccharide export. *Mol. Microbiol.*, **77**, 1315-1325. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07291.x

Bechet, E., Guiral, S., Torres, S., Mijakovic, I., Cozzzone, A. J. & Grangeasse, C. (2009). Tyrosine-kinases in bacteria: from a matter of controversy to the status of key regulatory enzymes. *Amino Acids*, **37**, 499-507. DOI: 10.1007/s00726-009-0237-8

Böhmer, F., Szedlaczek, S., Taberner, L., Ostman, A. & Den Hertog, J. (2013). Protein tyrosine phosphatase structure-function relationships in regulation and pathogenesis. *FEBS J.*, **280**, 413-431. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08655.x

Bonne Kohler, J., Jers, C., Senissar, M., Shi, L., Derouiche, A. & Mijakovic, I. (2020). Importance of protein Ser/Thr/Tyr phosphorylation for bacterial pathogenesis. *FEBS Lett.*, **594**, 2339-2369. DOI: 10.1002/1873-3468.13797

Chao, J. D., Wong, D. & Av-Gay, Y. (2014). Microbial protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, **289**, 9463-9472. DOI: 10.1074/jbc.R113.520015

Cirri, P., Chiarugi, P., Camici, G., Manao, G., Raugei, G., Cappugi, G. & Ramponi, G. (1993). The role of Cys12, Cys17 and Arg18 in the catalytic mechanism of low-M(r) cytosolic phosphotyrosine protein phosphatase. *Eur. J. Biochem.*, **214**, 647-657. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17965.x

Collins, R. F., Beis, K., Clarke, B. R., Ford, R. C., Hulley, M., Naismith, J. H. & Whitfield, C. (2006). Periplasmic protein-protein contacts in the inner membrane protein Wzc form a tetrameric complex required for the assembly of *Escherichia coli* group 1 capsules. *J. Biol. Chem.*, **281**, 2144-2150. DOI: 10.1074/jbc.M508078200

Cousin, C., Derouiche, A., Shi, L., Pagot, Y., Poncet, S. & Mijakovic, I. (2013). Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation. *FEMS Microbiol. Lett.*, **346**, 11-19. DOI: 10.1111/1574-6968.12189

Derouiche, A., Shi, L., Bidnenko, V., Ventroux, M., Pignonneau, N., Franz-Wachtel, M., Kalantari, A., Nessler, S., Noirot-Gros, M. F. & Mijakovic, I. (2015). *Bacillus subtilis* Sala is a phosphorylation-dependent transcription regulator that represses *scoC* and activates the production of the exoprotease AprE. *Mol. Microbiol.*, **97**, 1195-1208. DOI: 10.1111/mmi.13098

Dworkin, J. (2015). Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, **24**, 47-52. DOI: 10.1016/j.mib.2015.01.005

Ferreira, A.S., Silva, I. N., Oliveira, V. H., Becker, J. D., Givskov, M., Ryan, R. P., Fernandes, F. & Moreira, L. M. (2013). Comparative transcriptomic analysis of the *Burkholderia cenocepacia* tyrosine kinase *bceF* mutant reveals a role in tolerance to stress, biofilm formation, and virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 3009-3020. DOI: 10.1128/AEM.00222-13

- Ghodge, S. V., Fedorov, A. A., Fedorov, E. V., Hillerich, B., Seidel, R., Almo, S. C. & Raushel, F. M. (2013). Structural and mechanistic characterization of L-histidinol phosphate phosphatase from the polymerase and histidinol phosphatase family of proteins. *Biochemistry*, **52**, 1101-1112. DOI: 10.1021/bi301496p
- Ghodge, S. V. & Raushel, F.M. (2018). Structure, Mechanism, and Substrate Profiles of the Trinuclear Metallophosphatases from the Amidohydrolase Superfamily. *Methods Enzymol.*, **607**, 187-216. DOI: 10.1016/bs.mie.2018.04.019
- Grangeasse, C., Cozzone, A. J., Deutscher, J. & Mijakovic, I. (2007). Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 86-94. DOI: 10.1016/j.tibs.2006.12.004
- Grangeasse, C., Doublet, P., Vaganay, E., Vincent, C., Deléage, G., Duclos, B. & Cozzone, A. J. (1997). Characterization of a bacterial gene encoding an autophosphorylating protein tyrosine kinase. *Gene*, **204**, 259-265.
- Grangeasse, C., Doublet, P., Vincent, C., Vaganay, E., Riberty, M., Duclos, B. & Cozzone, A. J. (1998). Functional characterization of the low-molecular-mass phosphotyrosine-protein phosphatase of *Acinetobacter johnsonii*. *J. Mol. Biol.*, **278**, 339-347. DOI: 10.1016/s0378-1119(97)00554-4
- Grangeasse, C., Nessler, S. & Mijakovic, I. (2012). Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **367**, 2640-2655. DOI: 10.1098/rstb.2011.0424
- Grangeasse, C., Terreux, R. & Nessler, S. (2010). Bacterial tyrosine-kinases: structure-function analysis and therapeutic potential. *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 628-634. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.08.018
- Hajredini, F. & Ghose, R. (2021). An ATPase with a twist: A unique mechanism underlies the activity of the bacterial tyrosine kinase, Wzc. *Sci. Adv.*, **7**, eabj5836. DOI: 10.1126/sciadv.abj5836
- Hansen, A. M., Chaerkady, R., Sharma, J., Díaz-Mejía, J. J., Tyagi, N., Renuse, S., Jacob, H. K., Pinto, S. M., Sahasrabudhe, N. A., Kim, M. S., Delanghe, B., Srinivasan, N., Emili, A., Kaper, J. B. & Pandey, A. (2013). The *Escherichia coli* phosphotyrosine proteome relates to core pathways and virulence. *PLoS Pathog.*, **9**, e1003403. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003403
- Henriques, M. X., Rodrigues, T., Carido, M., Ferreira, L. & Filipe, S. R. (2011). Synthesis of capsular polysaccharide at the division septum of *Streptococcus pneumoniae* is dependent on a bacterial tyrosine kinase. *Mol. Microbiol.*, **82**, 515-534. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07828.x
- Horstmann, N., Saldaña, M., Sahasrabhojane, P., Yao, H., Su, X., Thompson, E., Koller, A. & Shelburne, S. A., 3rd (2014). Dual-site phosphorylation of the control of virulence regulator impacts group A streptococcal global gene expression and pathogenesis. *PLoS Pathog.*, **10**, e1004088. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004088
- Hunter, T. (2014). The genesis of tyrosine phosphorylation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **6**, a020644. DOI: 10.1101/cshperspect.a020644
- Ilan, O., Bloch, Y., Frankel, G., Ullrich, H., Geider, K. & Rosenshine, I. (1999). Protein tyrosine kinases in bacterial pathogens are associated with virulence and production of exopolysaccharide. *EMBO J.*, **18**, 3241-3248. DOI: 10.1093/emboj/18.12.3241
- Jacob-Dubuisson, F., Mechaly, A., Betton, J. M. & Antoine, R. (2018). Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, **16**, 585-593. DOI: 10.1038/s41579-018-0055-7
- Jadeau, F., Bechet, E., Cozzone, A. J., Deléage, G., Grangeasse, C. & Combet, C. (2008). Identification of the idiosyncratic bacterial protein tyrosine kinase (BY-kinase) family signature. *Bioinformatics*, **24**, 2427-2430. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn462
- Jadeau, F., Grangeasse, C., Shi, L., Mijakovic, I., Deleage, G. & Combet, C. (2012). BYKdb: the Bacterial protein tYrosine Kinase database. *Nucleic Acids Res.*, **40**, D321-324. DOI: 10.1093/nar/gkr915
- Kannan, N., Taylor, S. S., Zhai, Y., Venter, J. C. & Manning, G. (2007). Structural and functional diversity of the microbial kinome. *PLoS Biol.*, **5**, e17. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050017
- Kolmodin, K. & Åqvist, J. (2001). The catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases revisited. *FEBS Lett.*, **498**, 208-213. DOI: 10.1016/s0014-5793(01)02479-6
- Kusebauch, U., Ortega, C., Ollodart, A., Rogers, R. S., Sherman, D. R., Moritz, R. L. & Grundner, C. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* supports protein tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 9265-9270. DOI: 10.1073/pnas.1323894111
- Lacour, S., Bechet, E., Cozzone, A. J., Mijakovic, I. & Grangeasse, C. (2008). Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PLoS One*, **3**, e3053. DOI: 10.1371/journal.pone.0003053
- Lee, D. C. & Jia, Z. (2009). Emerging structural insights into bacterial tyrosine kinases. *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 351-357. DOI: 10.1016/j.tibs.2009.03.003
- Lee, D. C., Zheng, J., She, Y. M. & Jia, Z. (2008). Structure of *Escherichia coli* tyrosine kinase Etk reveals a novel activation mechanism. *EMBO J.*, **27**, 1758-1766. DOI: 10.1038/emboj.2008.97
- Leipe, D. D., Koonin, E. V. & Aravind, L. (2003). Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J. Mol. Biol.*, **333**, 781-815. DOI: 10.1016/j.jmb.2003.08.040
- Libby, E. A., Goss, L. A. & Dworkin, J. (2015). The Eukaryotic-Like Ser/Thr Kinase PrkC Regulates the Essential WalRK Two-Component System in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.*, **11**, e1005275. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005275
- Liu, C., Miller, D. P., Wang, Y., Merchant, M. & Lamont, R. J.

- (2017). Structure-function aspects of the *Porphyromonas gingivalis* tyrosine kinase Ptk1. *Mol. Oral Microbiol.*, **32**, 314-323. DOI: 10.1111/omi.12173
- Ma, L., King, G. F. & Rothfield, L. (2004). Positioning of the MinE binding site on the MinD surface suggests a plausible mechanism for activation of the *Escherichia coli* MinD ATPase during division site selection. *Mol. Microbiol.*, **54**, 99-108. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04265.x
- Macek, B., Forchhammer, K., Hardouin, J., Weber-Ban, E., Grangeasse, C. & Mijakovic, I. (2019). Protein post-translational modifications in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 651-664. DOI: 10.1038/s41579-019-0243-0
- Manuse, S., Fleurie, A., Zucchini, L., Lesterlin, C. & Grangeasse, C. (2016). Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **40**, 41-56. DOI: 10.1093/femsre/fuv041
- Mijakovic, I., Grangeasse, C. & Turgay, K. (2016). Exploring the diversity of protein modifications: special bacterial phosphorylation systems. *FEMS Microbiol. Rev.*, **40**, 398-417. DOI: 10.1093/femsre/fuw003
- Mijakovic, I., Petranovic, D., Macek, B., Cepo, T., Mann, M., Davies, J., Jensen, P. R. & Vujaklija, D. (2006). Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 1588-1596. DOI: 10.1093/nar/gkj514
- Mijakovic, I., Poncet, S., Boël, G., Mazé, A., Gillet, S., Jamet, E., Decottignies, P., Grangeasse, C., Doublet, P., Le Marechal, P. & Deutscher, J. (2003). Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *EMBO J.*, **22**, 4709-4718. DOI: 10.1093/emboj/cdg458
- Morona, J. K., Morona, R., Miller, D. C. & Paton, J. C. (2002). *Streptococcus pneumoniae* capsule biosynthesis protein CpsB is a novel manganese-dependent phosphotyrosine-protein phosphatase. *J. Bacteriol.*, **184**, 577-583. DOI: 10.1128/JB.184.2.577-583.2002
- Morona, J. K., Morona, R., Miller, D. C. & Paton, J. C. (2003). Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)₄ repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **185**, 3009-3019. DOI: 10.1128/JB.185.10.3009-3019.2003
- Nagarajan, S. N., Lenoir, C. & Grangeasse, C. (2022). Recent advances in bacterial signaling by serine/threonine protein kinases. *Trends Microbiol.*, **30**, 553-566. DOI: 10.1016/j.tim.2021.11.005
- Nakamoto, R., Kwan, J. M. C., Chin, J. F. L., Ong, H. T., Flores-Kim, J., Midonet, C., Vannieuwenhze, M. S., Guan, X. L. & Sham, L. T. (2021). The bacterial tyrosine kinase system CpsBCD governs the length of capsule polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118** (45), e2103377118. DOI: 10.1073/pnas.2103377118
- Nguyen, H. A., El Houry, T., Guiral, S., Laaberki, M. H., Candusso, M. P., Galisson, F., Foucher, A. E., Kesraoui, S., Ballut, L., Vallet, S., Orelle, C., Zucchini, L., Martin, J., Page, A., Attieh, J., Aghajari, N., Grangeasse, C. & Jault, J. M. (2017). Expanding the Kinome World: A New Protein Kinase Family Widely Conserved in Bacteria. *J. Mol. Biol.*, **429**, 3056-3074. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.08.016
- Nourikyan, J., Kjos, M., Mercy, C., Cluzel, C., Morlot, C., Noirot-Gros, M. F., Guiral, S., Lavergne, J. P., Veening, J. W. & Grangeasse, C. (2015). Autophosphorylation of the Bacterial Tyrosine-Kinase CpsD Connects Capsule Synthesis with the Cell Cycle in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Genet.*, **11**, e1005518. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005518
- Olivares-Illana, V., Meyer, P., Bechet, E., Gueguen-Chaignon, V., Soulat, D., Lazereg-Riquier, S., Mijakovic, I., Deutscher, J., Cozzone, A. J., Laprevote, O., Morera, S., Grangeasse, C. & Nessler, S. (2008). Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from *Staphylococcus aureus*. *PLoS Biol.*, **6**, e143. DOI: 10.1371/journal.pbio.0060143
- Paiment, A., Hocking, J. & Whitfield, C. (2002). Impact of phosphorylation of specific residues in the tyrosine autokinase, Wzc, on its activity in assembly of group 1 capsules in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **184**, 6437-6447. DOI: 10.1128/JB.184.23.6437-6447.2002
- Pan, Z., Wang, B., Zhang, Y., Wang, Y., Ullah, S., Jian, R., Liu, Z. & Xue, Y. (2015). dbPSP: a curated database for protein phosphorylation sites in prokaryotes. *Database (Oxford)* 2015, bav031. DOI: 10.1093/database/bav031
- Pelletier, A., Freton, C., Gallay, C., Trouve, J., Cluzel, C., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Jault, J. M., Grangeasse, C. & Guiral, S. (2019). The Tyrosine-Autokinase UbK Is Required for Proper Cell Growth and Cell Morphology of *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Microbiol.*, **10**, 1942. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01942
- Pereira, S. F., Goss, L. & Dworkin, J. (2011). Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **75**, 192-212. DOI: 10.1128/MMBR.00042-10
- Pichoff, S. & Lutkenhaus, J. (2007). Identification of a region of FtsA required for interaction with FtsZ. *Mol. Microbiol.*, **64**, 1129-1138. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05735.x
- Rajpurohit, Y. S., Bihani, S. C., Waldor, M. K. & Misra, H. S. (2016). Phosphorylation of *Deinococcus radiodurans* RecA Regulates Its Activity and May Contribute to Radioresistance. *J. Biol. Chem.*, **291**, 16672-16685. DOI: 10.1074/jbc.M116.736389
- Rausch, M., Deisinger, J. P., Ulm, H., Muller, A., Li, W., Hardt, P., Wang, X., Li, X., Sylvester, M., Engeser, M., Vollmer, W., Muller, C. E., Sahl, H. G., Lee, J. C. & Schneider, T. (2019). Coordination of capsule assembly and cell wall biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Nat. Commun.*, **10**, 1404. DOI: 10.1038/s41467-019-09356-x
- Robertson, C. D., Hazen, T. H., Kaper, J. B., Rasko, D. A. & Hansen, A. M. (2018). Phosphotyrosine-Mediated Regulation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*

- Virulence. *mBio*, **9**(1), e00097-18. DOI: 10.1128/mBio.00097-18
- Rosen, B. P., Bhattacharjee, H., Zhou, T. & Walmsley, A. R. (1999). Mechanism of the ArsA ATPase. *Biochim Biophys Acta*, **1461**, 207-215. DOI: 10.1016/s0005-2736(99)00159-5
- Schastnaya, E., Raguz Nakic, Z., Gruber, C. H., Doubleday, P. F., Krishnan, A., Johns, N. I., Park, J., Wang, H. H. & Sauer, U. (2021). Extensive regulation of enzyme activity by phosphorylation in *Escherichia coli*. *Nat. Commun.*, **12**, 5650. DOI: 10.1038/s41467-021-25988-4
- Schwechheimer, C., Hebert, K., Tripathi, S., Singh, P. K., Floyd, K. A., Brown, E. R., Porcella, M. E., Osorio, J., Kiblen, J. T. M., Pagliai, F. A., Drescher, K., Rubin, S. M. & Yildiz, F. H. (2020). A tyrosine phosphoregulatory system controls exopolysaccharide biosynthesis and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.*, **16**, e1008745. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008745
- Seibert, C. M. & Raushel, F. M. (2005). Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*, **44**, 6383-6391. DOI: 10.1021/bi047326v
- Shi, L., Ravikumar, V., Derouiche, A., Macek, B. & Mijakovic, I. (2016). Tyrosine 601 of *Bacillus subtilis* DnaK Undergoes Phosphorylation and Is Crucial for Chaperone Activity and Heat Shock Survival. *Front. Microbiol.*, **7**, 533. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00533
- Shi, Y., Zhang, Y., Lin, S., Wang, C., Zhou, J., Peng, D. & Xue, Y. (2020). dbPSP 2.0, an updated database of protein phosphorylation sites in prokaryotes. *Sci. Data.*, **7**, 164. DOI: 10.1038/s41597-020-0506-7
- Standish, A. J., Teh, M. Y., Tran, E. N. H., Doyle, M. T., Baker, P. J. & Morona, R. (2016). Unprecedented Abundance of Protein Tyrosine Phosphorylation Modulates *Shigella flexneri* Virulence. *J. Mol. Biol.*, **428**, 4197-4208. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.06.016
- Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 183-215. DOI: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183
- Sun, X., Ge, F., Xiao, C. L., Yin, X. F., Ge, R., Zhang, L. H. & He, Q. Y. (2010). Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J. Proteome Res.*, **9**, 275-282. DOI: 10.1021/pr900612v
- Taddei, N., Chiarugi, P., Cirri, P., Fiaschi, T., Stefani, M., Camici, G., Raugei, G. & Ramponi, G. (1994). Aspartic-129 is an essential residue in the catalytic mechanism of the low M(r) phosphotyrosine protein phosphatase. *FEBS Lett.*, **350**, 328-332. DOI: 10.1016/0014-5793(94)00805-1
- Temel, D. B., Dutta, K., Alphonse, S., Nourikyan, J., Grangeasse, C. & Ghose, R. (2013). Regulatory interactions between a bacterial tyrosine kinase and its cognate phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **288**, 15212-15228. DOI: 10.1074/jbc.M113.457804
- Thomasson, B., Link, J., Stassinopoulos, A. G., Burke, N., Plamann, L. & Hartzell, P. L. (2002). MglA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.*, **46**, 1399-1413. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03258.x
- Vincent, C., Doublet, P., Grangeasse, C., Vaganay, E., Cozzone, A. J. & Duclos, B. (1999). Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *J. Bacteriol.*, **181**, 3472-3477. DOI: 10.1128/JB.181.11.3472-3477.1999
- Whitmore, S. E. & Lamont, R. J. (2012). Tyrosine phosphorylation and bacterial virulence. *Int. J. Oral Sci.*, **4**, 1-6. DOI: 10.1038/ijos.2012.6
- Zhang, Z. Y., Wang, Y., Wu, L., Fauman, E. B., Stuckey, J. A., Schubert, H. L., Saper, M. A. & Dixon, J. E. (1994). The Cys(X)5Arg catalytic motif in phosphoester hydrolysis. *Biochemistry*, **33**, 15266-15270. DOI: 10.1021/bi00255a007
- Zhao, X. & Lam, J. S. (2002). WaaP of *Pseudomonas aeruginosa* is a novel eukaryotic type protein-tyrosine kinase as well as a sugar kinase essential for the biosynthesis of core lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, **277**, 4722-4730. DOI: 10.1074/jbc.M107803200