

Nuevos componentes del divisoma de *Corynebacteriales* identificados por una estrategia proteómica de marcado por proximidad en las células vivas

Azalia Rodríguez 1*, Mariano Martínez 2, Daniela Megrian 2, Jessica Rossello 1, Quentin Gaday 2, Julienne Petit 2, María Magdalena Portela 1, Mathilde Ben Assaya 2, Pedro Alzari 2, Anne Marie Wehenkel 2, Rosario Durán 1

1. Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur Montevideo/Instituto Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

2. Unidad de Microbiología Estructural, Institut Pasteur Paris, Paris, France.

La división celular bacteriana es un proceso dirigido por el divisoma, complejo macromolecular cuyo ensamblaje comienza con la polimerización de la proteína FtsZ en el sitio de división. FtsZ participa en el reclutamiento de otras proteínas del divisoma, que para *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* han sido bien caracterizadas. Sin embargo, el suborden *Corynebacterineae* (incluye importantes patógenos humanos) carece de homólogos reconocibles para muchas de estas proteínas del divisoma. Este trabajo se centra en descifrar la arquitectura molecular del divisoma en este grupo de bacterias. Desarrollamos una estrategia proteómica basada en la biotilación por proximidad para estudiar el divisoma de *Corynebacterium glutamicum*. Generamos una cepa que expresa FtsZ fusionada a una ascorbato peroxidasa ingenierizada (APEX2). APEX2 cataliza la oxidación de fenol biotina en presencia de H₂O₂ dando lugar a un radical que reacciona con aminoácidos de proteínas cercanas. Esto permitió marcar el entorno proteómico de FtsZ en la célula viva para su purificación e identificación por Espectrometría de Masa. Hemos identificado 253 vecinos confiables de FtsZ, que incluye proteínas de división celular conocidas y un gran número de proteínas no caracterizadas. Nos centramos en proteínas de membrana hipotéticas, que podrían mediar el anclaje del anillo Z a la membrana. Generamos cepas que expresan los candidatos seleccionados fusionados a una sonda fluorescente para evaluar su localización subcelular y su interacción con FtsZ. Los resultados permitieron identificar nuevos miembros conservados del divisoma de *corinebacterias*. Actualmente estudiamos su papel en la división celular, los detalles moleculares de su interacción con el anillo Z y su regulación mediante fosforilación de proteínas.

Bibliografía:

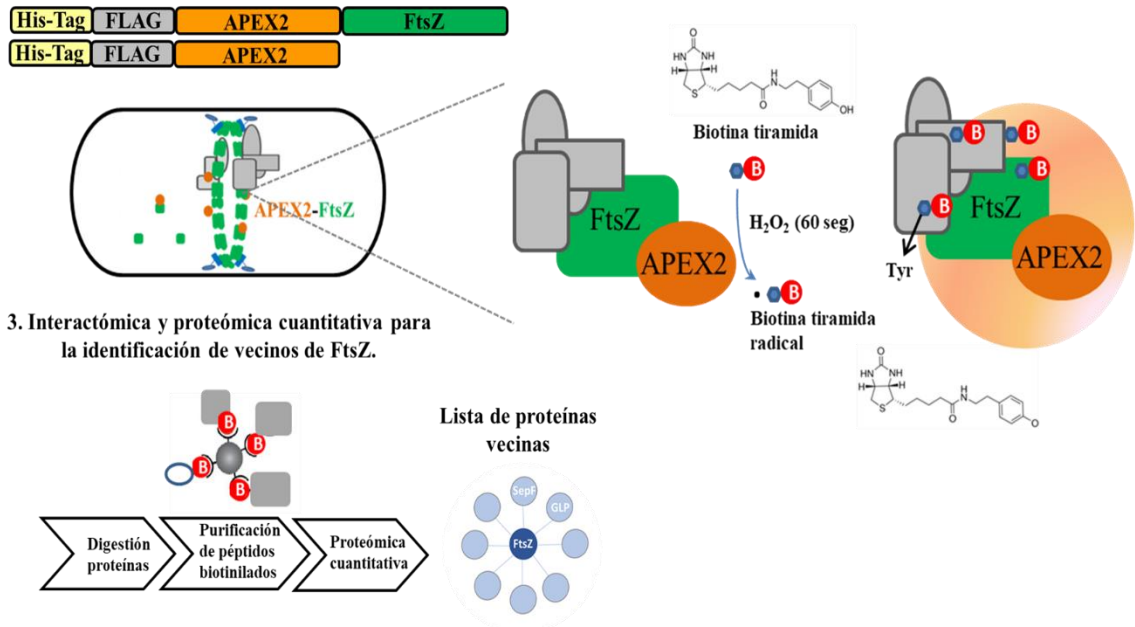
1. Samavarchi-Tehrani et cols, Molecular & Cellular Proteomics, 2020.
2. Sogues, A., et al., Nature Communications, 2020. 11: p.1641.

Figura:

Marcado enzimático por proximidad *in vivo*: Estrategia APEX2

1. Obtención de las cepas APEX2_FtsZ y APEX2 en *C. glutamicum*.

2. Marcado por proximidad en la célula viva con APEX2.



Esquema de la estrategia de marcado por proximidad basada en APEX2 para explorar el entorno proteómico de FtsZ. El APEX2-FtsZ de *C. glutamicum* expresa FtsZ fusionado a APEX2, bajo el control de un promotor de baja actividad transcripcional reprimido por sacarosa e inducido por gluconato. APEX2 en presencia de fenol biotina (biotin tyramide) 5 mM y un pulso corto de H₂O₂ 1 mM (1 min) genera radicales biotina-fenoxilo altamente reactivos que modifican los aminoácidos en proteínas cercanas, principalmente residuos Tyr. Como control, utilizamos una cepa que expresaba únicamente APEX2. Las proteínas y péptidos marcados se purificaron utilizando columnas de afinidad y se identificaron mediante nano LC-MS/MS.