

# Informe final publicable de proyecto

## Descifrando la arquitectura molecular del elongasoma y divisoma de *Corynebacterineae* mediante marcado por proximidad en la célula viva

Código de proyecto ANII: FCE\_1\_2019\_1\_155569

04/12/2023

**DURÁN MUÑOZ, María Del Rosario** (Responsable Técnico - Científico)

**GADAY, Quentin** (Investigador)

**KAMAID TOTH, Andrés** (Investigador)

**LEYVA PEÑA, Alejandro** (Investigador)

**LIMA RAIMONDO, Analía** (Investigador)

**MALACRIDA RODRIGUEZ, Leonel Sebastian** (Investigador)

**MARTÍNEZ, Mariano** (Investigador)

**MEGRAN NÚÑEZ, Daniela** (Investigador)

**WEHENKEL, Annemarie** (Investigador)

---

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO (Institución Proponente) \\ INSTITUT PASTEUR PARIS \\

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE" \\

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO

## Resumen del proyecto

La elongación y la división celular de bacilos son procesos dirigidos por dos complejos de proteínas denominados elongasoma y divisoma respectivamente. El conocimiento actual acerca de la arquitectura de estos complejos proviene mayoritariamente del estudio de organismos modelo, para los que se han identificado muchos de sus componentes. Sin embargo, para el orden *Corynebacteriales*, la información disponible es muy fragmentaria y pone de manifiesto diferencias importantes con las bacterias modelo. Muchas de las proteínas claves del elongasoma y divisoma de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* no presentan homólogos reconocibles en el orden *Corynebacteriales*. Además, existen fuertes evidencias de que estas bacterias utilizan la fosforilación de proteínas como mecanismo para regular el ensamblado del divisoma y elongasoma. En este proyecto nos planteamos contribuir a elucidar la arquitectura molecular de estos complejos mediante la exploración del entorno proteómico de componentes del divisoma y/o elongasoma con alta resolución espacial. Para ello, utilizamos dos aproximaciones interactómicas complementarias centradas en componentes clave de estos complejos y en distintos contextos de fosforilación: marcado por proximidad en la célula viva y entrecruzamiento químico, ambas acopladas a espectrometría de masa. Los resultados obtenidos a través del análisis de más de 15 interactomas nos han permitido identificar y caracterizar nuevos componentes de los complejos en estudio y mapear redes de interacciones en el septo y el polo de la célula. Además, realizamos una caracterización funcional de algunos de estos componentes seleccionados. Globalmente, la ejecución del presente proyecto permitió mejorar nuestra comprensión a nivel molecular de dos procesos esenciales en un grupo de bacterias de gran importancia médica e industrial: la elongación y división celular. Además, nos permitió identificar nuevos potenciales blancos para agentes antimicrobianos con modos de acción muy específicos para estas bacterias, que incluyen importantes patógenos humanos, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* y *Corynebacterium diphtheriae*.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Proteómica microbiana**

**Palabras clave: elongasoma/divisoma / Corynebacterineae / espectrometría de masa /**

## Introducción

El crecimiento y la división celular de los bacilos son procesos temporal y espacialmente coordinados, y dirigidos por los complejos de proteínas denominados elongasoma y divisoma respectivamente. El ensamblaje del divisoma comienza con la polimerización de una proteína muy conservada, FtsZ (el homólogo bacteriano de la tubulina) que forma un anillo contráctil en el sitio de división (Mateos-Gil, Tarazona, & Velez, 2019). Este anillo sirve de plataforma para el reclutamiento, secuencial y ordenado, de un repertorio de proteínas estructurales y accesorias que conforman el complejo funcional de la división celular. Estas incluyen las proteínas responsables del anclaje del anillo a la membrana y las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular. Por otro lado, el elongasoma, que guía la síntesis de pared celular durante el crecimiento, se ensambla en torno a otra proteína: MreB, el homólogo bacteriano de la actina. Y también incluye la maquinaria necesaria para la biosíntesis de la envoltura celular. (Szwedziak & Lowe, 2013). Nuestro conocimiento actual acerca de la elongación y división celular en bacilos proviene en gran medida del estudio de organismos modelo: *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Para estas bacterias se identificaron varias decenas de proteínas que forman parte del divisoma y/o elongasoma, y se han comenzado a comprender los mecanismos de su ensamblaje (Adams & Errington, 2009; Lutkenhaus, Pichoff, & Du, 2012).

Sin embargo, este conocimiento acumulado no es fácilmente extrapolable a otras bacterias. En particular, el orden *Corynebacteriales*, que comprende los géneros *Corynebacterium* y *Mycobacterium* entre otros, presenta particularidades importantes en la elongación y división celular (Donovan & Bramkamp, 2014; Hett & Rubin, 2008). Estas bacterias se caracterizan por una pared celular única y compleja, compuesta por peptidoglicano unido covalentemente a estructuras de arabinogalactanos esterificadas con ácidos micólicos (Brennan & Nikaido, 1995). Además, el crecimiento celular se da a partir de los polos, a diferencia de los bacilos bien estudiados que crecen desde la superficie lateral (Brown, Kysela, & Brun, 2011; Jones, Carballido-Lopez, & Errington, 2001). Para estas bacterias se demostró que el etambutol inhibe el crecimiento apical pero no la división celular, indicando que elongasoma y divisoma utilizarían maquinarias al menos parcialmente diferentes para la biosíntesis de pared (Schubert et al., 2017). El análisis genómico evidencia diferencias también a nivel molecular. Muchas de las proteínas claves para la división y elongación en *E. coli* y *B. subtilis*, incluyendo MreB, las proteínas que anclan FtsZ a la membrana y el sistema MinCDE que regula la posición del anillo en medio de la

célula, no presentan homólogos reconocibles en los Corynebacteriales (Donovan & Bramkamp, 2014; Hett & Rubin, 2008; Letek et al., 2008). Al mismo tiempo, últimamente se han comenzado a identificar proteínas que son específicas del divisoma y elongasoma de micobacterias y corinebacterias, y cuya función es aún poco comprendida (Plocinski et al., 2012; Plocinski et al., 2013; Plocinski et al., 2011). Finalmente, existen fuertes evidencias de que los Corynebacteriales utilizan la fosforilación de proteínas como un mecanismo para regular la elongación y división celular (Bellinzoni, Wehenkel, Duran, & Alzari, 2019; Molle & Kremer, 2010; Wehenkel et al., 2008). Diversas proteínas del divisoma y/o elongasoma de estas bacterias están fosforiladas, incluida la propia FtsZ (Schultz et al., 2009; Sureka et al., 2010; Thakur & Chakraborti, 2006), siendo PknA la Ser/Thr quinasa identificada como responsable de la fosforilación de FtsZ (Thakur & Chakraborti, 2006).

Con el fin de contribuir a elucidar la arquitectura molecular de estos complejos, en este proyecto nos propusimos desarrollar estrategias de marcado por proximidad en células vivas, una aproximación experimental novedosa para el análisis de complejos de macromoléculas y que aún ha sido muy poco utilizada en bacterias. Nos planteamos explorar el entorno proteómico de componentes clave del divisoma y/o elongasoma con el fin de identificar las proteínas que podrían cumplir las funciones de las piezas faltantes en los Corynebacteriales, y evaluar la relevancia de interacciones moleculares seleccionadas en la estructura y función de estos complejos. A su vez nos propusimos estudiar el entorno proteómico de proteínas claves del elongasoma y divisoma en cepas deficientes en la fosforilación de proteínas. Los resultados obtenidos nos permitirían identificar nuevos componentes del divisoma y elongasoma de este grupo de bacterias, así como entender el rol de la fosforilación de proteínas en estas interacciones, contribuyendo con nuestra comprensión de procesos esenciales en los Corynebacteriales. Finalmente, destacamos que los resultados obtenidos en el marco de este proyecto nos permitirían identificar nuevos potenciales blancos para agentes antimicrobianos con modos de acción muy específicos para un grupo de bacterias que incluye importantes patógenos humanos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* y *Corynebacterium diphtheriae*.

## **Metodología/diseño del estudio**

Como primer paso hacia la identificación de nuevos integrantes del divisoma y elongasoma, nos propusimos desarrollar, optimizar y validar una estrategia de marcado por proximidad en células vivas, utilizando como bacteria modelo del grupo en estudio a *Corynebacterium glutamicum*. Esta es una bacteria no patógena, de crecimiento rápido y de gran importancia en la producción industrial de aminoácidos. Por este motivo ha sido ampliamente estudiada, y hay una variedad de herramientas de biología molecular disponibles, lo que la convierte en un excelente modelo.

Las estrategias de marcado por proximidad permiten explorar el entorno proteómico de proteínas de interés en condiciones fisiológicas (Lobingier et al., 2017; Roux, Kim, Raida, & Burke, 2012). Se basan en la expresión de la proteína cebo fusionada a una enzima ingenierizada que es capaz de introducir, en ciertas condiciones, una marca en aquellas proteínas que se encuentren próximas en el contexto de la célula viva. Estas aproximaciones presentan enormes ventajas frente a los métodos clásicos, al permitir identificar interacciones proteína-proteína débiles o transitorias, o que involucran proteínas de membrana. Dos tipos principales de enzimas se utilizan para el etiquetado por proximidad: ligasas de biotina mutantes con especificidad relajada (BioID) (Roux, Kim, & Burke, 2013; Roux et al., 2012) y ascorbato peroxidasas ingenierizadas (APEX) (Hung et al., 2017; Hung et al., 2014; Rhee et al., 2013). Ambas enzimas han sido utilizadas con éxito en diferentes sistemas biológicos para describir la composición de organelos, la arquitectura de complejos macromoleculares y de vías de señalización, fundamentalmente en organismos eucariotas (Kang & Rhee, 2022; Lobingier et al., 2017; Qin, Cho, Cavanagh, & Ting, 2021; Roux et al., 2012; Samavarchi-Tehrani, Samson, & Gingras, 2020). En el marco de este proyecto seleccionamos una estrategia basada en ascorbato peroxidasas, donde las células expresando APEX2 fusionada a nuestra proteína de interés se incuban con un compuesto fenólico derivado de biotina (fenol-biotina), y se someten a un pulso corto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En estas condiciones se generan radicales biotina-fenoxilo de vida media corta en las inmediaciones de nuestra proteína que reaccionan con cadenas laterales de aminoácidos situados en un radio de unos pocos nanómetros (principalmente Tyr y Trp). Esta modificación constituye una etiqueta para la posterior purificación e identificación de proteínas por espectrometría de masa; y cuando se asocia a análisis proteómicos cuantitativos permite el mapeo de interacciones y su topología. Dado que el etiquetado ocurre en tiempos cortos (exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> < 1 min), ésta es una técnica ideal para obtener instantáneas de los entornos proteómicos y estudiar procesos dinámicos (Hung et al., 2014; Lobingier et al., 2017). En este proyecto planteamos expresar en *Corynebacterium glutamicum* las proteínas centrales del elongasoma (Wag31) y el divisoma (FtsZ), así como la proteína FhaA integrante de ambos complejos, fusionadas a una ascorbato peroxidasa ingenierizada (APEX2), con niveles comparables a los fisiológicos. Esto es importante para no introducir artefactos en el ensamblado de los complejos, ni alterar la normal elongación y división

celular. La expresión se llevará a cabo utilizando un promotor inducible de baja actividad transcripcional (PgntK) reprimido por sacarosa e inducido por gluconato (Letek et al., 2006). La evaluación de las cepas es un paso clave para determinar su utilidad en el marco del proyecto, y se llevará a cabo mediante estudios fenotípicos, morfológicos y distintos controles a nivel de proteomas que nos permitan verificar los niveles de expresión de las proteínas fusionadas a APEX2 y descartar cambios importantes en la expresión de otras proteínas. Dado que la estrategia APEX implica una exposición corta a concentraciones micromolares o sub-micromolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se evaluará el efecto que este tratamiento pueda tener en el proteoma. Finalmente se llevará a cabo el marcaje con fenol-biotina dependiente de APEX2 en la célula viva y la identificación de proteínas y péptidos biotinilados por espectrometría de masa. Brevemente, el procedimiento implica la incubación las distintas cepas con fenol-biotina para su captación, la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para iniciar el etiquetado, y la detención de la reacción de marcado, como ha sido previamente reportado (Santin et al., 2018). Dado que no existen reportes que utilicen esta estrategia en *C. glutamicum*, es necesario optimizar las condiciones de marcado (concentraciones de fenol-biotina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tiempos de incubación, etc.). Las proteínas y péptidos marcadas se purificarán utilizando diversas columnas con afinidad por biotina, y serán identificadas por espectrometría de masa luego de la digestión con tripsina. Para la identificación de proteínas utilizaremos un espectrómetro de masa híbrido cuadrupolo-orbitrap (Q-exactive-Plus, Thermo) asociado a un sistema de nano-HPLC. Estos experimentos nos proporcionarán una primera lista de proteínas ubicadas en las cercanías de FtsZ o Wag31 y que esperamos incluyan proteínas conocidas integrantes del elongasoma y/o divisoma que validen la estrategia experimental. Como control del marcado inespecífico (y de pegado inespecífico a las columnas de afinidad) evaluamos la biotinilación endógena utilizando una cepa que solamente expresa APEX2.

En forma complementarias se llevan a cabo estudios interactómicos utilizando una estrategia de entrecruzamiento químico en la célula viva asociado a co-inmunoprecipitación y análisis por espectrometría de masa, una estrategia previamente optimizada en nuestro laboratorio. En este caso, no solo se ven como proteínas de anclaje a las antes mencionadas (FtsZ, Wag31 y FhaA), sino que se extienden los estudios para incluir además los interactomas de la única proteína identificada capaz de anclar el anillo FtsZ a la membrana en *Corynebacteriales*, así como de los nuevos integrantes del divisoma que van siendo identificados en el marco de la investigación.

En conjunto estas estrategias interactómicas y de exploración de entornos proteómicos nos permitirán identificar un conjunto de proteínas que representan posibles nuevos integrantes del divisoma y elongasoma. A partir de esta lista se seleccionarán un grupo de candidatos para ser validados como nuevos integrantes de los complejos. Para ello estudiaremos su localización subcelular mediante microscopia de fluorescencia y analizaremos el fenotipo de las cepas que sobreexpresan las proteínas candidatas para evaluar su posible rol sobre el crecimiento y la división celular.

## Resultados, análisis y discusión

### 1. Desarrollo y optimización de la estrategia de marcado por proximidad en la célula viva en *C. glutamicum*

La estrategia desarrollada se resume en la Figura 1 del anexo. Inicialmente obtuvimos una cepa de *C. glutamicum* que expresa FtsZ fusionada a APEX2 y a dos tags: Histag y FLAG (denominada APEX2\_FtsZ en este informe). En base a resultados previos de nuestro grupo que mostraron que fluoróforos fusionados al N-terminal de FtsZ no alteran su función normal (Sogues et al., 2020), decidimos introducir APEX2 en esta posición. La fusión APEX2-FtsZ se expresó bajo el control del promotor PgntK inducido por gluconato; y se utilizó *C. glutamicum* que expresa Histag-FLAG-APEX2 bajo el control del mismo promotor (cepa APEX2) como control del etiquetado inespecífico. La correcta expresión de las construcciones APEX2 o APEX2-FtsZ se corroboró por Western blot en lisados celulares utilizando anticuerpos anti-FLAG (Figura 2A en la caracterización de estas cepas incluyó la evaluación de la morfología celular utilizando distintas concentraciones de inductor. Mientras que a concentraciones altas de gluconato se observó una morfología celular alterada con células muy largas y multi-septadas (1% de gluconato), cuando la inducción se realizó con 0,05% Gluconato la mayoría de las células presentaban 0 o 1 tabique, aun cuando se detectaron algunas diferencias significativas en el largo o el número de células con más de dos tabiques (Figura 2B en anexo). En concordancia con este resultado, la curva de crecimiento de APEX2-FtsZ usando 0,05% de gluconato fue comparable a la de la cepa WT (Figura 2C en anexo). Por otro lado, comparamos el proteoma de la cepa APEX2-FtsZ (0,05% de gluconato) con la cepa WT para evaluar posibles efectos sobre la expresión global de proteínas que pudieran introducir un sesgo en la estrategia de marcado por proximidad. Identificamos 1218 y 1167 proteínas en las cepas APEX2-FtsZ y WT respectivamente, y solo 27 de ellas mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión considerando una tasa de cambio  $\geq 2$  (p ajustado  $\geq 0,05$ ), lo que apunta a efectos muy modestos de la expresión de APEX2-FtsZ sobre el proteoma total (ver tabla suplementaria 1). El análisis del proteoma también nos permitió evaluar los niveles de sobreexpresión de FtsZ. Los resultados muestran que usando 0.05% de gluconato, FtsZ está estadísticamente sobre representada en APEX2-FtsZ con una tasa de cambio de 1,87; y permiten

corroborar la secuencia de la proteína de fusión (con 36 péptidos y 182 espectros de los cuales 29 correspondían a APEX2 y 153 a FtsZ) (Figura 3A y B en anexo). En conjunto estos resultados indican que los niveles de expresión de APEX2-FtsZ usando 0,05% de gluconato no alteran en forma importante el fenotipo, el crecimiento o el proteoma, y por tanto seleccionamos esta condición para la identificación de vecinos fisiológicos de FtsZ. A continuación, evaluamos la actividad de APEX2 en *C. glutamicum*. El análisis por Western blot indicó la presencia de niveles bajos de proteínas biotiniladas en las cepas WT y APEX2-FtsZ en ausencia de fenol-biotina (PB) y H2O2, así como en la cepa WT en presencia de estos sustratos de la peroxidasa APEX2 (Figura 4A en anexo). Esto indica que ni la biotinilación basal ni la actividad de peroxidasas endógenas imponen limitaciones para el marcaje mediado por APEX2 en *C. glutamicum*. Solo se observó un claro aumento en las proteínas biotiniladas cuando la cepa APEX2-FtsZ se incubaba con PB y H2O2, lo que confirma la actividad de APEX2 en el contexto bioquímico de *C. glutamicum* (Figura 4A en anexo). Además, comparamos los patrones de biotinilación cuando se detuvo la reacción de marcaje antes o después del agregado de los sustratos de APEX. La ausencia de actividad APEX cuando se cuándo se agrega la solución de “quenching” antes del H2O2 nos permitió confirmar que los eventos de biotinilación detectados ocurren en el contexto de la célula viva y no después de la lisis (Figura 4B en anexo). Finalmente, demostramos que en nuestro sistema la exposición corta al H2O2 no produce un incremento significativo en la oxidación de Metioninas (Figura 4C en anexo). En conjunto, nuestros resultados indican que la estrategia desarrollada basada en APEX2 representa un enfoque válido para mapear proteínas en los alrededores de FtsZ en *C. glutamicum* y para identificar nuevos componentes del divisoma fisiológicamente relevantes.

## 2. Identificación de vecinos de proteína clave del elongosoma y divisoma de *C. glutamicum* mediante marcaje por proximidad

Para identificar nuevos componentes del divisoma nos centramos inicialmente en la identificación de proteínas próximas a FtsZ en la célula viva. Para ello utilizamos las cepas APEX2 y APEX2-FtsZ, y realizamos el marcaje en presencia de PB y H2O2 utilizando cuatro réplicas biológicas y dos replicas técnicas de cada condición. Nos basamos en los péptidos modificados con fenol-biotina para aumentar la confianza en la identificación de los vecinos y proporcionar información estructural y topológica sobre los complejos de proteínas.

Los péptidos biotinilados se enriquecieron mediante cromatografía de afinidad y se analizaron mediante nano-LC-MS/MS. La identificación de péptidos modificados con PB en nuestros conjuntos de datos demostró que la tirosina era el aminoácido modificado con mayor frecuencia, en concordancia con datos previamente reportados en otros sistemas biológicos (Udeshi et al., 2017) (Figura 5A en anexo). En promedio, el 98,9 de todos los espectros modificados con PB correspondían a Tirosinas (y el 96,7% de las secuencias modificadas con PB). Los espectros de MS/MS de péptidos conteniendo residuos de Tyr modificados con PB mostraron sistemáticamente la presencia de dos iones diagnósticos intensos:  $m/z=480,19$  (ion PB-Tyr imonio - NH3) y  $m/z=497,22$  (PB-Ion imonio Tyr); además del ion deshidrobiotina ( $m/z = 227,09$ ) (Kim et al., 2018; Renuse et al., 2020) (Figura 5B en anexo). Con el fin de disminuir las identificaciones de falsos positivos, seleccionamos automáticamente espectros asignados a la modificación de PB (+361,1460 Da) y que contenían cualquiera de los tres iones de diagnóstico en los espectros de MS/MS usando Patternlab V. Para distinguir cuantitativamente a los verdaderos vecinos de FtsZ de proteínas etiquetadas inespecíficamente comparamos los péptidos modificados con PB recuperados de APEX2-FtsZ y APEX2. Identificamos un total de 6464 espectros asignados a péptidos diferenciablemente modificados con PB correspondientes a 392 secuencias de péptidos y 253 proteínas (Figura 5C en anexo, Tablas suplementarias 2 y 3). Además de APEX2 y FtsZ, esta lista incluye 251 proteínas que representan vecinos de FtsZ en la célula viva. Como era de esperar, la propia APEX2-FtsZ se marcó fuertemente en nuestro conjunto de datos, con 213 espectros que mostraban la modificación específica de PB. Sin embargo, la proteína con mayor número de espectros marcados con PB asignados a su secuencia fue la proteína de membrana SepF (con 487 espectros modificados). SepF es una proteína del divisoma conocida y hasta ahora, la única proteína identificada con un rol en el anclaje del anillo Z a la membrana (Sogues et al., 2020). Además, se recuperaron como vecinos de FtsZ otras proteínas que validan la estrategia experimental, entre ellas: Wag31, la proteína central del elongosoma que también se ubica en el septo durante parte del ciclo celular de *C. glutamicum*, y GLP (un integrante del divisoma recientemente identificado por nuestro grupo utilizando la estrategia de entrecruzamiento químico asociado a espectrometría de masa (Martinez et al., 2023) (ver Tablas suplementarias 2 y 3 en anexo).

De igual manera se estudiaron los vecinos de Wag31 y FhaA, lo que nos llevó a la identificación de 22 y 113 proteínas respectivamente, y todas estas listas incluyen la presencia de interactores previamente reportados como controles positivos.

## 3. Identificación de interactores de FtsZ en cepas deficientes en la fosforilación de proteínas

Con el fin de evaluar el efecto de la fosforilación de FtsZ en la composición y ensamblaje del divisoma expresamos APEX2-FtsZ en una cepa knockout para la quinasa de proteínas PknA, responsable de fosforilar FtsZ. La comparación de los vecinos de FtsZ en condiciones salvajes y en ausencia de PknA nos permitió identificar una lista de proteínas cuyo reclutamiento al divisoma estaría mediado por la fosforilación de FtsZ (Figura 6 en anexo). Entre ellas se destacan una serie de proteínas de membrana de función desconocida que se seleccionan para su validación como nuevos integrantes del divisoma.

#### 4. Identificación de interactores mediante entrecruzamiento químico en la célula viva.

Con el fin de mejorar la selección de candidatos a validar se realizó un estudio a mayor escala de interactores de integrantes conocidos de los complejos elongasoma y divisoma de *C. glutamicum*. Inicialmente, el interactoma de SepF, proteína que participa en el anclaje del anillo de FtsZ a la membrana, nos llevó a identificar dos nuevos actores clave en el divisoma: Glp, una molibdotransferasa, y GlpR, su receptor de membrana. Estas proteínas desempeñan un papel crucial en el ciclo celular bacteriano. La interacción entre ella permite conectar a las proteínas centrales del divisoma y el elongasoma en medio de la célula, estableciendo por primera vez un enlace a nivel molecular entre ambas maquinarias. Estos hallazgos fueron recientemente publicados (Martinez et al., 2023) por que no se detallan en profundidad en este informe.

A su vez, estudiamos los interactomas de FtsZ, Wag31, GLP, FhaA y SteA, e integramos toda la información generando redes de interacciones que nos permiten empezar a definir el proteoma del elongasoma y el divisoma.

Un ejemplo de los mapas que llevan a la identificación de "core" proteoma del divisoma se muestra en la Figura 6 del anexo.

#### 5. Validación de interacciones.

Finalmente nos centramos en 7 proteínas hipotéticas de membrana identificadas en forma muy confiable como interactores de FtsZ. El interés en estas proteínas radica en que la mayoría de las proteínas responsables del anclaje del anillo Z a la membrana están ausentes en los Corynebacteriales. Para ello expresamos las proteínas seleccionadas fusionadas a mNeon para su visualización por microscopia de fluorescencia. Mediante análisis cuantitativos verificamos que 6 de las 7 proteínas se localizan específicamente en el septo (Figura 8 en anexo), y por tanto representan nuevos promitentes integrantes del divisoma. Además, obtuvimos una cepa KO para una de estas proteínas como primer paso hacia la elucidación de su función en la división celular de los corynebacteriales.

### Conclusiones y recomendaciones

La ejecución del presente proyecto tuvo un rol fundamental para mejorar nuestra comprensión a nivel molecular de dos procesos esenciales en un grupo de bacterias de gran importancia médica e industrial: la elongación y división celular. Nos permitió identificar dos nuevos actores claves en la división celular y descifrar su red de interacciones que vinculan la proteína central del divisoma con la proteína central del elongasoma en medio de la célula. Esto ha permitido evidenciar las bases moleculares de la interacción entre las maquinarias de división y crecimiento celular y apuntan a un rol fundamental de las nuevas proteínas en la transición septo-polo. Tanto para la identificación de estos nuevos componentes, como para la dilucidación de su mecanismo de acción, fueron de vital importancia las aproximaciones interactómicas sin sesgo utilizadas en este proyecto (Martínez M et al, 2023). Además, identificamos 6 proteínas, previamente anotadas como hipotéticas de membrana, como nuevos componentes del septo. Y hemos comenzado la caracterización de la función de estas proteínas a través de las cepas que las sobreexpresan y una cepa de delección. Finalmente, los análisis interactómicos a gran escala centrados en diversos componentes bien caracterizados del divisoma, del elongasoma, o de ambos; así como de los nuevos componentes identificados en el marco del proyecto; nos permitieron generar grandes datos que fueron integrados con el fin de comenzar a delinear la composición de cada uno de esos complejos y definir los proteomas subcelulares del septo y el polo. En resumen, consideramos que los datos obtenidos hacen una contribución importante en un área del conocimiento de gran relevancia, y permiten abrir nuevas interrogantes que sin duda darán lugar a futuras investigación por este u otros grupos de investigación.

Queremos resaltar que la puesta a punto de una estrategia novedosa para estudiar el entorno proteómico en bacterias es en sí misma un aporte importante del proyecto. Esta estrategia no sólo fue fundamental para identificar nuevos componentes del elongasoma y divisoma de los Corynebacteriales, sino que además es adecuada para responder una enorme cantidad de problemas biológicos. La difusión de los resultados del proyecto ya ha despertado el interés de diversos grupos de investigación nacionales con quienes estamos colaborando para aplicar esta estrategia en diferentes sistemas, y el marcado por proximidad en la célula viva ya se ha incorporado en diversos proyectos en marcha y postulaciones.

La formación de recursos humanos en un ámbito multidisciplinario es también un aporte muy importante de este proyecto, y cumplirá un papel fundamental en facilitar la aplicaciones de las metodologías desarrolladas en nuevas investigaciones.

## Referencias bibliográficas

- Adams, D. W., & Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol*, 7(9), 642-653. doi: 10.1038/nrmicro2198
- Bellinzoni, M., Wehenkel, A. M., Duran, R., & Alzari, P. M. (2019). Novel mechanistic insights into physiological signaling pathways mediated by mycobacterial Ser/Thr protein kinases. *Genes Immun*, 20(5), 383-393. doi: 10.1038/s41435-019-0069-9
- Brennan, P. J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*, 64, 29-63. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000333
- Brown, P. J., Kysela, D. T., & Brun, Y. V. (2011). Polarity and the diversity of growth mechanisms in bacteria. *Semin Cell Dev Biol*, 22(8), 790-798. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.06.006
- Donovan, C., & Bramkamp, M. (2014). Cell division in *Corynebacterineae*. *Front Microbiol*, 5, 132. doi: 10.3389/fmicb.2014.00132
- Hett, E. C., & Rubin, E. J. (2008). Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(1), 126-156, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.00028-07
- Hung, V., Lam, S. S., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Guzman, G., Mootha, V. K., . . . Ting, A. Y. (2017). Proteomic mapping of cytosol-facing outer mitochondrial and ER membranes in living human cells by proximity biotinylation. *Elife*, 6. doi: 10.7554/eLife.24463
- Hung, V., Zou, P., Rhee, H. W., Udeshi, N. D., Cracan, V., Svinkina, T., . . . Ting, A. Y. (2014). Proteomic mapping of the human mitochondrial intermembrane space in live cells via ratiometric APEX tagging. *Mol Cell*, 55(2), 332-341. doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.003
- Jones, L. J., Carballido-Lopez, R., & Errington, J. (2001). Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 104(6), 913-922.
- Kang, M. G., & Rhee, H. W. (2022). Molecular Spatiomics by Proximity Labeling. *Acc Chem Res*, 55(10), 1411-1422. doi: 10.1021/acs.accounts.2c00061
- Kim, D. I., Cutler, J. A., Na, C. H., Reckel, S., Renuse, S., Madugundu, A. K., . . . Pandey, A. (2018). BioSITE: A Method for Direct Detection and Quantitation of Site-Specific Biotinylation. *J Proteome Res*, 17(2), 759-769. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00775
- Letek, M., Ordonez, E., Vaquera, J., Margolin, W., Flardh, K., Mateos, L. M., & Gil, J. A. (2008). DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, 190(9), 3283-3292. doi: 10.1128/JB.01934-07
- Letek, M., Valbuena, N., Ramos, A., Ordonez, E., Gil, J. A., & Mateos, L. M. (2006). Characterization and use of catabolite-repressed promoters from gluconate genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, 188(2), 409-423. doi: 10.1128/JB.188.2.409-423.2006
- Lobingier, B. T., Huttenhain, R., Eichel, K., Miller, K. B., Ting, A. Y., von Zastrow, M., & Krogan, N. J. (2017). An Approach to Spatiotemporally Resolve Protein Interaction Networks in Living Cells. *Cell*, 169(2), 350-360 e312. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.022
- Lutkenhaus, J., Pichoff, S., & Du, S. (2012). Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 69(10), 778-790. doi: 10.1002/cm.21054



- Martinez, M., Petit, J., Leyva, A., Sogues, A., Megrian, D., Rodriguez, A., . . . Wehenkel, A. M. (2023). Eukaryotic-like gephyrin and cognate membrane receptor coordinate corynebacterial cell division and polar elongation. *Nat Microbiol*, 8(10), 1896-1910. doi: 10.1038/s41564-023-01473-0
- Mateos-Gil, P., Tarazona, P., & Velez, M. (2019). Bacterial cell division: modeling FtsZ assembly and force generation from single filament experimental data. *FEMS Microbiol Rev*, 43(1), 73-87. doi: 10.1093/femsre/fuy039
- Molle, V., & Kremer, L. (2010). Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: Mycobacterium shows the way. *Mol Microbiol*, 75(5), 1064-1077. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07041.x
- Plocinski, P., Arora, N., Sarva, K., Blaszczyk, E., Qin, H., Das, N., . . . Rajagopalan, M. (2012). Mycobacterium tuberculosis CwsA interacts with CrgA and Wag31, and the CrgA-CwsA complex is involved in peptidoglycan synthesis and cell shape determination. *J Bacteriol*, 194(23), 6398-6409. doi: 10.1128/JB.01005-12
- Plocinski, P., Martinez, L., Sarva, K., Plocinska, R., Madiraju, M., & Rajagopalan, M. (2013). Mycobacterium tuberculosis CwsA overproduction modulates cell division and cell wall synthesis. *Tuberculosis (Edinb)*, 93 Suppl, S21-27. doi: 10.1016/S1472-9792(13)70006-4
- Plocinski, P., Ziolkiewicz, M., Kiran, M., Vadrevu, S. I., Nguyen, H. B., Hugonnet, J., . . . Rajagopalan, M. (2011). Characterization of CrgA, a new partner of the Mycobacterium tuberculosis peptidoglycan polymerization complexes. *J Bacteriol*, 193(13), 3246-3256. doi: 10.1128/JB.00188-11
- Qin, W., Cho, K. F., Cavanagh, P. E., & Ting, A. Y. (2021). Deciphering molecular interactions by proximity labeling. *Nat Methods*, 18(2), 133-143. doi: 10.1038/s41592-020-01010-5
- Renuse, S., Madugundu, A. K., Jung, J. H., Byeon, S. K., Goldschmidt, H. L., Tahir, R., . . . Pandey, A. (2020). Signature Fragment Ions of Biotinylated Peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 31(2), 394-404. doi: 10.1021/jasms.9b00024
- Rhee, H. W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2013). Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science*, 339(6125), 1328-1331. doi: 10.1126/science.1230593
- Roux, K. J., Kim, D. I., & Burke, B. (2013). BioID: a screen for protein-protein interactions. *Curr Protoc Protein Sci*, 74, Unit 19 23. doi: 10.1002/0471140864.ps1923s74
- Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., & Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*, 196(6), 801-810. doi: 10.1083/jcb.201112098
- Samavarchi-Tehrani, P., Samson, R., & Gingras, A. C. (2020). Proximity Dependent Biotinylation: Key Enzymes and Adaptation to Proteomics Approaches. *Mol Cell Proteomics*, 19(5), 757-773. doi: 10.1074/mcp.R120.001941
- Santin, Y. G., Doan, T., Lebrun, R., Espinosa, L., Journet, L., & Cascales, E. (2018). In vivo TssA proximity labelling during type VI secretion biogenesis reveals TagA as a protein that stops and holds the sheath. *Nat Microbiol*, 3(11), 1304-1313. doi: 10.1038/s41564-018-0234-3
- Schubert, K., Sieger, B., Meyer, F., Giacomelli, G., Bohm, K., Rieblinger, A., . . . Bramkamp, M. (2017). The Antituberculosis Drug Ethambutol Selectively Blocks Apical Growth in CMN Group Bacteria. *MBio*, 8(1). doi: 10.1128/mBio.02213-16
- Schultz, C., Niebisch, A., Schwaiger, A., Viets, U., Metzger, S., Bramkamp, M., & Bott, M. (2009). Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of *Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases. *Mol Microbiol*, 74(3), 724-741. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06897.x
- Sogues, A., Martinez, M., Gaday, Q., Ben Assaya, M., Grana, M., Voegelé, A., . . . Alzari, P. M. (2020). Essential dynamic

interdependence of FtsZ and SepF for Z-ring and septum formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun*, 11(1), 1641. doi: 10.1038/s41467-020-15490-8

Sureka, K., Hossain, T., Mukherjee, P., Chatterjee, P., Datta, P., Kundu, M., & Basu, J. (2010). Novel role of phosphorylation-dependent interaction between FtsZ and FipA in mycobacterial cell division. *PLoS One*, 5(1), e8590. doi: 10.1371/journal.pone.0008590

Szwedziak, P., & Lowe, J. (2013). Do the divisome and elongasome share a common evolutionary past? *Curr Opin Microbiol*, 16(6), 745-751. doi: 10.1016/j.mib.2013.09.003

Thakur, M., & Chakraborti, P. K. (2006). GTPase activity of mycobacterial FtsZ is impaired due to its transphosphorylation by the eukaryotic-type Ser/Thr kinase, PknA. *J Biol Chem*, 281(52), 40107-40113. doi: 10.1074/jbc.M607216200

Udeshi, N. D., Pedram, K., Svinkina, T., Fereshetian, S., Myers, S. A., Aygun, O., . . . Carr, S. A. (2017). Antibodies to biotin enable large-scale detection of biotinylation sites on proteins. *Nat Methods*, 14(12), 1167-1170. doi: 10.1038/nmeth.4465

Wehenkel, A., Bellinzoni, M., Grana, M., Duran, R., Villarino, A., Fernandez, P., . . . Alzari, P. M. (2008). Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*, 1784(1), 193-202. doi: 10.1016/j.bbapap.2007.08.006

## **Licenciamiento**

Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional. (CC BY-NC)