

UdelaR

PEDECIBA Biología

+

TESIS DE DOCTORADO

Caracterización bioquímica y
funcional de dos sustratos de la
Ser/Thr quinasa PknG de
Mycobacterium tuberculosis

Jessica Rossello

Institut Pasteur de Montevideo, marzo de 2025

Orientadores:
Dra. Rosario Durán
Dr. Leonel Malacrida
Dr. Pedro Alzari

Imagen de portada: *Mycobacterium smegmatis* mc (2) 155 marcadas con HADA y visualizadas con el LUT “fire” para resaltar las zonas de mayor intensidad de fluorescencia. Se pueden apreciar el crecimiento polar asimétrico.

NINGÚN MAR EN CALMA HIZO EXPERTO A UN MARINERO

F.D. ROOSEVELT

ÍNDICE

ABREVIACIONES	4
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
• TUBERCULOSIS: CONTEXTO HISTÓRICO	9
• EL CICLO INFECTIVO de <i>M. tuberculosis</i>	11
• ENFERMEDAD y TRATAMIENTO	13
• CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS de <i>M. tuberculosis</i>	16
• LA ENVOLTURA CELULAR MICOBACTERIAL	17
• CRECIMIENTO Y DIVISIÓN CELULAR	24
• Ser/Thr QUINASAS DE PROTEÍNAS EN <i>M. tuberculosis</i>	31
• PknG	32
• GlnA1	40
• FhaA	43
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
• Capítulo 1. GlnA1	68
○ Producción de GlnA1 y PknG recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	
○ Evaluación de GlnA1 como sustrato de PknG: Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	
○ Generación de los mutantes fosfomimético y fosfoablato de la Serina 57 de GlnA1	
○ <i>Efecto de la fosforilación de GlnA1 sobre la actividad enzimática</i>	
○ <i>Fosforilación de GlnA1 in vivo</i>	
○ <i>Fosforilación de GlnA1 in vivo en condiciones de privación de nitrógeno</i>	
• Capítulo 2: FhaA	96
○ Las proteínas recuperadas en el interactoma FhaA están relacionadas con la división y elongación celular, así como la biogénesis de la envoltura celular	
○ La sobreexpresión de FhaA altera la composición/estructura de la envoltura celular	
○ Efecto de la sobreexpresión de FhaA sobre la composición de lípidos	
○ La sobreexpresión de FhaA afecta la morfología celular	
○ La sobreexpresión de FhaA genera deslocalización de la biosíntesis de peptidoglicano.	
○ FhaA es necesaria para la elongación polar y para el crecimiento asimétrico	
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	126
BIBLIOGRAFÍA	130
AGRADECIMIENTOS	142

ABREVIACIONES

ACN	Acetonitrilo
AcPIM	Fosfatidil-inositol-manósidos
AG	Arabinogalactano
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Ara	Arabinosa
BCG	Bacilo Calmette Guerin
BrEt	Bromuro de etidio
CL	Cardiolipina
D-Ala	D-alanina
DIGE	<i>Differential in gel electrophoresis</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DO	Densidad óptica
DTT	Dithiothreitol
FAME	<i>Fatty acids methyl ester</i>
FAS	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FHA	<i>Forkhead associated</i>
FLIM	<i>Fluorescence Lifetime Imaging</i>
Gal	Galactosa
GalN	N-acetil-galactosamina
GlcNAc	N-acetilglucosamina
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>

HTM	Helice transmembrana
IAA	Iodoacetamida
IMAC	<i>Immobilized metal-ion affinity chromatography</i>
ko	<i>Knockout</i>
LAM	Lipoarabinomanano
LB	Luria Bertani
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LM	Lipomanano
LUT	<i>Look up table</i>
MALDI	<i>Matrix assisted Laser desorption ionization</i>
MAME	<i>Mycolic acid methyl ester</i>
mDAP	Ácido diaminopimélico
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MurNAc	Ácido N-acetilmurámico
MurNGlyc	Ácido N-glicomurámico
MWCO	<i>Molecular weight cutt off</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	<i>Overnight</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBP	<i>Penicilin Binding Protein</i>
PE	Fosfatidil etanolamina

PG	Peptidoglicano
PI	Fosfatidil inositol
pI	Punto isoelectrico
Pi	Fosfato inorganico
PL	Fosfolipidos
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
TDM	Trehalosa di micolato
TE	Tomografia electronica
TLC	<i>Thin Layer chromatography</i>
TMM	Trehalosa mono micolato
TOF	<i>Time of flight</i>
TPR	Tetratricopeptide
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WT	<i>Wild type</i>

RESUMEN

Mycobacterium tuberculosis, el agente causante de la tuberculosis, representa un grave problema de salud pública, constituyendo la primera causa de muerte por un agente infeccioso a nivel mundial. Se estima que alrededor de un tercio de la población es portador sano de la enfermedad. En nuestro país la incidencia de la enfermedad ha aumentado durante los últimos años.

El genoma de *M. tuberculosis* codifica 11 Ser/Thr quinasas de tipo eucariota denominadas Pkns. Una de ellas, PknG, cumple un rol tanto en el metabolismo de la bacteria como en la patogénesis, y ha cobrado gran relevancia como una de las moléculas centrales para la sobrevivencia de la bacteria dentro del ambiente hostil del hospedero. Con el fin de descubrir nuevas rutas de señalización reguladas por PknG, nuestro grupo de trabajo desarrolló una estrategia basada en cromatografía de afinidad acoplada a espectrometría de masa que nos permitió identificar interactores y sustratos *in vitro* de esta quinasa. Entre las proteínas identificadas, se encuentran los sujetos de estudio del presente trabajo, GlnA1 y FhaA.

En este trabajo, nos propusimos profundizar en el rol biológico de ambas proteínas. La primera de ellas GlnA1, es una enzima muy estudiada, que posee un rol central en la asimilación de nitrógeno. Mediante ensayos de fosforilación *in vitro* determinamos que GlnA1 es fosforilada por PknG en la Serina 57 y que este residuo es importante para el desarrollo de la actividad enzimática. También revisamos el estado de fosforilación endógena de GlnA1 en extractos totales, así como en proteína recombinante purificada a partir de bacterias crecidas en condiciones de distinta biodisponibilidad de nitrógeno. FhaA, por otra parte, es una proteína poco estudiada, para la cual se ha propuesto un rol en la síntesis de peptidoglicano. Mediante análisis proteómicos logramos conocer el entorno molecular en el cual se encuentra enmarcada esta proteína. Utilizando distintas técnicas de microscopía confocal, microscopía electrónica y análisis de imágenes, logramos demostrar que FhaA cumple un papel central en la correcta localización de la maquinaria responsable de la elongación celular, así como en el crecimiento asimétrico desde los polos y por tanto en la diversificación poblacional, procesos de gran relevancia biológica pero muy poco caracterizados al día de hoy.

A partir de esta tesis surge la posible regulación de GlnA1 por fosforilación, un aspecto que hasta el momento había pasado inadvertido. Por otra parte, nuestros resultados nos permiten postular a FhaA como un integrante del elongasoma, con un rol central en el crecimiento polar asimétrico.

INTRODUCCIÓN

TUBERCULOSIS: CONTEXTO HISTÓRICO

Tisis, peste blanca, consunción y mal del Rey, son sólo algunos de los nombres con los que se ha dado en llamar a la enfermedad que hoy conocemos como tuberculosis. Si bien el agente etiológico causante de esta enfermedad, la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, fue descubierto y aislado por primera vez en 1882 por el médico Robert Koch, (descubrimiento que le valió el premio nobel de fisiología y medicina en 1905), la tuberculosis representa una de las enfermedades más antiguas que ha compartido existencia con la humanidad. Aunque existe un gran debate respecto a su origen, estudios evolutivos establecen que el ancestro común más lejano de *M. tuberculosis* habría tenido su origen hace 3 millones de años, habiendo coexistido con los primeros homínidos (Gutierrez et al. 2005). Por otra parte, las cepas modernas provendrían de la divergencia a partir de un ancestro común ocurrida entre hace 15.000 y 20.000 años (Sreevatsan et al. 1997).

Las evidencias más antiguas de padecimiento de esta enfermedad fueron encontradas en momias egipcias y andinas datadas del periodo neolítico (10.000 - 1000 a.C.) y consisten en anomalías óseas y musculares características de la tuberculosis extrapulmonar, como cifosis torácica, colapso de los cuerpos vertebrales, lesiones a nivel del periostio, osteomielitis y abscesos musculares (Sotomayor, Burgos, and Arango 2004) (Figura 1).

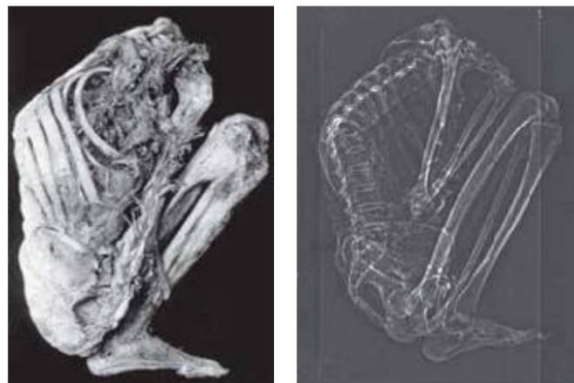


Figura 1: Izquierda: Fotografía de la momia de Guane, Museo Arqueológico de la Casa del Marqués de San Jorge, Bogotá, Colombia. Derecha: radiografía digital mostrando las lesiones características de tuberculosis ósea en las vértebras T0 a T11. En ambas imágenes se puede observar la cifosis torácica baja (Figura tomada de Sotomayor, Burgos, and Arango 2004).

La etiología de estas lesiones fue posteriormente confirmada mediante el uso de técnicas de biología molecular (Daniel 2006; Konomi et al. 2002; Salo et al. 1994; Sotomayor et al. 2004; Zimmerman 1979; Zink et al. 2023). En comparación con otras bacterias, el ADN micobacterial se caracteriza por ser particularmente resistente a la degradación, debido a su alto contenido de G-C y su resistente pared celular rica en lípidos que actúa como barrera de protección (Palomino, JC, Leao S, Ritacco V 2007)

Por su parte, las civilizaciones China e India describen la enfermedad en textos de hace 2300 y 3300 años respectivamente. Hipócrates realizó la primera documentación formal de lo que los griegos llamaban *Phthisis*, describiéndola como una enfermedad crónica que atacaba principalmente a adultos jóvenes, caracterizada por tos frecuente y persistente, expectoración abundante, sudoración y fiebre constantes (Hipócrates, 400 A.C.) (Daniel 2006). También existen registros bíblicos que hacen referencia a esta enfermedad con la palabra hebrea *schachepheth*. Si bien los registros de la edad media son escasos, existen múltiples evidencias arqueológicas que avalan la existencia de la enfermedad. En este periodo no se hicieron grandes avances, por considerársela una enfermedad generalizada y de difícil tratamiento e incluso un padecimiento hereditario (Daniel 2006). No es sino hasta 1821, con el invento del estetoscopio que se asocia por primera vez la enfermedad a los síntomas pulmonares característicos, metodología que se encuentran vigente hasta la actualidad.

A pesar de ser una enfermedad muy antigua, la tuberculosis no sólo no ha podido ser erradicada, sino que actualmente la infección por *M. tuberculosis* representa la primer causa de muerte por un agente infeccioso a nivel mundial, siendo responsable de 1.25 millones de muertes y 10.8 millones de nuevos infectados en 2023 según datos de la Organización Mundial de la salud (OMS, www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis). Se estima que alrededor de un tercio de la población es portador sano de la enfermedad. En nuestro país, se registraron unos 1200 nuevos casos en 2023, y la incidencia de la enfermedad ha aumentado en los últimos años (<http://www.chlaep.org.uy>).

EL CICLO INFECTIVO de *M. tuberculosis*

En comparación con otras enfermedades infecciosas, existen algunos aspectos que hacen de *M. tuberculosis* un patógeno destacable. A diferencia de lo que ocurre con otras bacterias en las que la infección en el humano es accidental y no tiene implicancias para su supervivencia, *M. tuberculosis* se considera un patógeno estricto, ya que no puede replicarse ni sobrevivir largos períodos de tiempo en la naturaleza, si no es en el contexto de la infección (Mishra and Surolia 2018). Por otra parte, carece de los factores de virulencia típicamente asociados a patógenos, como exotoxinas, pili, flagelo y otras adhesinas. Su estrategia infectiva consiste alcanzar las vías respiratorias y una vez allí, evadir el sistema inmune, utilizando a los macrófagos del hospedero como vectores para esconderse y transportarse hasta su tejido diana (Cambier, Falkow, and Ramakrishnan 2014).

La infección por tuberculosis comienza cuando el individuo inhala los aerosoles cargados con bacilos, emitidos por un portador al hablar, estornudar o simplemente respirar. Para poder iniciar el proceso infectivo, estos bacilos deben alcanzar las porciones más bajas de los pulmones, donde se encuentran los alveolos. En la mayoría de los individuos esto no ocurre y la enfermedad no progresa, y en aquellos que sí, la infección inicial suele producir un granuloma compacto, que autolimita la infección y actúa como contención contra la diseminación de la bacteria. La infección puede mantenerse latente durante décadas, o incluso nunca manifestarse enfermedad (Mishra and Surolia 2018). Esta modalidad infectiva es posible únicamente gracias a que *M. tuberculosis* conoce perfectamente al humano: coexiste con él desde hace más tiempo que cualquier otra enfermedad, han co-evolucionado juntos (Brites and Gagneux 2015; Gagneux 2012). Por este motivo se la considera el paradigma de microorganismo adaptado a su hospedero.

En primera instancia, los macrófagos y las células dendríticas son los tipos celulares en resultar invadidos por *M. tuberculosis*, ya que contienen los receptores celulares necesarios para su fagocitosis. Una vez fagocitadas, las bacterias pueden ser destruidas por los macrófagos, o no. Esto depende de la capacidad microbicida de los mismos y de los factores de virulencia portados por las bacterias que fueron engullidas. Si no logran ser destruidas,

las micobacterias inducen el arresto de la fusión fagolisosomal, inhibiendo así la acidificación del compartimiento en el que se encuentran, y por tanto evitando su degradación. Esto les proporciona un ambiente propicio donde pueden proliferar, haciendo usufructo los nutrientes del hospedero.

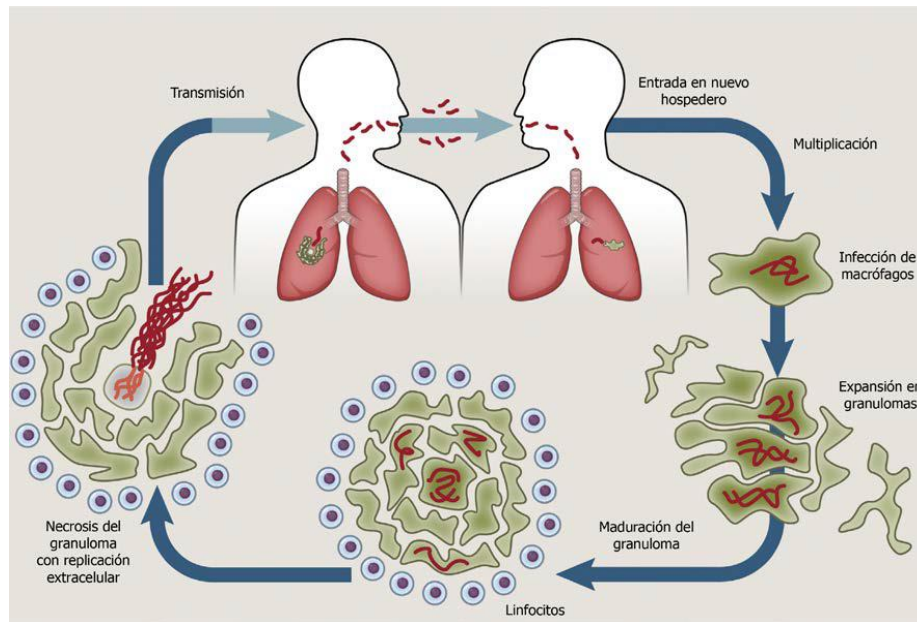


Figura 2: Ciclo infeccioso de *M. tuberculosis* en el humano. Figura tomada de Cambier *et al*, 2014

En respuesta a la inhibición de la fusión fagolisosomal, el macrófago infectado contraataca desencadenando una respuesta inflamatoria que atrae linfocitos y monocitos al sitio de la infección. Este reclutamiento masivo de células del sistema inmune da lugar a la formación del granuloma: Los monocitos atraídos al sitio de infección se diferencian a macrófagos y fagocitan más bacterias, sin embargo no son activados para eliminarlas sino hasta varias semanas después. Mientras tanto, los bacilos (y el granuloma) crecen exponencialmente. Semanas después, la activación de los macrófagos infectados genera la necrosis del granuloma, y en este punto, la infección se vuelve latente: la disponibilidad de oxígeno y otros nutrientes es limitada y la bacteria entra en dormancia (Figura 2). (Cambier *et al*. 2014; van Crevel, Ottenhoff, and van der Meer 2002).

La reactivación de la enfermedad ocurre cuando la bacteria encuentra condiciones favorables para escapar de la vigilancia del sistema inmune, entiéndase, debilitamiento de las defensas del hospedero. Mientras tanto, la enfermedad puede diseminarse a otros tejidos por vía hematógica. En todos los pasos antes mencionados ocurre un balance entre muerte y proliferación bacilar, y del resultado de estas batallas depende establecimiento o la eliminación del proceso infeccioso.

ENFERMEDAD y TRATAMIENTO

La gran mayoría de los infectados por tuberculosis cursan la enfermedad asintomáticamente. En esta etapa la bacteria se encuentra en estado inactivo y el individuo portador no es transmisor de la enfermedad (tuberculosis latente). La proporción de individuos que cursan la infección activa, es decir, que manifiestan enfermedad y pueden transmitirla, es muy baja. Los síntomas pueden aparecer semanas, o incluso años después de la colonización bacteriana.

Si bien la forma pulmonar es la más común, además de los pulmones los bacilos pueden colonizar otros tejidos, como los riñones, el cerebro, la columna vertebral y la piel. La sintomatología inicial puede ser muy leve o confundirse con otros padecimientos, lo cual facilita la diseminación de la enfermedad. Los síntomas más frecuentes asociados a la enfermedad pulmonar son tos de varias semanas que puede estar acompañada con moco o sangre, dolor en el pecho, fatiga, disminución de peso, fiebre, escalofríos, sudoraciones nocturnas y pérdida del apetito (www.who.int/es).

Desde que existen registros de la enfermedad, el ser humano ha ensayado formas de combatirla sin éxito, en buena parte a causa de la arbitrariedad de los procedimientos aplicados. El médico griego Galeno (129 D.C), sugirió que los pacientes podían beneficiarse del uso de catárticos y una dieta a base de pan y vino mezclado con agua, así como de la ingesta de abundante leche. Los ambientes secos y ventilados, la altura y el reposo también fueron sugeridos como beneficiosos por diversas civilizaciones a lo largo del tiempo, siendo

éste el principal tratamiento proporcionado por los sanatorios para tuberculosos durante el siglo XX (Figura 3) (Daniel 2006; Palomino, JC, Leao S, Ritacco V 2007; Tovar 2014).



Figura 3: Mujeres hospitalizadas en el sanatorio antituberculoso de San Rafael, (Segovia, España, 1943). Los sanatorios para tuberculosos fueron específicamente diseñados por arquitectos de la época considerando lo que en ese momento se creía indispensable para la curación de la enfermedad: Los enfermos se mantenían en reposeras instaladas en jardines, balcones o corredores con gran aireación y alta exposición a la luz solar. Imagen tomada de Tovar, 2014.

En la Europa de la edad media se creía que el toque de las escrófulas (inflamación de los ganglios cervicales por infección con tuberculosis extrapulmonar) por parte de un Rey, tenía la capacidad de sanar al enfermo, práctica que se mantuvo por varios siglos (Daniel 2006). A comienzos del siglo XX se ensayaron varios compuestos para el tratamiento de la enfermedad que, si bien eran efectivos *in vitro*, resultaban tóxicos al aplicarse *in vivo*. Entre éstos figuran las sales de arsénico, oro, cobre y colorantes. Más tarde se evaluaron varias sulfonas y sulfonamidas así como la penicilina, sin éxito. No fue sino hasta el año 1944, en medio de la Segunda Guerra Mundial, cuando Schatz y Waksman aislaron el primer antibiótico exitoso para tratar la infección, a partir del microorganismo *Streptomyces griseus*: La estreptomina (Schatz, Bugle, and Waksman 1944). Sin embargo, rápidamente se discontinuó su uso ya que se observó que este antibiótico era capaz de seleccionar cepas resistentes. El primer antibiótico que puede considerarse eficiente en el tratamiento de la

enfermedad y que dio origen a una nueva generación de antibióticos fue la isoniazida, en el año 1952, siendo hasta hoy en día el fármaco de cabecera en el tratamiento de la tuberculosis. A este se le suma la rifampicina en 1957 (Palomino, JC, Leao S, Ritacco V 2007). Hoy en día el tratamiento de la tuberculosis se basa en un esquema combinado de antibióticos y tiene una duración de entre 4 y 6 meses. Los antibióticos más comúnmente utilizados para el tratamiento, denominados fármacos de primera línea, son la isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol. Sin embargo, las reiteradas interrupciones prematuras del tratamiento, la prescripción incorrecta de los antibióticos o la mala calidad de los mismos han traído como consecuencia la aparición de cepas multirresistentes. El diagnóstico de multiresistencia requiere confirmación bacteriológica y pruebas de resistencia y el tratamiento se realiza con fármacos de segunda línea, pero los mismos son más tóxicos y costosos. El mismo consiste en una combinación de drogas (bedaquilina, pretomanid, linezolid, y moxifloxacina) (www.who.int/es).

También existen cepas que adquieren resistencia a estas drogas y se denominan extremadamente resistentes. Las opciones terapéuticas frente a este tipo de infección son escasas o nulas (www.who.int/es)

Entre los años 1908 y 1919, Albert Calmette y Camille Guérin lograron generar una cepa de *M. tuberculosis* atenuada, mediante la realización de múltiples pasajes sucesivos (230 pasajes). Luego de evaluarla en conejos, vacas, caballos y cobayos con éxito, fue aplicada por primera vez en humanos en 1921. El sujeto de estudio fue un bebé huérfano que se encontraba al cuidado de su abuela tísica, luego del fallecimiento de su madre por tuberculosis. Esta cepa se utiliza exitosamente hasta hoy en día para la vacunación en niños y los protege de las formas graves de la enfermedad (Daniel 2006; Palomino, JC, Leao S, Ritacco V 2007).

El uso de drogas antituberculosas en conjunción con la vacuna BCG, (así como el desarrollo de métodos diagnósticos como la prueba de la tuberculina y la radiografía de rayos X), permitieron reducir drásticamente la mortalidad por tuberculosis a lo largo de siglo XX. Sin embargo, a fines de la década de los 80 y principios de los 90 la enfermedad volvió a cobrar

relevancia dentro de la comunidad científica, debido a su resurgimiento como consecuencia de la aparición de cepas multirresistentes y enfermedades como el VIH (Daniel 2006). Desde entonces la Organización mundial de la salud introdujo varios planes estratégicos que tienen como objetivo impulsar la investigación, contribuir al fortalecimiento de los sistemas de salud, desarrollar de fármacos contra cepas resistentes y promover la educación en la población. Cabe destacar que los sectores más afectados por la enfermedad son los grupos socioeconómicos más desprovistos.

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS de *M. tuberculosis*

En términos microbiológicos, *M. tuberculosis* es un bacilo de crecimiento lento (ciclo de duplicación, 20h) que pertenece a al orden *Mycobacteriales*, al igual que el organismo altamente emparentado *Mycobacterium smegmatis* que se utiliza como modelo no patogénico de laboratorio. Ambos bacilos comparten la complejidad de su pared celular, rica en ácidos grasos de cadena larga, que les otorga una barrera altamente impermeable y que en el caso de *M. tuberculosis* juega además un papel central en la virulencia y supervivencia. Debido a esta alta impermeabilidad es que la tinción de Gram no es capaz de atravesar la envoltura celular, y por tanto no se tiñen como Gram positivas ni Gram negativas. Para su identificación al microscopio se utiliza la tinción ácida de Ziehl Neelsen. El genoma de *M. tuberculosis* contiene unos 4.000 genes, de los cuales la gran mayoría codifica enzimas involucradas en la lipólisis y lipogénesis, procesos que necesita para sobrevivir dentro de su hospedero y para sintetizar su compleja envoltura celular, respectivamente (Cole et al. 1998). Esto es resultado de una simplificación genómica como consecuencia de su adaptación a la vida intracelular, sin embargo, no significa que la bacteria sea más simple en cuanto a sus capacidades biológicas. De hecho, codifica para la mayoría de las vías anabólicas y catabólicas presentes en bacterias, así como para la síntesis de los 20 aminoácidos, y mantiene los genes necesarios para infectar y persistir en el huésped, así como para evadir el sistema inmunológico y resistir la terapia antibiótica (Mishra and Surolia 2018).

Las micobacterias poseen una envoltura celular de composición compleja y distintiva, que las provee de una barrera impermeable a la mayoría de los compuestos, (incluidos algunos antibióticos como los macrólidos) (Palomino and Martin 2014). En consonancia, la maquinaria molecular que lleva a cabo su biosíntesis durante el crecimiento y división celular presenta características únicas. Además, mientras que los bacilos modelo crecen por incorporación de envoltura celular a lo largo de la bacteria, las micobacterias se caracterizan por su crecimiento polar y asimétrico, que da lugar a una población heterogénea en términos de susceptibilidad antibióticos y tamaño celular (Aldridge et al. 2012). En este mismo sentido, la maquinaria de síntesis de envoltura celular, uno de los principales blancos moleculares de los antibióticos, presenta diferencias importantes con la de los bacilos más estudiados.

LA ENVOLTURA CELULAR MICOBACTERIAL

Durante el proceso de crecimiento división celular, las micobacterias deben sintetizar las varias capas de su compleja y distintiva envoltura celular. La misma está compuesta por una membrana interna recubierta por una pared celular de peptidoglicano, que se encuentra covalentemente unido a un tipo de polisacáridos ramificados llamados arabinogalactanos, que a su vez se encuentran esterificados en el extremo distal de sus cadenas laterales por ácidos micólicos (Bansal-Mutalik and Nikaido 2014; Brennan and Nikaido 1995) (Figura 4). Esta composición particular de la envoltura juega un rol central en el éxito de *M. tuberculosis* como patógeno, ya que genera una barrera altamente impermeable a antibióticos y otros compuestos, les confiere resistencia frente a condiciones adversas y, posee un rol fundamental en la modulación de la respuesta del sistema inmune del hospedero y la virulencia (Brennan 2003; Jarlier and Nikaido 1994).

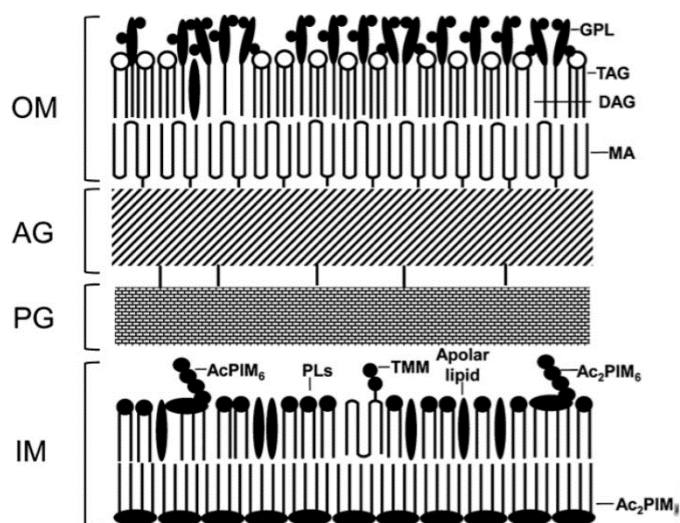


Figura 4. Composición de la envoltura celular en micobacterias. IM: Membrana interna; PG: Peptidoglicano; AG: Arabinogalactano; OM: Membrana externa compuesta de ácidos micólicos. Tomado de Bansal-Mutalik and Nikaido, 2014

Membrana interna

En lo que respecta a la membrana interna, la misma posee características biológicas, bioquímicas y fisicoquímicas comparables a las de las membranas celulares presentes en otros microorganismos. Se encuentra compuesta principalmente de fosfolípidos formando una bicapa lipídica que contiene proteínas embebidas en su estructura, las cuales participan en el transporte activo de aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos, así como en vías de señalización y secreción (Brennan and Nikaido 1995) (Figura 4). Los fosfolípidos (PL) que conforman la bicapa lipídica están representados principalmente por diacil-fosfatidil-inositol-dimanósidos (Ac_2PIM_2), que representan un 42% del peso seco, así como de otras formas aciladas de fosfatidil-inositol-manósidos (AcPIM_2 , AcPIM_4 , Ac_2PIM_4 , AcPIM_6 , Ac_2PIM_6) que representan cerca de un 3% del peso seco. En proporciones menores se encuentran la cardiolipina (CL), el fosfatidil-inositol (PI), la fosfatidil-etanolamina (PE), Trehalosa mono micolatos (TMM) y una baja cantidad de lípidos altamente apolares de identidad desconocida (Bansal-Mutalik and Nikaido 2014).

Peptidoglicano

Como mencionamos anteriormente, la membrana interna está recubierta por una pared celular. El peptidoglicano además de proporcionar resistencia el estrés osmótico es responsable de la forma celular (Figura 5).

El peptidoglicano se encuentra formado por cadenas de glicanos, típicamente, N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc). En el caso particular de las micobacterias, el peptidoglicano contiene además ácido N-glicomurámico (MurNGlyc), responsable de la mayor rigidez y resistencia a la degradación enzimática del peptidoglicano micobacteriano (Brennan and Nikaido 1995)

Estas cadenas de glicanos se encuentran unidas a través del ácido del MurNAc a pentapéptidos de secuencia L-Ala/D-iso-Glu/mDAP/D-Ala/D-Ala. Dichos péptidos a su vez, se entrecruzan por los residuos de mDAP (3-3), o el residuo de mDAP y la D-alanina (3-4), formando un entramado molecular altamente estable y resistente característico de las micobacterias (Figura 5). El entrecruzamiento de tipo 3-3 no sólo es exclusivo de micobacterias, sino que, además, su proporción aumenta cuando la bacteria entra en dormancia (Brennan and Nikaido 1995; Jankute et al. 2015).

La síntesis *de novo* de peptidoglicano comienza en el citosol, donde se generan las subunidades monoméricas del peptidoglicano en formación, conocidas como lípido II. La síntesis de las subunidades es llevada a cabo mediante la acción sucesiva de las enzimas MurA-G (Jankute et al. 2015). Posteriormente, el lípido II es traslocado al espacio periplásmico. En este proceso la flipasa Mvin juega un rol central. Mvin es una proteína de membrana que posee un dominio pseudoquinasa, y participa en la traslocación de precursores a través de la membrana en forma dependiente de su estado de fosforilación (Gee et al. 2012).

La remodelación (síntesis y degradación) del peptidoglicano, ocurre en los polos y septos y requiere una fina coordinación entre la síntesis y degradación del mismo, así como de la correcta localización de la maquinaria molecular que lo sintetiza. Mientras que la síntesis es orquestada por las Penicilin-binding-proteins (PBPs), la degradación se encuentra a cargo de hidrolasas de identidad desconocida. Mientras que las PBPs generan el

entrecruzamiento clásico del peptidoglicano (3-4), las transpeptidasas atípicas LdtA y LdtB son las encargadas de generar el entrecruzamiento atípico (3-3). La acción coordinada de todas estas enzimas, da lugar a la formación del entramado molecular característico de las micobacterias (Figura 5) (Kieser and Rubin 2014)

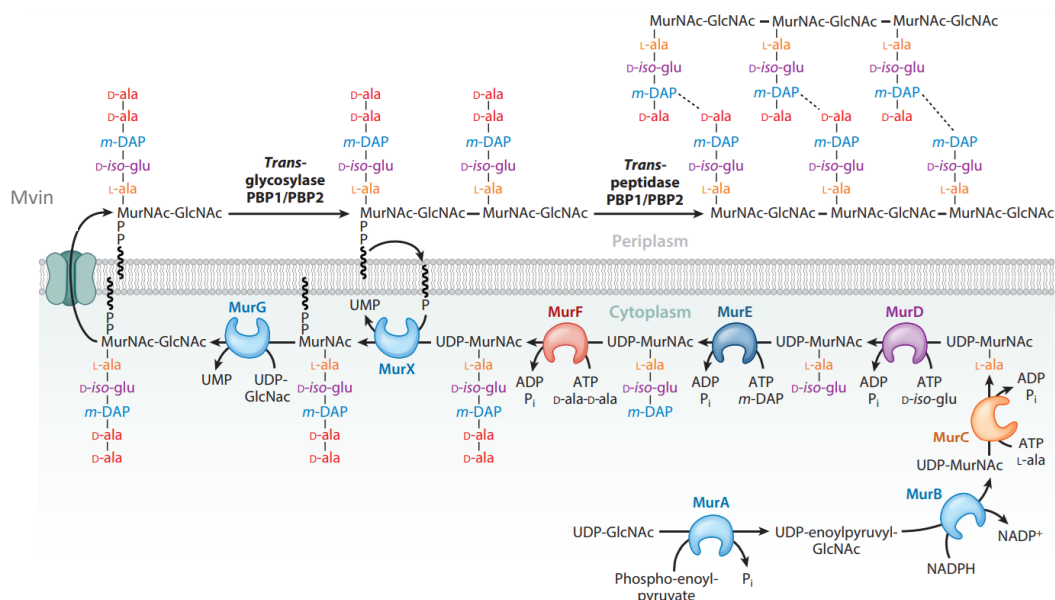


Figura 5: Esquema de la Síntesis de peptidoglicano donde se observa la estructura de los precursores y se indican las enzimas que participan en cada paso de la catálisis. Adaptado de Jankute *et al*, 2015.

Arabinogalactanos

Los arabinogalactanos representan la capa intermedia de la envoltura celular, que se encuentra entre el peptidoglicano y los ácidos micólicos. Están constituidos por una cadena lineal principal denominada dominio galactano, compuesta por hasta 30 residuos de Galatosa (Gal) cuya síntesis es llevada a cabo por las galactofuranosil transferasas Glf, GlfT1 y GlfT2. Esta cadena es la que se encuentra covalentemente unida al ácido glicomurámico (MurNGlyc) del peptidoglicano y puede encontrarse en forma lineal, o modificada por

grandes polímeros de arabinosa (Ara) de hasta 30 residuos, denominados dominio arabinano.

Los dominios arabinano son sintetizados por la acción conjunta de las enzimas DprE1-2 y las arabinofuranosil transferasas AftA-B y EmbA-B y pueden poseer ramificaciones terminales que se encuentran esterificadas con ácidos micólicos (Figura 6). Esta diversidad en las enzimas responsables de síntesis de las cadenas de arabinosa es en parte responsable de la diversidad estructural de los arabinogalactanos (Jankute et al. 2015). A su vez, los dominios arabinano pueden encontrarse modificados por la adición de grupos succinilo o residuos de

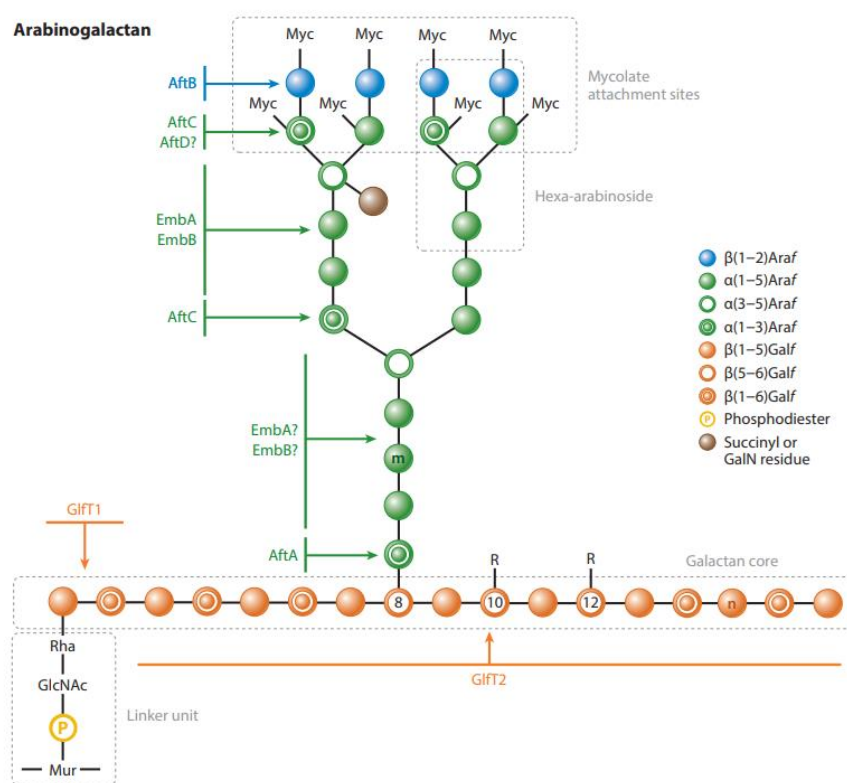


Figura 6: Estructura del arabinogalactano, donde se indican las enzimas involucradas en los distintos pasos de la síntesis. Tomado de Jankute *et al*, 2015.

galactosamina atípicos, que no se encuentran N acetilados (GalN). Interesantemente esta variante GalN sólo se encuentra en micobacterias patógenas (Jankute et al. 2015; Kieser and Rubin 2014).

Ácidos micólicos

La última capa de la envoltura celular corresponde a la membrana externa o micomembrana, compuesta principalmente por ácidos micólicos. Los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga, constituidos por una cadena principal de entre 42 y 62 carbonos, denominada ácido meromicólico, una cadena más corta de entre 22 y 26 carbonos en posición α y un grupo hidroxilo en posición β respecto al grupo carbonilo (Figura 7). Mientras que la cadena de meromicolato usualmente contienen 2 posiciones que pueden encontrarse ocupadas por dobles enlaces, anillos de ciclopropano u otros grupos funcionales, las cadenas α alquil siempre se encuentran saturadas (Jankute et al. 2015; Liu et al. 1996). En *M. tuberculosis* existen 3 tipos de ácidos micólicos que se clasifican en función del número de insaturaciones y presencia de grupos funcionales con oxígeno en la cadena meromicolato: α -micolatos, metoxi-micolatos y ceto-micolatos (Figura 7).

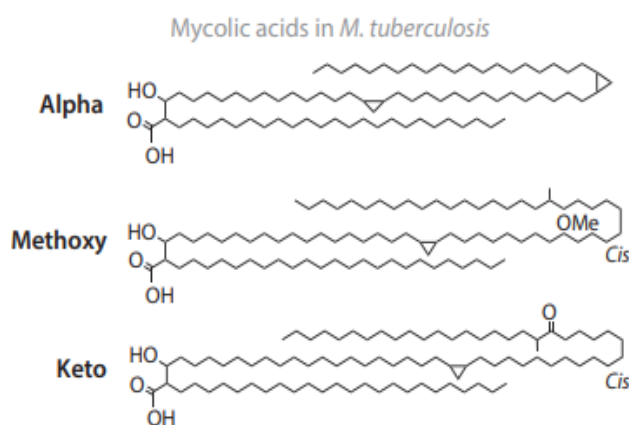


Figura 7: Estructura general de los principales tipos de ácidos micólicos presentes en *M. tuberculosis*. Tomado de Jankute et al 2015

La biosíntesis de los ácidos micólicos requiere de dos complejos enzimáticos denominados FASI y FASII (FAS, Fatty Acid Synthase). FAS I sintetiza *de novo* ácidos grasos saturados de cadena corta, de C_{16-18} o de C_{22-26} . Estos pueden utilizarse para formar la cadena α -alquilo (C_{22-26}), o bien actuar como un sustrato (C_{16-18}) para la síntesis de ácidos meromicólicos (hasta C_{42-62}) por el complejo FAS-II. La conexión de los ciclos de FAS-I y FAS-II está dada por

la enzima FabH, que cataliza la condensación del acil-CoA proveniente de FAS-I con malonil-ACP, para dar un intermediario β -cetoacil ACP. Este β -cetoacil ACP es posteriormente reducido por MabA, deshidratado por las deshidratasas HadAB y HadBC y reducido por la reductasa InhA. Este ciclo da como resultado la elongación de la cadena en 2 carbonos, y es continuado por las enzimas KasAB que catalizan la condensación con unidades de malonil-ACP para continuar con la extensión. El ciclo de elongación llevado a cabo por FAS-II, continúa hasta alcanzarse una cadena de meromicolato de C₄₂₋₆₂ (Bhatt et al. 2007; Jankute et al. 2015).

Posteriormente, la cadena saturada de meromicolato sufre diversas reacciones que alterarán la fluidez y permeabilidad de la pared celular, como la adición de grupos funcionales ceto y metoxi, y ciclopropanos en *cis* y *trans*. Finalmente, la cadena de meromicolato es activada mediante la adición de un AMP por Fab32, para dar meromicolil-AMP, que es utilizado como sustrato para la fusión con la cadena α -alquil (C₂₂₋₂₄) proveniente de FAS-I, en una reacción catalizada por la enzima Pks13 (Figura 8). El β -cetoacil ácido graso generado es reducido por CmrA, para dar lugar al ácido micólico maduro que será transportado a través de la membrana por MmpL3 para luego ser transferido a un aceptor final como el arabinoglactano.

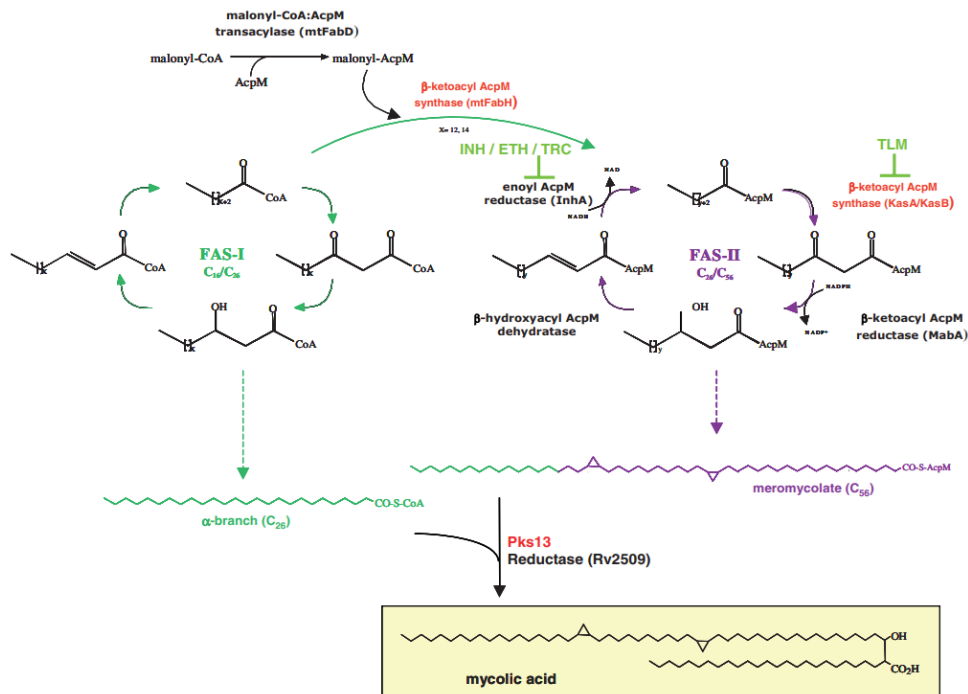


Figura 8: Esquema de la síntesis de ácidos micólicos donde se observa la estructura de los intermediarios y se indican las enzimas que participan en cada paso de la catálisis. Tomado de Bhatt *et al*, 2007.

CRECIMIENTO Y DIVISIÓN CELULAR

La proliferación de los bacilos puede dividirse en dos etapas: elongación de la célula madre y división en dos células hijas. En la primera etapa, se produce la síntesis de envoltura celular necesaria para la elongación. En los bacilos modelo más estudiados como *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, se han identificado múltiples componentes de la maquinaria celular que lleva a cabo este proceso, conocida con el nombre de elongasoma. En estas bacterias, el elongasoma se ensambla en torno a la proteína MreB, el homólogo bacteriano de la actina eucariota. MreB es una proteína asociada a membrana, que sirve como plataforma de andamiaje para la maquinaria de síntesis de peptidoglicano (Shih and Rothfield 2006). MreB forma complejos a lo largo de la célula que se trasladan de manera circunferencial, otorgando a la síntesis *de novo* de pared un patrón helicoidal (Domínguez-Escobar et al.

2011; Eraso and Margolin 2011; Garner et al. 2011). Las bacterias esféricas carecen de MreB y cepas de *B. subtilis* y *E. coli* deficientes en MreB presentan forma de coco. Por tanto, MreB es central para el crecimiento lateral y la morfología de los bacilos (Jones, Carballido-López, and Errington 2001; Shi et al. 2018).

En la segunda etapa, posteriormente a la duplicación del ADN, ocurre la formación del tabique o septo en el ecuador celular, donde ocurrirá la constricción que dará lugar a las dos nuevas hijas. A la maquinaria celular responsable de este proceso se la conoce con el nombre de divisoma y también ha sido ampliamente estudiada en los organismos modelo. El divisoma se ensambla en torno a FtsZ, una proteína GTPasa que forma un anillo en la cara citoplasmática (anillo Z) de la membrana interna, y marca el sitio donde ocurrirá la división celular (Silber et al. 2020). Esta estructura sirve de plataforma para el posterior reclutamiento de un repertorio de proteínas estructurales y accesorias de manera ordenada para formar la maquinaria funcional de la división celular. Las primeras proteínas reclutadas participan principalmente en la estabilización del anillo Z y el anclaje de FtsZ a la membrana, mientras que los componentes incorporados más tardíamente son proteínas de membrana involucradas en la síntesis del peptidoglicano septal y la degradación de la pared celular para la separación de las dos células hijas (Cameron and Margolin 2024; Silber et al. 2020; Vicente and Rico 2006). En los últimos años, muchos aspectos del ensamblaje del divisoma bacteriano se han caracterizado ampliamente en organismos modelo como *E. coli* y *B. subtilis*, incluida la identificación de muchos, si no todos, sus componentes estructurales. En micobacterias, tanto la composición de la envoltura como la maquinaria que lleva a cabo su síntesis, y el proceso de división celular en sí mismo, difieren de los organismos más estudiados. Mientras que los bacilos modelos como *E. coli* y *B. subtilis* crecen por incorporación de material de la pared a lo largo de todo el cuerpo celular, las micobacterias no sólo crecen desde los polos, sino que lo hacen en forma asimétrica, dando lugar a células hijas de distinto tamaño (Joyce et al. 2012; Kieser and Rubin 2014; Meniche et al. 2014). En esta modalidad de división, la síntesis de envoltura celular avanza más rápido en uno de los polos en comparación con el otro, siendo aquel que proviene de la madre (polo viejo) el que

hereda la mayor parte de la maquinaria de síntesis, y, por tanto, el de crecimiento rápido. Por su parte, el polo recientemente formado a partir de la constricción del septo en el ciclo celular precedente (polo nuevo) debe nuclear la maquinaria desde cero, y crece más lentamente (Aldridge et al. 2012; Joyce et al. 2012; Santi et al. 2013). A esto se suma el hecho de que algunas células han heredado sistemáticamente polos viejos, que fueron formados varios ciclos de replicación atrás, mientras otras portan polos formados en ciclos de duplicación mucho más recientes. Estas células con polos antiguos, conocidas como “aceleradoras”, no sólo poseen una tasa de crecimiento más rápido que aquellas que portan polos más jóvenes, sino que, además, generan células más largas. A estas células con polos juveniles se las conoce como “alternadoras” (Figura 9) (Aldridge et al. 2012; Santi et al. 2013).

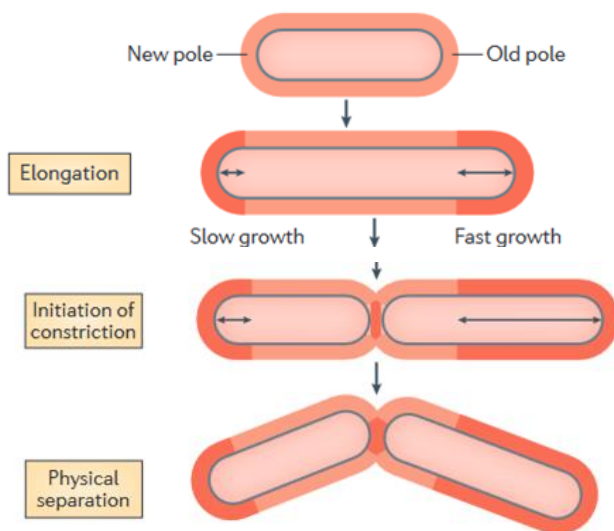


Figura 9: Elongación polar y división asimétrica, característica de micobacterias. A diferencia de lo que ocurre en la mayor parte de los bacilos, en los que el crecimiento se da a lo largo de toda la célula, la elongación de las micobacterias procede desde los polos y en forma asimétrica. Como resultado, la división celular da lugar a dos células hijas que poseen diferencias en largo, composición y susceptibilidad a antibióticos. Tomado de Kieser *et al*, 2014.

Este patrón de crecimiento asimétrico vinculado a la herencia de maquinaria molecular, contribuye a la heterogeneidad de la población en términos de tamaño celular, composición

de la envoltura y susceptibilidad a antibióticos: las células “aceleradoras” son más susceptibles a antibióticos que tienen como diana componentes de la maquinaria de síntesis de la envoltura celular, como cicloserina y meropenem (que interfieren con la síntesis de peptidoglicano) así como isoniazida (que tiene como blanco la síntesis de ácidos micólicos) (Aldridge et al. 2012). Esta estrategia de diversificación poblacional le confiere a la bacteria una ventaja evolutiva a la hora de lidiar con las condiciones hostiles y variables encontradas en el hospedero y también posee un rol potencial en la progresión de la enfermedad y la latencia.

El elongasoma de las micobacterias

El crecimiento desde los polos requiere una fina coordinación de entre la síntesis y degradación de peptidoglicano, así como de la correcta localización de la maquinaria molecular encargada de estos procesos. En consonancia con las diferencias en el patrón de crecimiento micobacterial respecto a *E. coli* y *B. subtilis*, las micobacterias carecen de homólogos de varios de componentes bien caracterizados del elongasoma de dichos organismos. Entre las proteínas ausentes en las micobacterias, se destaca MreB, el homólogo de actina responsable del ensamblaje de elongasoma de los bacilos modelo (Shih and Rothfield 2006). La proteína Wag31 ha sido reconocida como un andamiaje alternativo en estas bacterias que carecen de MreB (Figura 10). Wag31 se localiza principalmente en los polos de la célula y sirve como una plataforma para organizar el elongasoma y reclutar enzimas involucradas en la biogénesis de la envoltura celular (Jani et al. 2010; Kang et al. 2008; Meniche et al. 2014). Esta proteína también se localiza en el septo de las células en división, donde se sugiere que desempeña un papel en la formación del nuevo polo en las células hijas (Santi et al. 2013).

Se ha demostrado que bacterias con niveles reducidos de Wag31 presentan un fenotipo redondeado y problemas de crecimiento, mientras que la sobreexpresión de Wag31 genera células ramificadas (Kang et al. 2008; Nguyen et al. 2007), sustentando su rol en la elongación celular. Aunque se ha caracterizado la interacción de Wag31 con diversas proteínas (Ginda et al. 2013; Plocinski et al. 2012; Sieger and Bramkamp 2015), algunas de

ellas específicas de micobacterias, la mayoría de los componentes del elongasoma siguen aún sin identificarse. En particular cabe destacar como proteína específica de este grupo de bacterias a la Cell-wall-synthesis protein A (CwsA) cuya interacción con Wag31 tiene importancia para la estabilidad y localización polar de Wag31 (Plocinski et al. 2012).

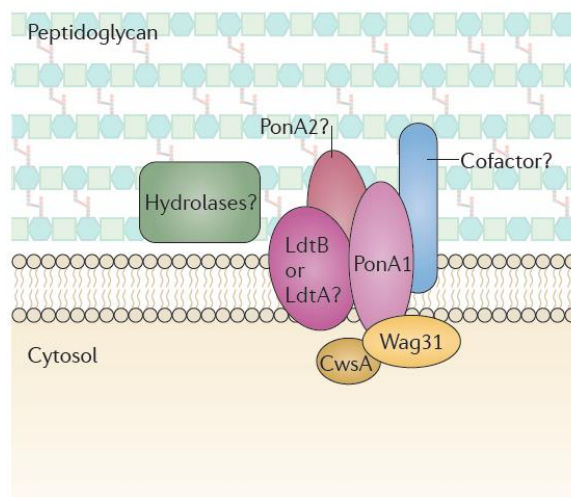


Figura 10: El elongasoma micobacterial y sus componentes. El elongasoma se encuentra anclado a los polos por Wag31, y es estabilizado por CwsA. PonA1 cataliza la incorporación de nuevas subunidades de peptidoglicano en los espacios creados por las hidrolasas. Las transpeptidasas LdtA y LdtB trabajan en conjunto con PonA1 y probablemente con PonA2, generando el entrecruzamiento del peptidoglicano entre dos alaninas (3-3) o un residuo de alanina con uno de ácido diaminopimérico (3-4). El enlace 3-3 sólo ocurre en micobacterias. (Tomado de Kieser and Rubin 2014)

Por último, existen pruebas convincentes de que los Mycobacteriales utilizan la fosforilación de proteínas para regular tanto la elongación celular como la división, lo que representa otra diferencia clave con respecto a los bacilos modelo (Bellinzoni et al. 2019; Molle and Kremer 2010; Wehenkel et al. 2008). Diversas proteínas involucradas en el divisoma y/o el elongasoma experimentan fosforilación, incluidas Wag31 y FtsZ (Jani et al. 2010; Thakur and Chakraborti 2006). Si bien el papel fisiológico de estos eventos de fosforilación sigue siendo en gran medida desconocido, se ha visto que la expresión de una versión fosfomimética de Wag31 estimula la actividad enzimática de MraY y MurG, dos proteínas relacionadas a la síntesis del precursor de peptidoglicano, el lípido II (Jani et al. 2010).

El divisoma de las micobacterias

Una vez que la bacteria ha alcanzado cierto largo, ocurre la división celular. El complejo encargado de llevar a cabo este proceso se conoce con el nombre de divisoma, y está compuesto por proteínas estructurales, proteínas reguladoras, peptidoglicano sintasas e hidrolasas, y proteínas similares a las de citoesqueleto eucariota. Se piensa que la maquinaria de síntesis de peptidoglicano se traslada desde los polos hacia la zona central de la bacteria, punto donde ocurrirá la formación del tabique o septo y posteriormente la constricción celular que dará lugar a las hijas. A diferencia de lo que ocurre en otras bacterias, las micobacterias carecen de las reglas moleculares conocidas en otras bacterias, responsables de situar el septo en el medio de la célula (Donovan and Bramkamp 2014; Kieser and Rubin 2014). Como consecuencia el mismo se puede encontrar en una zona altamente variable, de entre el 20 y el 80% del largo total de la célula.

La formación del septo se inicia con la polimerización del “anillo Z” que actúa como puesto de andamiaje de las proteínas estructurales que conforman el divisoma. La polimerización y constricción del anillo Z son procesos en los que participan varias proteínas reguladoras: Por un lado, la fosforilación de FtsZ por la Ser/Thr quinasa PknA, reduce la hidrólisis de GTP *in vitro*, necesaria para el ensamblaje del anillo Z (Thakur and Chakraborti 2006). Por otro lado, la sobreexpresión de cada una de las proteínas regulatorias MinD-like (Rv3660), la proteasa ClpX y la proteína con dominio LysM ChiZ da lugar a células hijas alargadas (Kieser and Rubin 2014).

Dentro de las proteínas estructurales del divisoma se encuentran FtsQ, CrgA, CwsA y FtsW (Donovan and Bramkamp 2014; Kieser and Rubin 2014). FtsQ interactúa con CrgA, quien es responsable del reclutamiento de las peptidoglicano sintasas PBPA y PBPB (Plocinski et al. 2012) (Figura 11). CrgA, también interactúa con la proteína CwsA, coordinando los procesos de elongación y división celular para asegurar que la formación del septo ocurra luego de que la célula alcanza cierto tamaño (Plocinski et al. 2012, 2013). Finalmente, FtsZ también interactúa con el dominio citoplasmático de FtsW, quien interactúa a través del dominio

extra-citoplasmático con la peptidoglicano sintasa PBPB. De esta manera, mediante la interacción FtsZ-FtsW-PBPB, se coordinan los eventos de señalización intracelulares con lo que ocurre en la pared celular (Figura 11) (Datta et al. 2006).

Luego del ensamblaje del anillo Z, ocurre la formación del septo. En este proceso participan las peptidoglicano sintetas PonA1, PBPA y PBPB, siendo PonA1 la única bimodal, es decir que participa en la síntesis de septo así como en la elongación polar (Hett et al. 2010). PBPB por su parte, también interactúa con la proteína de andamiaje del elongosoma Wag31,

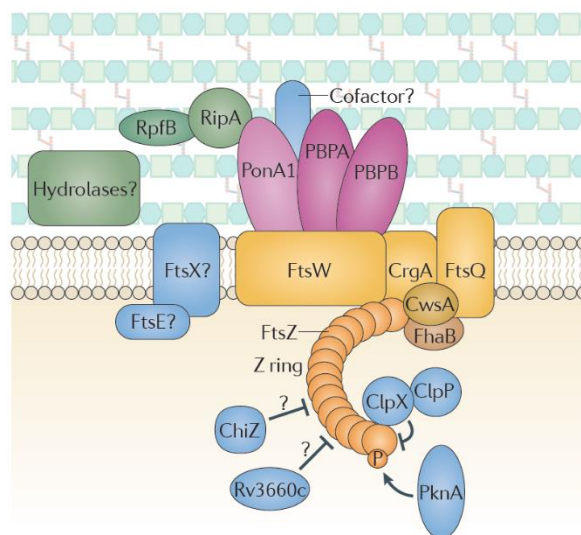


Figura 11. El divisoma micobacterial. La formación del septo es iniciada con la polimerización de FtsZ para dar lugar a la formación del anillo Z, que es estabilizado por FtsW. Las proteínas Rv3660, ClpX, ClpP, ChiZ y PknA regulan la polimerización de FtsZ. El anillo X actúa como sitio de andamiaje para las proteínas FtsW, FtsQ, CrgA y CwsA. Las peptidoglicano sintetas PBPA, PBPB y PonA1 sintetizan el septo mientras que las hidrolasas RipA y RpfB, son encargadas del clivaje de peptidoglicano que da lugar a la constricción y partición en dos células hijas. Probablemente FtsX y FtsE actúan a nivel de la regulación de este proceso. (Tomado de Kieser and Rubin 2014).

probablemente en la transición de septo a polo. Al igual que ocurre con la interacción CrgA-CwsA, la interacción Wag31-PBPB tendría un rol de intercambio de información entre elongosoma y divisoma: se ha visto que Wag31 se traslada desde los polos al septo, apenas ocurre la formación de este, se cree que con la finalidad de nuclear la maquinaria del

elongasoma en el polo naciente para el próximo ciclo de división celular (Mukherjee et al. 2009).

La síntesis del septo culmina con la constricción del mismo para dar lugar a dos células hijas. Las enzimas encargadas de realizar la degradación de peptidoglicano necesaria para que este proceso ocurra son hidrolasas de peptidoglicano RipA y RpfB (Hett et al. 2010). La acción de estas dos enzimas es compensada por PonA1 a través de competencia por la unión a RpfB. Esta competencia entre RipA y PonA por RpfB, evita que la hidrólisis del septo ocurra prematuramente, lo cual tendría efectos catastróficos para la bacteria (Hett et al. 2010).

En los últimos años se han identificado nuevos integrantes del divisoma de los *Mycobacteriales*, usando *Corynebacterium glutamicum* como modelo: Glp (gephyring-like protein) y GlpR (gephyring-like protein Receptor) (Martinez et al. 2023). Glp y GlpR forman un complejo que actúa como un puente entre el divisoma y el elongasoma en formación en medio de la célula en división. Mientras que Glp interactúa directamente con FtsZ, su receptor de membrana, GlpR, interactúa con Wag31, poniendo en evidencia la comunicación que ocurre en el septo entre la maquinaria de división y elongación (Martinez et al. 2023). Sin embargo, el conocimiento actual acerca de la composición del elongasoma y divisoma de los *Micobacteriales*, así como su regulación por Ser/Thr quinasas de proteínas fosforilación es aún muy limitada.

Ser/Thr QUINASAS DE PROTEÍNAS EN *M. tuberculosis*

El genoma de *M. tuberculosis* codifica para 11 Ser/Thr quinasas de proteínas, denominadas PknA a PknL (Cole et al. 1998), la mayoría de las cuales son proteínas de membrana, con un dominio quinasa intracelular conectado por un segmento transmembrana con un dominio extracelular que posiblemente tenga un rol sensor (PknA, PknB, PknD, PknE, PknF, PknH, PknI, PknJ y PknL) (Av-Gay and Everett 2000; Wehenkel et al. 2008). Solo dos de estas quinasas (PknG y PknK) son citosólicas. Por otro lado, cuatro de ellas (PknA, PknB, PknG y PknL) están estrictamente conservadas en el orden *Mycobacteriales*, incluyendo

Mycobacterium leprae, que ha sufrido una importante reducción genómica (Cole et al. 2001), indicando su posible relevancia para la fisiología de las micobacterias.

PknA y PknB, son dos Ser/Thr quinasa esenciales para el crecimiento de *M. tuberculosis*, y ambas son parte de un mismo operón conservado relacionado a la morfología y división celular (Boitel et al. 2003; Fernandez et al. 2006). La sobreexpresión de estas quinasa de proteínas en micobacterias provoca alteraciones significativas en el crecimiento y la morfología celular, (sugestivas de defectos en la síntesis de la pared celular), así como en los procesos de elongación y división celular (Kang et al. 2005). Se ha reportado que ambas enzimas son capaces de fosforilar *in vitro* componentes clave de la maquinaria de división celular, incluyendo FtsZ (Kang et al. 2005; Schultz et al. 2009; Thakur and Chakraborti 2006). PknG es también una Ser/Thr quinasa de proteínas estrictamente conservada en los *Mycobacteriales*, para cual se han postulado roles tanto en la fisiología de la bacteria como en su interacción con el hospedero. En este trabajo nos centramos en dos sustratos de esta Ser/Thr quinasa identificados por nuestro grupo de trabajo.

PknG

PknG es una de las dos Ser/Thr quinasa citosólicas de *M. tuberculosis* y cumple un papel fundamental tanto en el crecimiento de la bacteria en cultivo como en su virulencia en modelos de infección de ratón (Cowley et al. 2004; Tiwari et al. 2009; Walburger et al. 2004). Desde el punto de vista estructural, esta enzima posee características muy particulares. Además del dominio catalítico quinasa conservado, PknG posee dominios N- y C- terminales con funciones aún poco conocidas (Lisa et al. 2021; Scherr et al. 2007). El extremo N-terminal contiene un dominio rubredoxina caracterizado por la presencia de cuatro residuos de cisteína conservados que coordinan un ion metálico, generalmente hierro (Figura 12) (Scherr et al. 2007). Si bien este motivo participa en reacciones de transferencia de electrones en diversas bacterias, su rol en PknG recién comienza a ser dilucidado (Hagelueken et al. 2007; Lisa et al. 2021). La secuencia C-terminal de PknG contiene un motivo tetratricopéptido (TPR), un módulo proteico que participa en interacciones

proteína-proteína tanto en procariotas como en eucariotas (Blatch and Lässle 1999). Por otro lado, nuestro grupo demostró que PknG es capaz de autofosforilar su extremo N-terminal en tres residuos de Thr específicos (O'Hare et al. 2008). Este patrón de fosforilación es estructural y funcionalmente diferente al reportado previamente para las Ser/Thr quinasa de membrana de *M. tuberculosis* (Boitel et al. 2003; Durán et al. 2005; O'Hare et al. 2008; Villarino et al. 2005a). Mientras que la autofosforilación de estas últimas ocurre en el *loop* de activación dentro del dominio quinasa y tiene un importante papel en la regulación de la actividad, la autofosforilación de la secuencia N-terminal de PknG no modifica su actividad enzimática. Por el contrario, el control de la actividad quinasa parecería estar a cargo del dominio rubredoxina, como lo demuestran estudios estructurales y cinéticos recientes de nuestro grupo de trabajo (Gil et al. 2019; Lisa et al. 2021). Estos residuos autofosforilados, tanto en las quinasas de membrana como en PknG, juegan un papel fundamental en el reclutamiento de sustratos con dominios de reconocimiento específico (England et al. 2009; O'Hare et al. 2008; Villarino et al. 2005b).

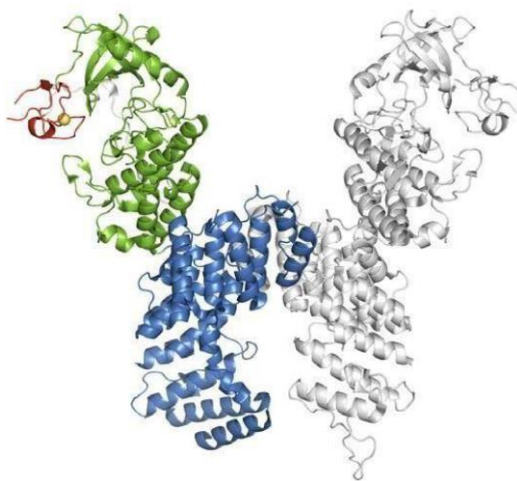


Figura 12: Representación tridimensional del dímero de PknG de *M. tuberculosis*. La estructura corresponde a una forma truncada, donde faltan los 74 aminoácidos iniciales (Tomado de Scherr, N., et al, 2007). En verde se observa el dominio quinasa con actividad catalítica, en azul el dominio tetratricopéptido involucrado en interacciones proteína-proteína y en rojo el dominio rubredoxina, exclusivo de procariotas y que participa en reacciones de transferencia de electrones.

Si bien el rol funcional de PknG es todavía un tema de debate, evidencias experimentales aportadas por distintos grupos de investigación permiten una primera aproximación a los procesos regulados por PknG. Por un lado, esta quinasa controla procesos relacionados con la virulencia y sobrevivencia en el hospedero. Se demostró que ratones SCID infectados con una cepa donde el gen que codifica para PknG fue eliminado, presentan un retardo en la mortalidad con respecto a ratones infectados con la cepa nativa (Cowley et al. 2004). Del mismo modo, micobacterias deficientes en PknG presentan menor viabilidad tanto *in vitro* como en modelos de infección de ratones BALB/c (Cowley et al. 2004). Además, se demostró que mientras que *M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir en macrófagos infectados, cepas deficientes en PknG son rápidamente degradadas en fagosomas maduros (Tiwari et al. 2009; Walburger et al. 2004). Estos resultados permitieron postular la participación, directa o indirecta, de PknG en la inhibición de la fusión fagolisosomal, aunque esto es aún un tema de debate en el área. En este mismo sentido, se demostró que la sobreexpresión de PknG en una micobacteria no patógena, que en condiciones normales es rápidamente destruida, permite la sobrevivencia dentro del macrófago (Houben et al. 2009). Si bien se ha postulado que este efecto está mediado por la actividad quinasa de PknG, los sustratos fosforilables en la bacteria o el hospedero responsables del mismo son poco conocidos.

Por otra parte, nuestro grupo demostró que PknG juega además un papel fundamental en el metabolismo bacteriano, y que este efecto está mediado por la fosforilación de un sustrato endógeno de las quinasa de micobacterias denominado GarA ("GlycogenAccumulatorRegulator A") (O'Hare et al. 2008; Villarino et al. 2005b). GarA es una proteína que contiene un dominio FHA que reconoce específicamente residuos de Thr fosforilados, y este dominio participa en la interacción con los sitios autofosforilados de las Ser/Thr quinasa (O'Hare et al. 2008; Villarino et al. 2005b) (Figura 13). Se ha demostrado que GarA controla la actividad de enzimas clave en el metabolismo del glutamato y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en forma dependiente de su estado de fosforilación. GarA inhibe dos enzimas fundamentales del metabolismo del glutamato: 2-oxoglutarato-deshidrogenasa (KGD) y glutamato-deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (GDH) (O'Hare et

al 2008). En forma sinérgica GarA activa la enzima Glutamato Sintasa (GOGAT) (Nott et al. 2009; Ventura et al. 2013) (Figura 13). La actividad de GarA y sus interacciones están reguladas por PknG: PknG fosforila un residuo de treonina en el extremo N-terminal de GarA, y esta fosforilación induce un cambio conformacional en GarA mediada por la interacción intramolecular entre el residuo fosforilado de GarA y su dominio FhaA. impidiendo que se una a sus dianas metabólicas (Figura 13) (England et al. 2009). En el estado fosforilado, GarA pierde su capacidad de inhibir la KGD y de activar la GDH (O'Hare et al. 2008).

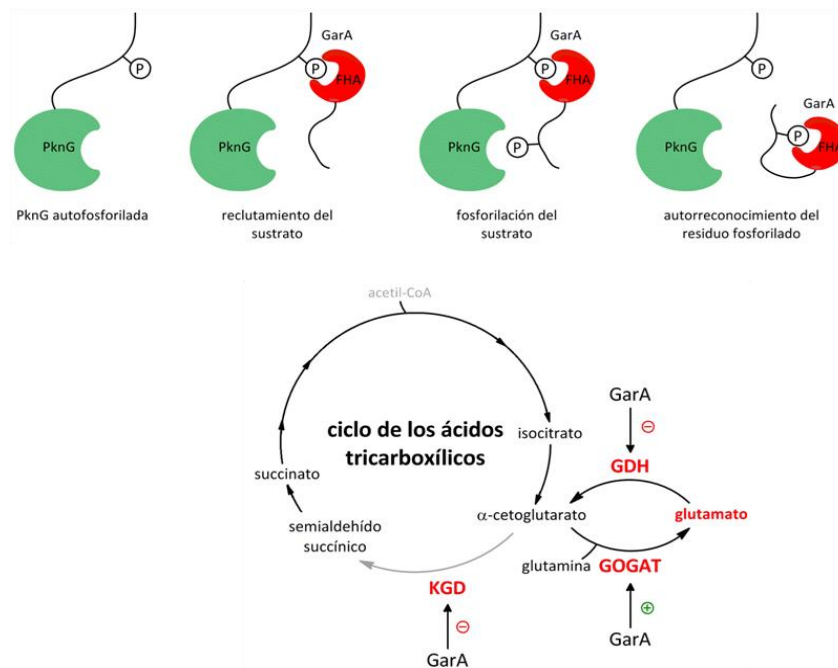


Figura 13 (A) Modelo de interacción entre PknG y GarA. PknG se autofosforila en su extremo N-terminal en un residuo específico de Thr, el cual es reconocido por el dominio FHA de GarA (reclutamiento del sustrato). Esta interacción lleva a la fosforilación de GarA también en el extremo N terminal (fosforilación del sustrato) y el posterior auto reconocimiento de su propio sitio de fosforilación. Esto lleva al apagado de todas las interacciones mediadas por el dominio FHA de GarA. (B) efecto de GarA sobre tres enzimas relacionadas al metabolismo del glutamato. La interacción de GarA con las enzimas ocurre solo en su estado no fosforilado.

Por otro lado, el estudio de micobacterias deficientes en GarA demostró que las mismas son rápidamente destruidas dentro del macrófago, y tienen dificultad para crecer in vitro

en medios pobres en aminoácidos, condiciones nutricionales a las que también se debe enfrentar la bacteria dentro del fagosoma (Ventura et al. 2013).

Con el fin de descubrir nuevas rutas de señalización reguladas por PknG, nuestro equipo desarrolló una estrategia basada en cromatografía de afinidad acoplada a espectrometría de masa que permitió identificar interactores/sustratos *in vitro* de esta quinasa en la micobacteria. Brevemente, se inmovilizó PknG recombinante en un soporte sólido y fue incubada con extractos citosólicos de *M. smegmatis* MC² 155. Basados en las características estructurales únicas de esta enzima, se utilizaron eluciones diferenciales para recuperar secuencialmente posibles sustratos de la quinasa, interactores con afinidad por residuos autofosforilados en la enzima, y finalmente proteínas retenidas por interacción con otros dominios de PknG (Gil et al. 2019) (Figura 14).

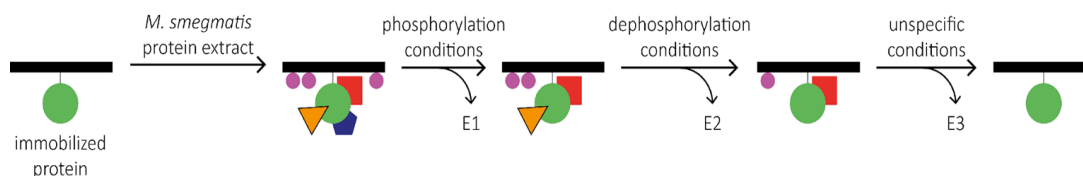


Figura 14. Estrategia experimental para la purificación de sustratos e interactores de PknG *in vitro*. Se inmovilizó PknG sobre un soporte sólido y se incubó con un extracto de proteínas citosólicas de micobacterias. Se ensayaron condiciones de elución secuencial y diferencial de manera de obtener interactores de distintos dominios de la quinasa. En un primer paso (E1) utilizando condiciones de fosforilación (ATP y MnCl₂) se eluyen sustratos que se liberan una vez fosforilados (O'Hare *et al*, 2008). En una segunda etapa (E2) se eluyó utilizando fosfatasa alcalina y por tanto en estas condiciones se recuperan todas las proteínas cuyas interacciones están mediadas por residuos fosforilados. Finalmente se utilizaron condiciones de elución inespecíficas (acetonitrilo/ácido fórmico) para recuperar el resto de las proteínas retenidas por posible interacción con otros dominios de PknG. Las proteínas eluidas se identificaron por espectrometría de masa. (Gil *et al*, 2019).

Todas ellas representan posibles nuevos sustratos de PknG a través de los cuales la quinasa podría mediar la sobrevivencia en el hospedero. De esta manera, se identificaron 66 interactores directos o indirectos de PknG, (Gil et al. 2019) incluidos los 2 sustratos previamente reportados: la proteína ribosomal 50S L13 (Wolff et al. 2015) y GarA (O'Hare et al. 2008), lo cual validó la estrategia experimental. Entre las proteínas que surgen como

interactores de PknG, se encuentran dos de ellas, que son el foco del presente trabajo: Glutamina sintetasa (GlnA1) y la proteína Forkhead associated domain A (FhaA), que al igual que GarA, contiene un dominio de reconocimiento de fosfotreoninas.

Con el fin de confirmar a FhaA como sustrato de PknG, se obtuvo FhaA como proteína recombinante y se utilizó en ensayos de Resonancia Plasmónica de superficie. En estos estudios se observó que mientras que PknG fosforilada forma un complejo estable con FhaA inmovilizada, una versión truncada de PknG carente de los sitios de fosforilación (PknG $\Delta 73$), es incapaz de unirse a FhaA (Figura 15) (Gil et al. 2019).

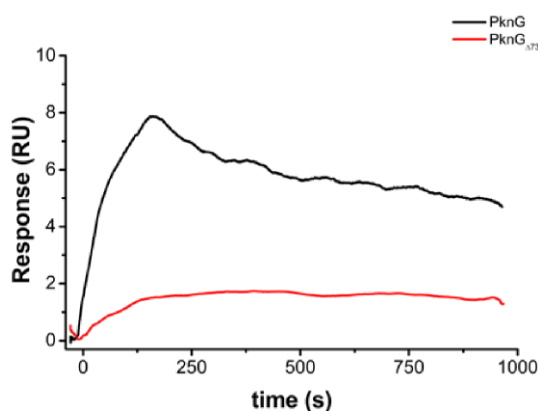


Figura 15: Gráfico de Resonancia plasmónica de superficie mostrando la interacción de FhaA inmovilizada en el chip con PknG fosforilada (negro) y una versión truncada de PknG carente de los sitios de fosforilación (rojo).

Para complementar los resultados anteriores, se evaluó a FhaA como sustrato de PknG *in vitro*. La FhaA recombinante fue incubada con PknG en condiciones de fosforilación. FhaA fue previamente sometida a tratamiento con fosfatasa alcalina para eliminar cualquier posible fosforilación endógena. Estos extractos se sometieron a análisis por espectrometría de masa y se identificaron 2 sitios de fosforilación en el N terminal, correspondientes a la Thr₁₈ y T₁₁₆ (Figura 16) (Gil et al. 2019).

En su conjunto, estos resultados validan a FhaA como sustrato e interactor de PknG, y abren la posibilidad de que represente una de las proteínas a través de las cuales la quinasa ejerce su efecto sobre la fisiología de la bacteria.

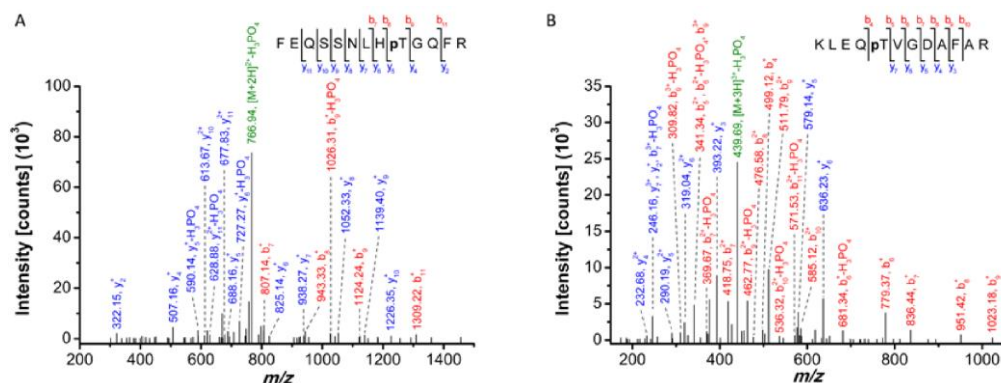


Figura 16: Sitios de fosforilación de FhaA por PknG. Los iones que presentan fosforilación se muestran en color verde, en rojo los iones b y en azul los y. A- Espectro MS/MS del péptido FEQSSNLHpT116GQFR ($MH^+ = 16300.79$ Da). B- Espectro MS/MS del péptido KLEQpT18VGDAFAR ($MH^+ = 1414.94$ Da).

Para completar la validación de los candidatos, llevamos a cabo estudios de proteómica comparativa entre una cepa nativa de *M. tuberculosis* (wt) y una cepa con deficiencia en PknG (ko) (Gil et al. 2019). La estrategia de 2D-DIGE fue utilizada para la detección de isoformas fosforiladas. Esta estrategia se basa en la separación de proteínas en geles bidimensionales con detección de fluorescencia diferencial. Brevemente, extractos proteicos de cada cepa fueron marcados con fluoróforos distintos y se separaron en un mismo gel 2D. Mediante el uso de un software de análisis de imágenes específico para el sistema 2D-DIGE se detectaron spots diferenciales entre las cepas. La identidad de aquellas proteínas que surgieron como diferenciales se determinó mediante espectrometría de masa.

En forma consistente con los resultados interactómicos, GarA y GlnA1 fueron identificadas en “trenes de spots” diferenciales (Figura 17). El análisis de los geles muestra que la isoforma no fosforilada de GarA (de mayor pI) está sobrerrepresentada en la cepa ko para

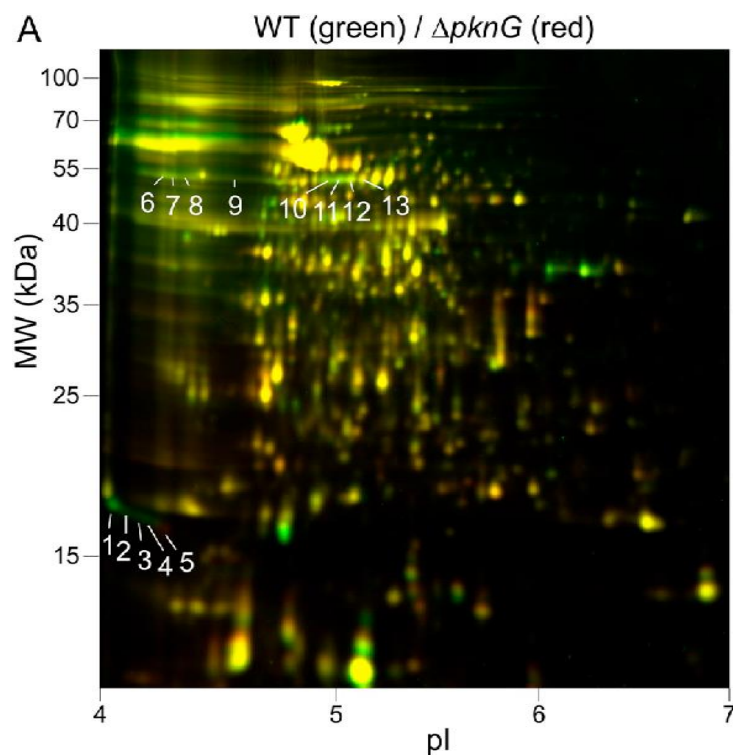


Figura 17. Gel de DIGE representativo donde se comparan los spots presentes en un extracto total de proteínas de la cepa nativa (wt) y deficiente en pknG (ko). Las proteínas provenientes de las cepas wt y ko se separaron en geles de gradiente de pH 4-7 y 12% de acrilamida, y se detectaron diferencialmente sobre el mismo gel: verde: wt (Cy5); rojo: ko (Cy3). Los spots diferenciales que exhiben patrones consistentes con cambios en la fosforilación se encuentran indicados con números. Los spots superiores (6-13) corresponden a isoformas de GlnA1 mientras que los inferiores (1-5) corresponden a GarA. Figura tomada de Gil *et al*, 2019

PknG, mientras que las isoformas fosforiladas están disminuidas con tasas de cambio de hasta 8.7.

Por otra parte, se observa que mientras que el spot de GlnA1 de mayor punto isoeléctrico (pI) se encuentra incambiado en ambas condiciones, los spots con menor pI están subrepresentados en la cepa ko (Gil et al. 2019). Este patrón de trenes es característico de proteínas que presentan modificaciones postraduccionales que cambian el punto isoeléctrico, como lo es la fosforilación. Sin embargo, el/los sitios de fosforilación de GlnA1 no pudieron ser identificados. La detección de fosfopéptidos por espectrometría de masa, sin un paso previo de enriquecimiento, es difícil debido a la supresión iónica por péptidos

no modificados y la pérdida del grupo fosfato durante su análisis (Dephoure et al. 2013; Mann et al. 2002). Por tanto, estos resultados validan la estrategia experimental (a través de la identificación de los sitios de fosforilación de GarA) y postulan a GlnA1 como nuevo sustrato de PknG. Curiosamente, ambas proteínas están relacionadas al metabolismo del nitrógeno en la bacteria.

GlnA1

La Glutamina sintetasa, (también conocida como γ glutamil-amonio ligasa). GlnA1 cataliza la síntesis de L-glutamina a partir de L-glutamato y ATP, y junto con la enzima GOGAT cumple un rol fundamental en la asimilación de nitrógeno, siendo esta la principal vía de asimilación de amonio, ya que en *M. tuberculosis* la glutamato deshidrogenasa es fundamentalmente catabólica. (Tullius, Harth, and Horwitz 2003) (Figura 18).

Existen 4 isoformas de Glutamina sintetasa en *M. tuberculosis*, denominas GlnA1, GlnA2, GlnA3 y GlnA4, de las cuales las cuales GlnA2 sintetiza D-glutamina y D-isoglutamina, aminoácidos necesarios para la síntesis de pared celular, mientras que GlnA1, GlnA3 y GlnA4 sintetizan L-glutamina. De estas 3 isoformas, GlnA1 es la única que es esencial para el crecimiento in vitro y la que se expresa en mayores niveles, siendo su tasa de expresión es entre 9 y 15 veces más alta que la del resto (Harth et al. 2005). El gen codificante para GlnA1 consta de 1437 pares de bases, y codifica una proteína de 57.3 KDa, correspondiente a 487 aminoácidos, y la forma activa es dodecamérica (Xu et al. 2023).

GlnA1 fue tempranamente reconocida como un factor de virulencia muy importante en *M. tuberculosis* (Harth and Horwitz 1999; Tullius et al. 2003). La inhibición de GlnA1 afecta el crecimiento de bacterias en cultivo y en macrófagos (Harth et al. 2000; Harth and Horwitz 1999). Más aún, la inactivación del gen de GlnA1 permitió demostrar que esta enzima no sólo es esencial para el crecimiento de *M. tuberculosis* en macrófagos sino también para la virulencia en modelos animales (Tullius et al. 2003). En micobacterias patógenas, GlnA1 posee la particularidad de ser secretada al interior de fagosomas de monocitos infectados, afectando el pH del fagosoma y la fusión fagolisosomal (Harth, Clemens, and Horwitz 1994). GlnA1 también es secretada al medio extracelular, y esta actividad cumple un papel

importante en la síntesis de poli-L-glutamato/glutamina, un polímero de la pared celular que corresponde al 10% de la pared celular de las micobacterias patógenas y es fundamental para la patogénesis (Harth et al. 2000; Tripathi, Chandra, and Bhatnagar 2013; Xu et al. 2023).

La actividad de GlnA1 está finamente regulada tanto a nivel transcripcional como postraducciona (Amon, Titgemeyer, and Burkovski 2009; Harper et al. 2008; Harth and Horwitz 1997; Mehta et al. 2004) En particular, la adenilación en un residuo específico de Tyr es una modificación postraducciona bien caracterizada que resulta en cambios importantes en la actividad enzimática. En condiciones de disponibilidad de nitrógeno, y con el fin de evitar la disminución de los niveles intracelulares de glutamato, GlnA1 es adenilada y como consecuencia disminuye su actividad (Mehta et al. 2004). El estado de adenilación (y por tanto la actividad) de GlnA1 es controlado por GlnE, una adenil-transferasa que es capaz tanto de incorporar como de remover la adenilación a la GlnA1 (Carroll, Pashley, and Parish 2008) (Figura 18). La posible regulación de la actividad de GlnA1 por fosforilación es un aspecto novedoso, y resulta llamativo que haya pasado desapercibido en una enzima tan estudiada. Sin embargo, reportes previos apoyan nuestros resultados, ya que esta enzima se encontró por primera vez fosforilada en micobacterias en estudios fosfoproteómicos (Kusebauch et al. 2014).

El modelo actual, junto con nuestros resultados recientes, permiten postular que PknG regula el cruce de rutas de la asimilación de nitrógeno y degradación de glutamato a través de la fosforilación de GarA y GlnA1 (Figura 18). Estos procesos deben estar finamente regulados para permitir un balance entre síntesis y degradación de intermediarios nitrogenados y asegurar la sobrevivencia en condiciones de deficiencia de nutrientes. Resultados previos apoyan esta hipótesis, ya que fue reportado que cepas deficientes en PknG presentan niveles de glutamina y glutamato al menos tres veces superiores a los de la cepa nativa (Cowley et al. 2004). Durante su estadía en el interior del macrófago, las micobacterias deben sobrevivir y multiplicarse en condiciones extremas de pH, presencia de radicales libres y escasa disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

Sin embargo, aún estamos lejos de comprender el rol que la fosforilación de estas proteínas cumple en la adaptación de *M. tuberculosis* al medio intracelular. Estos datos serían relevantes considerando que tanto PknG como GarA y GlnA1 son esenciales para la sobrevivencia de la bacteria en el hospedero (Tullius et al. 2003; Ventura et al. 2013; Walburger et al. 2004)

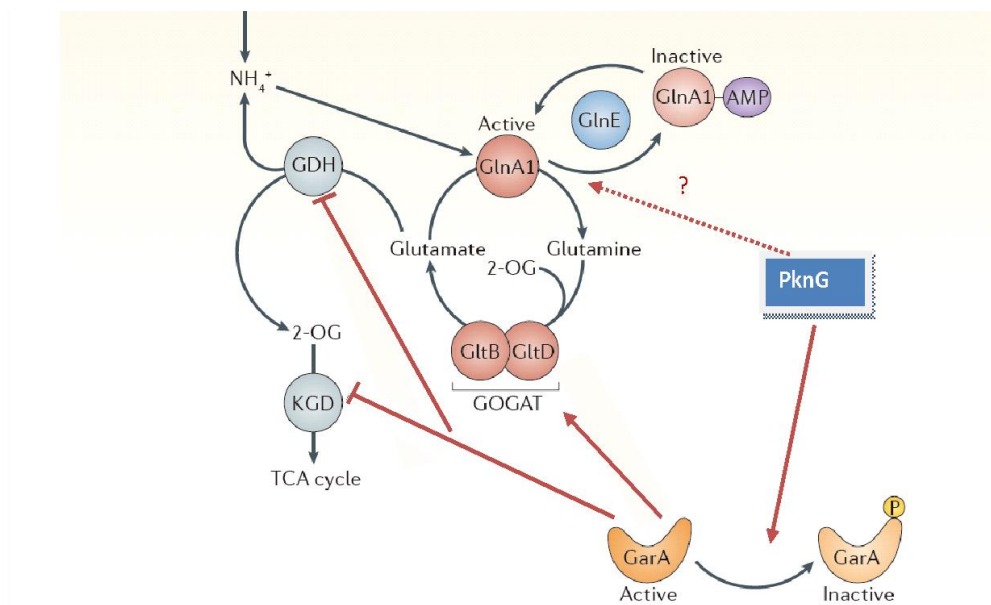


Figura 18. Regulación por PknG del metabolismo del Nitrógeno en micobacterias. La glutamina sintetasa, GlnA1 es responsable de la asimilación de amoníaco a través de la síntesis de L-glutamina. La glutamina y el 2-oxoglutarato son sustratos de la GOGAT, enzima que cataliza la síntesis de glutamato. Por otro lado, la glutamato deshidrogenasa (GDH) cataliza la desaminación oxidativa del glutamato, dando como producto 2-oxoglutarato que puede entrar en el ciclo de Krebs. Existen distintos mecanismos que regulan el balance entre la asimilación de nitrógeno y la degradación de glutamato. En condiciones de exceso de nitrógeno, la enzima GlnE adenila un residuo de Tyr específico de GlnA1 e inhibe su actividad enzimática. Por otro lado, en condiciones de privación de nitrógeno, GlnE cataliza la deadenilación de GlnA1. A su vez, PknG regula esta vía actuando a través de la fosforilación de la proteína GarA. GarA desfosforilada interactúa con varias enzimas involucradas en esta vía regulando la actividad de las mismas. Por un lado, inhibe la GDH y KGD y por otro activa GOGAT. La fosforilación de GarA por PknG lleva a la supresión de las interacciones moleculares con estas enzimas y los efectos sobre la actividad de las mismas. Nuestros resultados preliminares apuntan a que PknG también regularía otra enzima clave de este proceso, GlnA1. (adaptado de Gouzy et al, 2014).

FhaA

Fha es una proteína multidominio, que posee una estructura semejante a las proteínas de andamiaje eucariotas. Está conformada por 526 aminoácidos y presenta un dominio C-terminal FHA que reconoce específicamente treoninas fosforiladas. Este dominio se une mediante una región flexible de unos 300 aminoácidos a un dominio globular N-terminal de aproximadamente 130 aminoácidos de largo, cuya función es desconocida (Roumestand et al. 2011).

El gen que codifica para FhaA forma parte del operón altamente conservado, relacionado a la división celular. En él se encuentran genes que codifican proteínas relacionadas a la morfología, el crecimiento y división celular (RodA y PbpA), dos Ser/Thr quinasas de proteínas (PknA y PknB) y la única fosfatasa de fosfoserinas y fosfotreoninas del genoma (PstP), además de la proteína de función desconocida FhaB (Figura 19) (Fernandez et al. 2006; Wehenkel et al. 2008).

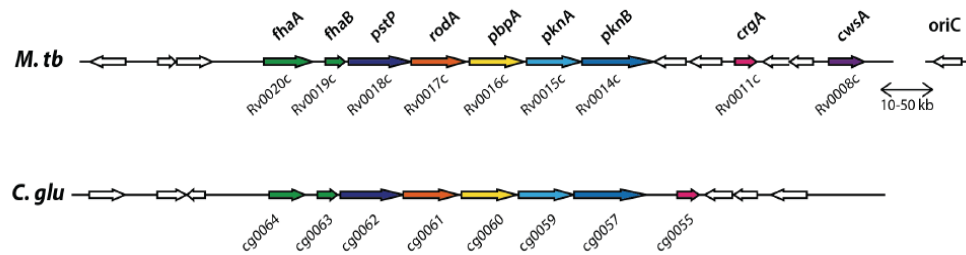


Figura 19: En la figura se observa la sintenia de los genes que comparten operón con FhaA y sus regiones flanqueantes. Este operón también se encuentra conservado en la mycobacteria *Corynebacterium glutamicum* y está compuesto por los genes codificantes para dos proteínas con dominio FHA (FhaA y FhaB) dos Ser/Thr quinasas (PknA y PknB), proteínas de división y elongación celular (RodA y PbpA) y la única fosfatasa de Ser y Thr del genoma. Tomado de Fernández *et al*, 2006.

Trabajos previos apuntan a que FhaA participaría en la regulación de la biosíntesis de pared celular a través de su interacción con dos sustratos de PknB, Mvin y CwlM. Se ha propuesto que su interacción con el dominio pseudoquinasa de la flipasa de Lípido II Mvin es capaz de inhibir la traslocación de precursores de peptidoglicano desde el citosol al espacio

periplásmico, y que la disminución de los niveles celulares de FhaA causa una acumulación de peptidoglicano en los polos y septos, además de alterar considerablemente la morfología celular (Gee et al. 2012). También se ha visto que FhaA es capaz de interactuar con la forma fosforilada de CwlM, y se propuso que podría regular la biosíntesis de precursores del peptidoglicano (Turapov et al. 2018). En contraste con la posible inhibición de la traslocación de precursores de peptidoglicano, una cepa *knockout* para *fhaA* presenta un fenotipo en que las células son más cortas (G. Viswanathan et al. 2017), apuntando a que FhaA sería necesaria para el crecimiento. Por lo tanto, si bien los datos disponibles apuntan a la participación de FhaA en la síntesis de peptidoglicano, la morfología celular y la división celular, aún se desconocen los mecanismos moleculares y el rol de FhaA en estos procesos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis de trabajo es que GlnA1 y FhaA representan nuevos sustratos de PknG que cumplen roles importantes y aun desconocidos en las via de señalización de esta quinasa.

El objetivo general de este trabajo fue realizar una caracterización bioquímica y funcional de estas proteínas para aportar a nuestro entendimiento de su rol en las micobacterias, así como su posible regulación por fosforilación de proteínas.

Para ellos se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar GlnA1 como sustrato de PknG y evaluar el rol de esta fosforilación en su actividad in vivo e in vitro
2. Investigar el papel que cumple FhaA en las micobacterias y su posible regulacion por fosforilación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sección GlnA1

Bacterias y plásmidos:

Se utilizaron cepas de *Mycobacterium smegmatis* mc2 o derivadas de la misma, las cuales se crecieron en medio líquido 7H9 o Sauton, a 37 °C y 220 rpm y fueron colectadas en fase exponencial ($DO_{600}=0.8$). La cepa derivada de la mc2 155 fue generada por transformación con el vector de expresión pML2031 (Forrellad et al. 2014) conteniendo el inserto para la expresión del gen de glnA1 (Rv2220) de *Mycobacterium tuberculosis* bajo el control de un promotor inducible por isovaleronitrilo 0.5 mM. Dicha construcción fue diseñada y clonada por Marina Forrellad (INTA-Castellar) reemplazando el codón de inicio GTG por ATG para así generar un sitio de corte para NdeI y eliminando el códon de stop y adicionando 6 pb para generar un sitio EcoRV que se encuentra antes de los tags que están en C-terminal, uno de hemaglutinina (HA) y otro de histidinas. Los stocks fueron almacenados a -80 en glicerol 15% y se estiraron placas de medio 7H10 para su uso cotidiano. Los medios fueron adicionados con 100 µg/mL de ampicilina y/o higromicina 50 µg/mL en caso de ser necesario.

Para la producción de GlnA1 recombinante se transformaron cepas de *Escherichia coli* BL21 DH5α y BL21 (DE3) Plys con el vector pCR T7 TOPO conteniendo distintas versiones (WT, SxA, SxE) de glnA1 de *Mycobacterium tuberculosis* fusionadas a un tag de 6 histidinas en la posición N-terminal. La versión del plásmido portadora de glnA1 WT (Rv2220) fue provista por S. Mowbray (Studier 2005). Las cepas mutantes SxA y SxE fueron generadas en el laboratorio del Dr. Pedro Azari. La cepa BL21 DH5α se utilizó para amplificar el plásmido y la cepa BL21 (DE3) PlysS para la producción de proteína propiamente dicha. Ambas cepas fueron transformadas mediante shock térmico. Se hicieron células químicamente competentes utilizando $CaCl_2$ y se incubaron con el plásmido pCR T7 TOPO conteniendo las distintas versiones de glnA1 durante 30 min a 4 °C seguido de un choque térmico a 42 °C por 45 s. Las bacterias se recuperaron durante 1h en medio líquido LB conteniendo 100 µg/mL ampicilina y luego fueron plaqueadas en LB sólido. Las cepas fueron mantenidas para

su uso cotidiano en placas de LB agar suplementado con ampicilina 100 µg/mL y en stocks de LB con 15% de glicerol para su criopreservación.

Para la producción de PknG recombinante se transformó *E. coli* BL21 DE3 con el plásmido pET28 conteniendo la secuencia de PknG de *Mycobacterium tuberculosis* fusionada a un tag de histidinas y un sitio de corte para TEV (O'Hare et al. 2008). La transformación de células químicamente competentes se llevó a cabo como se describió previamente para GlnA1. Las bacterias se mantuvieron en placas de LB conteniendo 50 µg/mL de kanamicina y en stocks con 15% de glicerol para su criopreservación.

Producción de proteínas recombinantes en *E. coli*

GlnA1

Se llevó a cabo la producción de proteína recombinante de tres formas distintas de GlnA1: la versión WT, una versión fosfomimética en el residuo de Ser 57 (S x E) y una versión fosfoablativa de dicha Ser (S x A). La producción y purificación de estas proteínas se llevó a cabo durante una pasantía en la Unidad de Microbiología Estructural del Instituto Pasteur de Paris. Para ello se largaron preinóculos en medio 2YT suplementado con NPS (Na₂HPO₄ 50 mM, Na₂HPO₄ 50mM, NH₄SO₄ 25mM), glucosa 0.8%, MgSO₄ 20 mM y ampicilina 100 µg/mL. Luego de 6 h estos preinóculos se utilizaron para inocular medio 2YT suplementado con ampicilina, MgSO₄ y 5052 (glicerol 0.5%, glucosa 0.05%, lactosa 0.2%). Este cultivo se creció a 37 °C durante 4 h y a 20 °C overnight (ON).

Se realizaron Pruebas de expresión sobre 1 mL de cultivo. El pellet correspondiente a este volumen se resuspendió en 1 mL de buffer de lisis (Hepes 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, glicerol 5%, TCEP 0.25 mM, MgCl₂ 1 mM, Benzonasa 1:1000, 1X inhibidor de proteasas, 1x Bugbuster y lisozima) y se incubó con agitación suave por 45 min a 4 °C. Se tomaron 20 µL representativos de la fracción total y el sobrante se centrifugó 15 min a 25.000 x g a 4 °C. Se tomaron 20 µL de sobrenadante, representativos de la fracción soluble y se aplicó el

sobrenadante restante en 30 μ L de resina Ni-NTA. Esto se incubó nuevamente en la rueda por 30 min. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados con PBS y se eluyó de la misma la proteína recombinante agregando 15 μ L buffer de carga de SDS PAGE y calentando 2 min a 95 °C.

Los cultivos para producción de proteína recombinante se colectaron por centrifugación y se lisaron en buffer IMAC A (Hepes 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, glicerol 5%, imidazol 5 mM). La resuspensión se incubó con agitación suave a 4 °C durante 45 min. Se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 25.000 x g y luego se sonicó con macrotip (50% de amplitud, 6 pulsos de 45 s, 1 s on, 1 s off, 1 minuto de descanso entre cada pulso). El lisado se centrifugó a 17.000 x g durante 40 min. El sobrenadante fue aplicado a una columna His trap FF crude, utilizando un equipo Äkta en cámara fría. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente de imidazol generado utilizando el buffer IMAC B (Hepes 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, glicerol 5%, imidazol 500 mM). El curso de la elución se siguió a través de la detección de la señal UV ($\lambda=280$ nm).

Se colectaron fracciones de 0.5 mL y se analizaron en un gel de SDS PAGE. Aquellas fracciones que contenían proteína recombinante se juntaron y se sometieron a cromatografía de exclusión molecular. Para ello se utilizó una columna Sephacryl S400 16/60 (General Electric, volumen 120 mL, presión máxima 0.15 mPa) y un equipo Äkta a 4 °C operando a un flujo de 0.4 mL/m. Como buffer para la exclusión molecular se utilizó Hepes 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 2mM y glicerol 5%. Se colectaron fracciones de 2 mL y aquellas conteniendo proteína con el tiempo de retención acorde a la masa molecular esperada fueron concentradas en filtros de centrifuga. La purificación de proteína se sometió a *Dynamic Light Scattering* (DLS) y geles nativos con el fin de determinar el estado de oligomerización de la misma.

PknG

Para la producción de PknG recombinante se largaron preinóculos que se utilizaron para inocular medio de autoinducción (Studier 2005). Estos cultivos se crecieron 4 h a 37 °C y se

incubaron ON a 30 °C. Las células se colectaron por centrifugación y el pellet se resuspendió en buffer NaH_2PO_4 5 mM, Na_2PO_4 50 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, glicerol 5%, pH 8 suplementado con inhibidor de proteasas Roche, MgCl_2 1 mM, Benzonasa y lisozima. Esto se incubó con agitación suave durante 45 min a 4 °C y luego se sonicó como se explicó para GlnA1. Se centrifugó el lisado y el sobrenadante se aplicó en una columna His trap (GE healthcare) utilizando una bomba peristáltica a 4 °C y un flujo de 1 mL/min. La elución se llevó a cabo en un equipo Äkta, utilizando un gradiente de buffer B (NaH_2PO_4 5 mM, Na_2PO_4 50 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 400 mM, glicerol 5%). Las fracciones conteniendo PknG se colectaron, dializaron y digirieron ON con TEV en 1 L de buffer Tris 50 mM pH 8, NaCl 250 mM, glicerol 5% en presencia de Dithiothreitol (DTT) 1 mM. La proteína dializada se concentró en filtros de centrífuga de MWCO (Molecular weight Cut-off) 30 KDa y se inyectó en un sistema Äkta equipado con una columna Superdex 200 16/60. Se corrieron geles de SDS PAGE con las fracciones eluidas y aquellas conteniendo proteína recombinante se concentraron en filtros de centrífuga y se alicuotaron en tubos para su criopreservación.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

Con el fin de determinar el estado de oligomerización y la heterogeneidad de la GlnA1 producida, se sometió a la misma a análisis de dispersión dinámica de luz (DLS). Este análisis fue llevado a cabo por Sebastien Brulé, del laboratorio de Biofísica Molecular del Institut Pasteur de Paris. El mismo se llevó a cabo en un equipo DynaPro plate reader y se evaluaron 20 condiciones distintas con el fin de optimizar la solubilidad de la proteína: MES 20 mM pH 6 NaCl 50; 150; 300 y 500 mM. HEPES 20 mM pH 7 NaCl 50; 150; 300 y 500 mM. HEPES 20 mM pH 8 NaCl 50; 150; 300 y 500 mM. TRIS 20 mM pH 8.5 NaCl 50; 150; 300 y 500 mM. TRIS 20 mM pH 9 NaCl 50; 150; 300 y 500 mM.

SDS PAGE y PAGE nativo

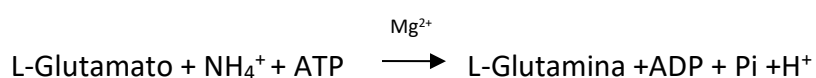
La electroforesis monodimensional se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12% bajo una corriente constante de 10 mA/20 mA para los geles de apilado/separación respectivamente. En caso de usar geles pre-armados (Invitrogen) la corriente utilizada fue de 120 mA. Las muestras conteniendo buffer Tris 0.25M, 8% SDS, 40% glicerol, 0.04% azul de bromofenol, y 1% β mercaptoetanol fueron calentadas durante 8 min a 95 °C previo a la electroforesis.

Los geles nativos se corrieron 110 min a 150V. Se utilizaron geles Native page, bis tris 3-12% acrilamida, Invitrogen. Como estándar se utilizó el marcador de peso molecular *Native Mark unstained protein standard* (Invitrogen).

Los geles se fijaron en 4:1:5 etanol:ácido acético:H₂O y se tiñeron con azul de Coomassie G-250 (Baker) en etanol. Las imágenes de los geles fueron adquiridas utilizando un scanner UMAX Power-Look 1120 y el software LabScan 5.0 (GE Healthcare).

Ensayos de actividad glutamina sintetasa

La glutamina sintetasa (glutamato amonio ligasa) cataliza la conversión de glutamato y amonio a glutamina a expensas de hidrólisis de ATP:



Para los ensayos de actividad glutamina sintetasa utilizamos dos métodos distintos:

Método del azul de molibdato: (Gawronski and Benson 2004) es un método colorimétrico de medición continua, basado en la detección del fosfato inorgánico liberado a partir de la hidrólisis del ATP. Estos grupos fosfato reaccionan con el ion molibdato en solución para dar fosfomolibdato, el cual es reducido en medio ácido resultando en la formación de Azul de molibdeno.

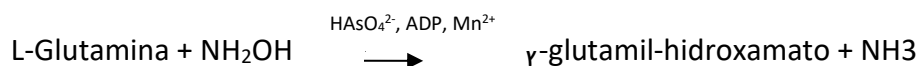
La reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente en buffer Mops 100 mM pH 8.2, MgCl₂ 50 mM, glutamato monosódico 250 mM, NH₄Cl 50 mM, ATP 10 mM. Se prepararon

soluciones de revelado consistentes en 12 % m/v ácido ascórbico en 1 N HCl (Solución A) 2 % m/v molibdato de amonio tetrahidratado en H₂O (solución B) que fueron almacenadas a 4 °C por un máximo de una semana.

Las reacciones de biosíntesis fueron realizadas en placas de 96 pocillos de fondo plano, en las que se depositaron 90 uL de buffer utilizando una pipeta multicanal. Las reacciones se iniciaron agregando 10 uL de reacción de fosforilación conteniendo GlnA1 recombinante (producida y purificada previamente por nosotros) en presencia o ausencia de PknG (ver “ensayos de fosforilación”) a una concentración de GlnA1 para la cual la concentración de Pi producido por esta, estuviera dentro de la curva patrón de Pi. En el caso de la curva patrón, se adicionaron 10 uL de estándar fosfato (20 mM fosfato de potasio dibásico en H₂O) a concentraciones de entre 70 y 700 µM.

Luego 5 minutos de incubación, se transfirieron 50 µL de cada reacción a una nueva placa conteniendo 150 µL de reactivo de revelado (mezcla de dos partes de solución A y una parte de solución B), preparado en el momento. Se dejó transcurrir la reacción de revelado durante 5 minutos y se agregaron 150 µL de una solución de citrato de sodio tribásico dihidratado 2% y ácido acético 2% para detener la reacción. Se dejó equilibrar y se realizaron las medidas de absorbancia a 650 nm en un lector de placas. Se graficaron las curvas de calibración y se infirió la actividad GlnA1 por interpolación en dicha curva.

Método γ -glutamyltransferasa (Campolo et al. 2023): Es un método colorimétrico de punto final basado en la detección del γ -glutamylhidroxamato formado a partir de glutamina e hidroxilamina que GlnA1 cataliza en presencia de manganeso, arsenato y ADP.



El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 wells, a 37 °C en buffer Imidazol 60 mM pH 6.6, L-glutamina 60 mM, NH₂OH 30 mM, Na₂HAsO₄ 20 mM, ADP 0.4 mM y MnCl₂ 1 mM. La reacción fue iniciada agregando solución de fosforilación incubada previamente durante 40 minutos, conteniendo GlnA en forma dodecamérica a una concentración de 1 nM (volumen

final 250 μ L) en presencia o ausencia de PknG (ver ensayos de fosforilación). La curva de calibración se generó utilizando soluciones de estándar de γ -glutamihidroxamato de concentraciones entre 0.1 y 50 mM. Transcurridos 10-20 minutos de reacción la misma se detuvo mediante el agregado de solución de FeCl₃ 0.37 M, ácido tricloroacético 0.2 M en HCl 0.67 M). La formación de γ -glutamihidroxamato por GlnA1 fue determinada mediante medidas de absorbancia a 490 nm utilizando un lector de placas. El valor de concentración de γ -glutamihidroxamato producido se obtuvo a partir de la gráfica de absorbancia versus concentración del estándar.

Ensayos de fosforilación y detección de sitios de fosforilación por espectrometría de masa

Con el fin de evaluar a GlnA1 como sustrato de PknG, se llevaron a cabo ensayos de fosforilación *in vitro*. Se incubó PknG con GlnA1 (o con GarA como control positivo de fosforilación) a concentraciones molares de entre 1: 10 a 1: 150 en buffer HEPES 50 mM pH7, PknG 1 μ M, MnCl₂ 2mM y ATP 2mM (volumen final 20 μ L). La concentración de los sustratos fue entre 10 y 100 μ M para GlnA1 y 10 μ M para GarA. Se incubaron las reacciones durante 30 min a 37 °C y transcurrido este tiempo se digirieron las muestras con tripsina porcina modificada (grado secuenciación, Promega) durante 3h. Los péptidos resultantes fueron concentrados y desalados en columnas de fase reversa C18 Zip Tip® (Merck, Millipore) previamente equilibradas con ácido fórmico 0.1% (fase A). La elución de los péptidos se realizó con ácido fórmico 0.07% en ACN 70% (fase B). Las muestras se evaporaron hasta sequedad en *SpeedVac* y se resuspendieron en fase A. La adquisición de los espectros se llevó a cabo en un espectrómetro de masa LTQ Velos (Thermo Scientific) equipado con una trampa iónica lineal y acoplado a un sistema nano-HPLC easy-nLC 1000 (Proxeon-Thermo Scientific). Para la separación de los péptidos se utilizó una pre columna *PepMap C18 nano-trap* Acclaim® (75 μ m x 500 mm, Thermo Scientific) y una columna de fase reversa *PepMap C18 Easy spray* 50 μ m x 75 μ m (RSLC, 2 μ m, 100 Å). La elución de los péptidos se llevó a cabo a un flujo de 250 nL/min utilizando un gradiente lineal de 5% a 55% de fase B en 60 min a 45 °C. El análisis *on-line* se realizó en modo dependiente de datos

(escaneo completo seguido de MS/MS de los 10 valores m/z más intensos de cada segmento), usando una energía de colisión normalizada de 35. El voltaje de la fuente se fijó en 2.3 kV y la temperatura en 260 °C. Para la selección de los valores de m/z a fragmentar por segmento se utilizó una lista de exclusión dinámica con los siguientes parámetros: recuento de repeticiones = 3; duración de la repetición = 30 s; duración de la exclusión = 45 s. Para la adquisición de datos se utilizó el programa Xcalibur v2.1 (Thermo).

Para la identificación de los sitios de fosforilación se utilizó el programa Sequest, utilizando los parámetros que se detallan a continuación: tolerancia de masa del precursor (ppm): 700; enzima: tripsina; especificidad de la enzima: completa; máximo de cortes salteados permitidos: 1 modificaciones variables máximas por péptido: 2; modificaciones variables: oxidación de metioninas; fosforilación en serina y treonina.

Generación de extractos totales de *Mycobacterium smegmatis*

Se crecieron precultivos de *Mycobacterium smegmatis* en medio 7H9 suplementado con glicerol, ADC (Glucosa 2%, Suero fetal bovino 2.5%, NaCl 0.85%) y Tween 0.1%. Estos precultivos se diluyeron 1/400 y fueron colectados al día siguiente mediante centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos. Los sobrenadantes se utilizaron para obtener las exoproteínas y los pellets para las fracciones solubles. Se concentraron 10 mL de sobrenadante en filtros para centrifuga Vivaspín® de MWCO 3 KDa. El resultante de esta concentración se concentró aún más en utilizando unidades de filtrado de 500 µL y MWCO 3 KDa hasta un volumen final de 100 µL.

El pellet proveniente de 100 mL de cultivo se resuspendió en buffer de lisis 2D (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 2%) y se sonicó con microtip (amplitud 15% 2 min, 10 s on, 20 s off, seguido de pulsos de amplitud 30 % 3 min, 10 s on, 20 s off). Se adicionó DNAasa e inhibidor de proteasas Roche 1 x. Se centrifugó y el sobrenadante se filtró en filtros de 0.2 µM. Se concentró a la mitad utilizando un filtro para centrifuga Vivaspín de 10 mL y MWCO 3 KDa. Los extractos se separaron en geles de SDS PAGE y bidimensionales.

2D PAGE

Las muestras a analizar se purificaron y concentraron utilizando 2-D Clean-Up kit (GE Healthcare) y se resuspendieron en buffer de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 40 mM, IPG buffer pH 4–7 0.5%). Se llevó el volumen total de muestra a 250 µL con buffer de rehidratación y las muestras se cargaron por rehidratación pasiva durante 12 h en tiras de isoelectroenfoque de 7 cm (pH 4 - 7 lineal utilizando una cuba de rehidratación. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en una unidad Ettan IPGphor (Pharmacia), siguiendo los protocolos recomendados por GE para tiras de 7 cm. Se usó un gradiente de pH 4 - 7 y el siguiente perfil de voltaje: fase constante de 500 V 1 h, incremento lineal hasta 1000 V 1 h, incremento lineal hasta 8000 V 2 h 30 min y una fase final constante a 8000 V hasta alcanzar 5400 Vh. Previo a la segunda dimensión, se redujeron los puentes disulfuro y se alquilaron las cisteínas de las proteínas presentes en las tiras. Brevemente las tiras se incubaron 15 min en buffer de equilibración (Urea 6 M, Tris-HCl 75 mM pH 8.8, glicerol 29.3% SDS 2% azul de bromofenol 0.002% suplementado con DTT 10 mg/mL como agente reductor) y luego se alquilaron durante 15 min en buffer de equilibración suplementado con iodoacetamida (IAA) 25 mg/mL. La segunda dimensión se llevó a cabo en un gel SDS-PAGE al 12% utilizando una cuba de electroforesis Ruby SE 600 equipada con una unidad de enfriamiento Multitemp III, GE Healthcare termostatzada a 20 °C y una intensidad de corriente de 40 µA por gel. Los geles 2D se fijaron en 4 : 1 : 5 etanol : ácido acético : H₂O y se tiñeron con azul de Coomassie G-250 en etanol. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un scanner UMAX Power-Look 1120 y el software LabScan 5.0 (GE Healthcare).

Identificación de proteínas por MALDI/TOF-TOF

Los spots a identificar fueron cortados de geles de SDS PAGE manualmente, desteñidos con una solución de NH₄HCO₃ 0.1M en acetonitrilo (ACN) 50% (v/v) y digeridos con tripsina porcina modificada (grado secuenciación, Promega). La extracción de los péptidos se llevó a cabo en ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% (v/v) en ACN 60% durante 2h. Se evaporó el ACN utilizando un SpeedVac y las muestras se concentraron y desalaron utilizando micro

columnas de fase reversa C18 Zip Tip® (Merck, Millipore) previamente equilibradas con TFA 0.1%. La elución de los péptidos se llevó a cabo con solución de matriz consistente en ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, en ACN 60% y TFA 0.1% directamente en una placa Opti-TOF de 384 posiciones (Ab Sciex). La adquisición de los espectros se realizó en un espectrómetro de masa de tipo MALDI-TOF/TOF (4800 Analyzer Abi Sciex) operando en modo reflector positivo. Los espectros fueron calibrados externamente con una mezcla estándar de péptidos (Applied Biosystems). A partir de los espectros obtenidos (MS) se seleccionaron las señales más intensas para la obtención de espectros de fragmentación (MS/MS).

El procesamiento de datos se realizó con el software Data Explorer v4.9. (Applied Biosystems). Para el filtrado de las señales del espectro se utilizó un valor mínimo de relación señal/ruido de 25 para MS y 15 para MS/MS. Las búsquedas se llevaron a cabo con el motor de búsqueda Mascot (<http://www.matrixscience.com>) en el modo Sequence query, utilizando la base de datos del NCBI. Los parámetros de búsqueda fueron: Taxonomía no restringida; saltos de cortes de tripsina permitidos = 1; modificaciones parciales: oxidación de metionina y carbamidometilación de cisteínas; tolerancia de masa de péptidos = 0.05 Da y tolerancia MS/MS = 0.3 Da. Los valores de m/z utilizados corresponden a los valores monoisotópicos. Se consideró positiva la identificación de proteínas con un *Mascot protein score* estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y al menos una fragmentación asignada con un Mascot peptide ion score significativo ($p < 0.05$).

Estado de fosforilación de GlnA1 en condiciones de privación de nitrógeno

Con el fin de evaluar el estado de fosforilación de GlnA1 en condiciones de privación de nitrógeno nos basamos en el modelo previamente descrito por Jenkins y colaboradores (Jenkins, Robertson, and Williams 2012). Se utilizaron cultivos de *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 conteniendo un vector para la expresión inducible de GlnA1 unida a un tag de histidinas. Esta cepa se creció en medio Sauton suplementado con 1 mM (medio pobre en N) o 50 mM de nitrógeno (medio rico en N). Para el caso de los cultivos ricos en nitrógeno el medio consistió en 4 g de L-aspartato, 2 g de ácido cítrico, 0.5 g de K_2HPO_4 , 0.5

g de MgSO_4 , 0.05 g citrato de amonio férrico, 35 mL de glicerol y 2 mL de Tween 80 por litro de medio. En el caso de los cultivos en bajo nitrógeno, la composición del medio fue la misma pero el citrato de amonio férrico fue reemplazado por citrato férrico.

El contenido de amonio remanente en el medio se monitoreo periódicamente mediante el uso del kit AquaQuant (Sigma). La expresión de GlnA1 se indujo con isovaleronitrilo 500 μM , cuando los cultivos se encontraban a una DO de 0.2. El cultivo correspondiente al medio rico en nitrógeno se colectó 24 h después, en fase exponencial tardía (DO = 1). En este punto la concentración de nitrógeno remanente en el medio era 25 mM. El cultivo correspondiente a bajos niveles de nitrógeno demoró 48 horas más en alcanzar dicha densidad óptica. En este punto la concentración de nitrógeno del cultivo fue indetectable utilizando el kit antes mencionado. Se llevó a cabo la lisis de las bacterias por sonicación con microtip (ciclo 1: 15% amplitud 2 min, 10 s *on*, 20 s *off*; ciclo 2, 30 % amplitud 3 min, 10 s *on*, 20 s *off*). Este mismo lisado se sometió a agitación en presencia de perlas de vidrio (1.5 mL de perlas de vidrio para 5 mL de lisado, 10 minutos de agitación) en 5 mL buffer HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, glicerol 5%, inhibidor de proteasas y fosfatasa e imidazol 20 mM. Se centrifugó para remover los restos celulares y la purificación de la proteína recombinante se realizó utilizando columnas de IMAC His spin Trap (GE Healthcare). Se llevaron a cabo lavados en el buffer de lisis y la elución se realizó en este mismo buffer conteniendo 400 mM de imidazol. Las eluciones se corrieron en geles de poliacrilamida y a aquellas fracciones que presentaron proteína del peso molecular esperado para GlnA1 se les realizó un cambio de buffer en microcolumnas de exclusión molecular. Posteriormente la proteína fue concentrada en filtros de centrifuga de MWCO 10 kDa. La proteína purificada se corrió en geles de SDS PAGE y nativos, así como geles bidimensionales con el fin de analizar el estado de oligomerización y las distintas isoformas presentes en la muestra con la ayuda de la espectrometría de masa. Las bandas/spots generados procesaron como se describió anteriormente. Los mismos fueron separados y analizados mediante un nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masa de tipo ESI ion trap. Los datos generados se procesaron con el programa Patternlab, incluyendo la fosforilación en serina treonina y tirosina como modificaciones variables.

Sección FhaA

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

La cepa de *M. smegmatis* que sobreexpresa FhaA fusionada a Streptag (en lo sucesivo denominada *Msmeg_fhaA*), la que sobreexpresa su versión fosfoablative (*Msmeg_fhaAT_{116A}*) (aquella que sobreexpresa mScarlet-FhaA (denominada *Msmeg_mscarlet_fhaA*) y la cepa Control se obtuvieron como se describió anteriormente (Gil et al. 2019). Brevemente, se transformaron *M. smegmatis* mc (2) 155 electrocompetentes con un plásmido pLAM12 conteniendo la región codificante del gen Rv0020c (*fhaA* de *Mycobacterium tuberculosis*) fusionada a una etiqueta N-terminal (Streptag® II), o el gen Rv0020 portando una mutación por reemplazo de la Thr 116 por Ala, o el gen Rv0020 más la secuencia de la proteína fluorescente roja mScarlet (Bindels et al. 2017) en el extremo N terminal, siempre bajo el control del promotor acetamidasa de *M. smegmatis*. Como control se utilizó *M. smegmatis* mc (2) 155 transformada con una versión vacía del plásmido pLAM12 (control). Las cepas se mantuvieron en placas de agar Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado con ADC al 10 % (dextrosa 0.2 %, de albúmina sérica bovina 0.5 %, NaCl 0.085 %). Los cultivos líquidos se cultivaron a 37 °C y 220 r.p.m. de agitación en medio Middlebrook 7H9 (Difco) conteniendo 10 % de ADC y 0.05 % (v/v) de Tween 80®, hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 0.8. Todos los medios se suplementaron con kanamicina (50 µg/ml). La expresión de Streptag® II-FhaA se indujo mediante la adición de acetamida al 0.2 % durante la fase de crecimiento exponencial (DO₆₀₀ = 0.2). Para los análisis interactómicos, se prepararon cinco cultivos independientes de cada cepa.

Las cepas de *M. smegmatis* mc(2) 6 (cepa WT en este trabajo), mc(2) 6_ΔfhaA (*Msmeg_ΔfhaA*) y mc(2) 6_ΔfhaA_pMV306_fhaA (*Msmeg_ΔfhaA_fhaA*) fueron amablemente cedidas por el Dr. Raghunand Tirumalai (Viswantan et al, 2017). En la Tabla 1 se listan todas las cepas utilizadas en este trabajo.

Nombre	Cepa de <i>M. smegmatis</i>	Plásmido	Resistencia	Referencias
Control	mc(2) 155	pLAM12	Amp	Gil <i>et al.</i> , 2019
<i>Msmeg_fhaA</i>	mc(2) 155	pLAM12_fhaA	Amp/Kan	Gil <i>et al.</i> , 2019
<i>Msmeg_fhaAT_{116A}</i>	mc(2) 155	pLAM12_fhaAT _{116A}	Amp/Kan	-
<i>Msmeg_scarlett_fhaA</i>	mc(2) 155	pLAM12_scarlett_fhaA	Amp/Kan	Rossello <i>et al.</i> , 2025
WT	mc(2) 6	-	Amp	Viswanathan <i>et al.</i> , 2017
<i>Msmeg_ΔfhaA</i>	mc(2) 6	-	Amp/Hyg	Viswanathan <i>et al.</i> , 2017
<i>Msmeg_ΔfhaA_fhaA</i>	mc(2) 6	pMV306_fhaA	Amp/Hyg/Kan	Viswanathan <i>et al.</i> , 2017

Tabla 1: Descripción de las cepas utilizadas en esta sección.

Prueba de hidrofobicidad de superficie celular

La hidrofobicidad de superficie se cuantificó utilizando el método de adhesión microbiana a hidrocarburos (Rosenberg, Gutnick, and Rosenberg 1980). Para ello, los cultivos se partitionaron en un sistema bifásico de dos solventes de acuerdo a reportes previos (Rosenberg 2006). Brevemente, los cultivos en fase de crecimiento exponencial se lavaron y resuspendieron en PBS hasta una DO₆₀₀ final de 0.7. Se mezclaron con xileno en una proporción de 1:1 y se incubaron 15 min a temperatura ambiente para permitir el reparto. Se determinó la DO₆₀₀ remanente en la capa acuosa. El índice de hidrofobicidad se calculó como el porcentaje de absorbancia inicial de la capa acuosa retenida en la fracción de xileno después de la partición. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Ensayo de formación de biopelículas

El ensayo de formación de biopelículas en placa de microtitulación se realizó como se describió anteriormente (Rossello et al. 2017). Brevemente, 200 µL de cultivos bacterianos se cargaron en placas de 96 pocillos a una DO₆₀₀ inicial de 0.1 Se crecieron en forma estática a temperatura ambiente y se monitoreó la DO₆₀₀. La formación de biopelículas se evaluó cuando los cultivos de ambas cepas alcanzaron una DO₆₀₀ idéntica. Las biopelículas fueron teñidas con cristal violeta 0.1% en agua durante 15 min, se lavaron con agua y se

decoloraron en ácido acético al 30% durante 15 min. La capacidad de formación de biofilms se determinó a partir de la medición de la DO₅₇₀ del cristal violeta retenido. El ensayo se realizó por quintuplicado técnico y triplicado biológico.

Curva de crecimiento estático

Con el fin de garantizar que las diferencias observadas en la formación de biopelículas no se deban a diferencias en la biomasa final alcanzada, se registró una curva de crecimiento estática, con células cultivadas en las mismas condiciones utilizadas para los ensayos de biopelículas. Brevemente, se cargaron placas de 96 pocillos con tres cultivos independientes de cada cepa por quintuplicado y se incubaron a temperatura ambiente sin agitación. La DO₆₀₀ se midió una vez al día durante 10 días.

Microscopía de fluorescencia y análisis de imágenes

Cultivos en fase de crecimiento exponencial se incubaron con HADA 50 μ M durante 30 min a 37 grados y 220 rpm de agitación. Se cargaron 10 μ L de cada muestra en un portaobjetos de vidrio y se dejaron secar a 37 ° C. Se añadieron 10 μ L de sulforodamina-DHPE 10 μ g/mL y se dejó secar. Los portaobjetos se lavaron con una gota de metanol y se montaron en BSA al 10%. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal de barrido láser Zeiss LSM 880, equipado con un objetivo de inmersión en aceite plano-apocromático 63x/1.4. La adquisición de imágenes se realizó en modo *channel* con un tamaño de píxel de 0.105 μ m y una resolución de 256 x 256. La excitación de HADA se realizó con un láser de 405 nm y la luz emitida fue colectada en el rango entre 415 y 480 nm; la excitación con sulforodamina-DHPE se realizó utilizando un láser de 561 nm y la emisión de luz se colectó entre 580 y 620 nm. La excitación con mScarlet también se llevó a cabo utilizando un láser de 561 nm y la luz emitida fue colectada en el rango entre 570 y 655 nm.

Las imágenes se procesaron y analizaron utilizando el software Image J (Schindelin et al. 2015). Todas las mediciones de longitud celular se realizaron utilizando la señal de sulforodamina-DHPE; los otros parámetros calculados y graficados se obtuvieron de las señales HADA o mScarlet-FhaA.

Los focos de fluorescencia de HADA fueron detectados utilizando la herramienta *Find maxima* de Image J. La prominencia se configuró para detectar 2 focos (células no septadas) o 3 (células septadas) por cada célula en la cepa *Control*. Luego se aplicó la misma configuración a la cepa *Msmeg_fhaA*. Para fines comparativos y teniendo en cuenta las diferencias en la longitud celular, las distancias entre los focos HADA se expresaron como una fracción de la longitud total de la célula.

Para obtener el perfil de intensidad de fluorescencia de HADA de las cepas WT, *Msmeg_ΔfhaA* y *Msmeg_ΔfhaA_fhaA*, utilizamos ImageJ. Para ello se trazó una línea segmentada a lo largo del eje longitudinal de cada célula. La línea tiene un ancho de 10 píxeles, que corresponde a aproximadamente 1.06 μm, y una resolución espacial de 0.09 μm y abarca todo el ancho celular. Cada perfil se calcula como la intensidad promedio a lo largo del ancho de la línea. Para cada cepa, calculamos un perfil representativo normalizando las medidas respecto al largo celular y promediando los perfiles normalizados de todos los individuos. La posición e intensidad del septo y los polos para cada bacteria se obtuvo utilizando la función Scipy *findpeaks*. Finalmente se utilizó la posición del septo para seleccionar y alinear los polos viejos y nuevos, siendo el polo nuevo aquel posicionado más cerca del septo. Con el fin de determinar la caída en la intensidad del polo hacia el septo, consideramos 10 puntos de la curva de perfil y los ajustamos a un polinomio de primer orden ($f(x) = a(x) + b$). Consideramos la pendiente de la curva de ajuste (a) como el valor que representa el decaimiento. Los scripts de Python fueron generados por Maximiliano Anzibar. El análisis de los perfiles de fluorescencia de HADA de la cepa *Msmeg_mscarlet_fhaA*, se realizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Los perfiles de cada bacteria individual se normalizaron en longitud y se alinearon según su tipo de polo (viejo o nuevo). Esta clasificación nos permitió determinar la intensidad de fluorescencia de mScarlet-FhaA asociada con cada tipo de polo. Todas las comparaciones estadísticas entre cepas se realizaron utilizando ANOVA de una vía o Test de Student para datos distribuidos normalmente, y Kolmogorov-Smirnov (2 muestras) o Kruskal-Wallis (3 muestras) para datos distribuidos de manera no normal.

Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para el análisis por MET, las muestras se fijaron con 2.5 % de glutaraldehído y 4 % de formaldehído en tampón cacodilato 0.1 M (pH 7.2) durante 2 h. Posteriormente fueron fijadas durante 1 h en 1 % de OsO₄ con 2.5 % de ferrocianuro de potasio en el mismo tampón. Las muestras se deshidrataron en acetona y se embebieron en resina Polybed 812 (Polysciences). Se cortaron secciones ultrafinas (60 nm) y se tiñeron con 5 % de acetato de uranilo (40 min) y 2 % de citrato de plomo (5 min). La observación y adquisición de imágenes se realizó utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200 EX a 120 kV equipado con una cámara Megaview G2 CCD 1k. Estos ensayos fueron llevados a cabo por Ingrid Augusto.

Tomografía electrónica

Las muestras procesadas como se describió anteriormente para MET fueron seccionadas en series de 200 nm de espesor utilizando un ultramicrotomo PowerTome XL (RMC Boeckeler). Se colectaron en *grids* de cobre recubiertas con formvar, y luego se tiñeron con acetato de uranilo al 5% (p/v) y citrato de plomo. Como marcadores fiduciales durante la alineación de la serie inclinada se utilizaron partículas de oro coloidal de 10 nm (coloide de oro, Sigma-Aldrich). Finalmente, se colectó una serie de inclinación de un solo eje ($\pm 65^\circ$ con incrementos de 2°) utilizando un microscopio electrónico de transmisión Tecnai G2 F20 (Thermo Fisher Scientific) operando a 200 kV en modo MET, equipado con una cámara AMT CMOS 4K. Las series de inclinación tomográficas se procesaron utilizando el programa IMOD versión 4.9.13 (Universidad de Colorado, EE. UU.). Las proyecciones se alinearon mediante correlación cruzada. La alineación final se realizó utilizando partículas de oro fiduciales de 10 nm seguida de una reconstrucción ponderada por retroproyección. La segmentación manual, la representación de la superficie y el análisis del mapa de espesores se realizaron con el software Amira (Thermo Fisher Scientific). Estos ensayos fueron llevados a cabo por Ingrid Augusto.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las muestras se fijaron con glutaraldehído 2.5 % y formaldehído 4 % en solución tampón cacodilato 0.1 M pH 7.2 durante 2 h y luego se adhirieron a cubreobjetos tratados con poli-L-lisina. A continuación, se lavaron los cubreobjetos con tampón cacodilato de sodio 0.1 M y se incubaron durante 40 min en solución de OsO_4 al 1 % y ferrocianuro de potasio al 2.5 %. Después de tres rondas de lavado, las muestras fueron deshidratadas mediante incubación en una serie de concentraciones crecientes de etanol (30 - 100 %). Finalmente, las muestras fueron secadas a punto crítico en CO_2 líquido utilizando un aparato Leica EM CPD300. La pulverización se llevó a cabo en un aparato Quorum Q150V Plus, depositándose una capa de platino de 2 nm de espesor. La observación de las muestras se llevó a cabo con un microscopio electrónico de barrido FEG Quattro S (Thermo Fisher Scientific) operando a 5 kV. Estos ensayos fueron llevados a cabo por Ingrid Augusto.

Morfometría

Las mediciones morfométricas se realizaron con el programa Fiji/ImageJ (Schindelin et al. 2015). El espesor de la pared celular se determinó a partir de imágenes obtenidas de secciones ultradelgadas de MET, mientras que las mediciones del ancho celular se derivaron de imágenes de MEB. En las imágenes de MET se evaluó el espesor de la envoltura de dos regiones opuestas de cada célula, mientras que en las imágenes de MEB se midió el ancho celular en tres regiones (extremos y centro) de cada célula. La media de los valores se calculó en función de los datos obtenidos para 30 células por grupo experimental. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el método de Kolmogorov Smirnov (MET) o ANOVA de una vía (MEB), con un $p < 0.05$.

Tinción con LAURDAN, adquisición de imágenes y análisis por fasores espectrales

Cultivos en fase de crecimiento exponencial (DO_{600} : 0.8) se centrifugaron y se lavaron en tampón PBS. Los *pellets* fueron resuspendidos en 50 μl de LAURDAN-DMSO 0.05 mM en PBS y se incubaron a 37 °C y 220 rpm durante 2 h. Las bacterias vivas se montaron en parches de agarosa y se visualizaron utilizando un microscopio confocal de barrido láser espectral Zeiss LSM 880, equipado con un objetivo de inmersión en aceite plano-

apocromático 63x/1.4. La excitación de LAURDAN se realizó con un láser de 405 nm y la emisión se recopiló en modo *lambda*, en el rango de 418-718 nm, (en 30 canales, de 10 nm cada uno), y un canal adicional para luz transmitida. Las imágenes se adquirieron con una resolución de 256 x 256 píxeles y un zoom de 10 x (tamaño de píxel 0.05 x 0.05 μm ; tiempo de píxel 0.67 μs). Dado que el espectro de emisión de LAURDAN es sensible a la composición lipídica y la relajación dipolar, esta sonda se puede utilizar para evaluar la accesibilidad al agua en el entorno en el que está inmersa la sonda.

El análisis de fasores espectrales se llevó a cabo utilizando el módulo FLIM del software SimFCS 4 (www.lfd.uci.edu/globals). Brevemente, los espectros de emisión de LAURDAN de cada píxel se transforman en el espacio de Fourier y G y S, donde:

$$G = \frac{\int_0^T I(t) \cos(n\omega t) dt}{\int_0^T I(t) dt} \quad S = \frac{\int_0^T I(t) \sin(n\omega t) dt}{\int_0^T I(t) dt}$$

(que corresponden a las partes real e imaginaria del primer armónico de la transformada de Fourier) se utilizan como coordenadas x e y del gráfico fasorial, respectivamente. Cada píxel de la imagen está asociado con un fasor en el gráfico, y a cada fasor se le asigna un píxel en la imagen, con lo cual los píxeles con propiedades espectrales similares se agrupan en el gráfico. Mientras que la posición angular (Φ) del conjunto de píxeles proporciona información sobre el centro de masas del espectro de emisión, el ensanchamiento espectral se relaciona directamente con la posición radial (M).

Extracción de lípidos libres

La extracción de lípidos (incluidos los PIM y los mono y di-micolatos de trehalosa) se realizó de acuerdo con (Laneelle, Nigou, and Daffe 2015). Brevemente, se resuspendieron 800 mg de células húmedas en 8 ml de cloroformo:metanol en una proporción de 1 : 2. La extracción se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. Las células se recuperaron y se sometieron a una segunda y tercera extracción, utilizando una proporciones de cloroformo: metanol de 1 : 1 y 2 : 1 respectivamente. Los extractos se agruparon en tubos prepesados y se evaporaron hasta sequedad para determinar la cantidad de lípidos libres recuperados.

Cromatografía en capa fina (TLC)

Los lípidos obtenidos en la sección previa se resuspendieron en una mezcla 2:1 de cloroformo:metanol y se cargaron 5 µl en placas de sílice. Como fase móvil se utilizó n-hexano:acetato de etilo en proporciones 95:5. Las placas se secaron, se rociaron con 10% CuSO₄ en 8% ácido fosfórico y se carbonizaron para su visualización. Estos ensayos fueron llevados a cabo por Marina Forrellad.

Análisis de lípidos totales mediante MALDI TOF-TOF

Los lípidos extraídos con el método previamente descrito se analizaron mediante espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF-TOF. Brevemente, 1 µL de muestra se cargó directamente en placas MALDI, utilizando una matriz consistente en DHB 10 µg/mL en acetonitrilo 60% y ácido fórmico 0.1%. Los espectros se adquirieron en un espectrómetro de masa de tipo MALDI TOF/TOF 4800 (Abi Sciex) operado en modo reflector positivo y se utilizó una mezcla estándar de péptidos para la calibración externa (Applied Biosystems). El procesamiento de datos se realizó con el software Data Explorer v4.9. (Applied Biosystems). Las estructuras lipídicas se asignaron buscando valores m/z en la base de datos de Lipidomics Gateway de LIPID MAPS® (http://www.lipidmaps.org/tools/ms/Mtb_batch_bulk.html) con una tolerancia de masa de 0.05 Da.

Ensayo de permeabilidad al Bromuro de Etidio

El ensayo de permeabilidad al Bromuro de Etidio (BrEt) se llevó a cabo de acuerdo a Viswanathan *et al*, 2017. Brevemente, cultivos en fase de crecimiento exponencial fueron lavados con buffer KH₂PO₄ 50 mM pH 7, MgSO₄ 5mM y resuspendidos a una DO₆₀₀ de 0.5, pre-energizados por 5 minutos con 0.4% de glucosa y cargados en placas de fluorescencia de 96 wells. El BrEt se adicionó a una concentración final de 20 µM, y las medidas se llevaron a cabo a 37 °C en un lector de placas Varioskan (λ_{ex} :530 nm, λ_{em} : 590 nm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1. GlnA1

Producción de GlnA1 y PknG recombinantes en *Escherichia coli*

GlnA1

Con el fin de caracterizar a GlnA1 como sustrato de PknG, se llevó a cabo la producción y purificación de ambas proteínas recombinantes conteniendo un tag de Histidinas en *E. coli*. La purificación de GlnA1 se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC), y las eluciones se realizaron con gradiente de imidazol (5 - 500 mM) (Figura 20A). Se recogieron fracciones en el curso de la elución y para aquellas correspondientes a la región del cromatograma donde existe señal UV (280 nm), se tomaron alícuotas de 20 μ L que fueron separadas en geles de SDS-PAGE (Figura 20B). En base a la intensidad de la banda en estos geles, se eligieron las fracciones que serían sometidas al próximo paso de purificación (A6 a A12; B7 a B12), que consistió en una cromatografía de exclusión molecular (SEC) (Figura 21A). El volumen de elución de GlnA1 corresponde a una forma multimérica (monómero de GlnA1: 53.5 KDa), según la curva reportada por el fabricante de la columna (Figura 21B). Las fracciones colectadas entre los 60 y 90 mL de elución se unieron y concentraron en filtros de centrifuga, según se indica en materiales y métodos. Se obtuvieron 400 μ L de proteína, a una concentración de 10 mg/mL, correspondientes a 15 μ M de dodecámero.

Con el fin de confirmar el estado de oligomerización de GlnA1, la proteína obtenida se sometió a análisis mediante dispersión dinámica de luz (DLS: *dynamic light scattering*). (Figura 22A). Se llevó a cabo un *screening* de 20 buffers distintos y al cabo de 24 h se determinó que la proteína producida se encontraba en un estado de oligomerización homogéneo independientemente de los buffers, condiciones de pH y salinidad evaluados. El análisis por DLS en una solución de 20 mM MES pH6 300 mM NaCl indica que, en estas condiciones, la forma predominante en la muestra posee un radio hidrodinámico de 6.8 nm, sugiriendo que la proteína no se encuentra en estado monomérico.

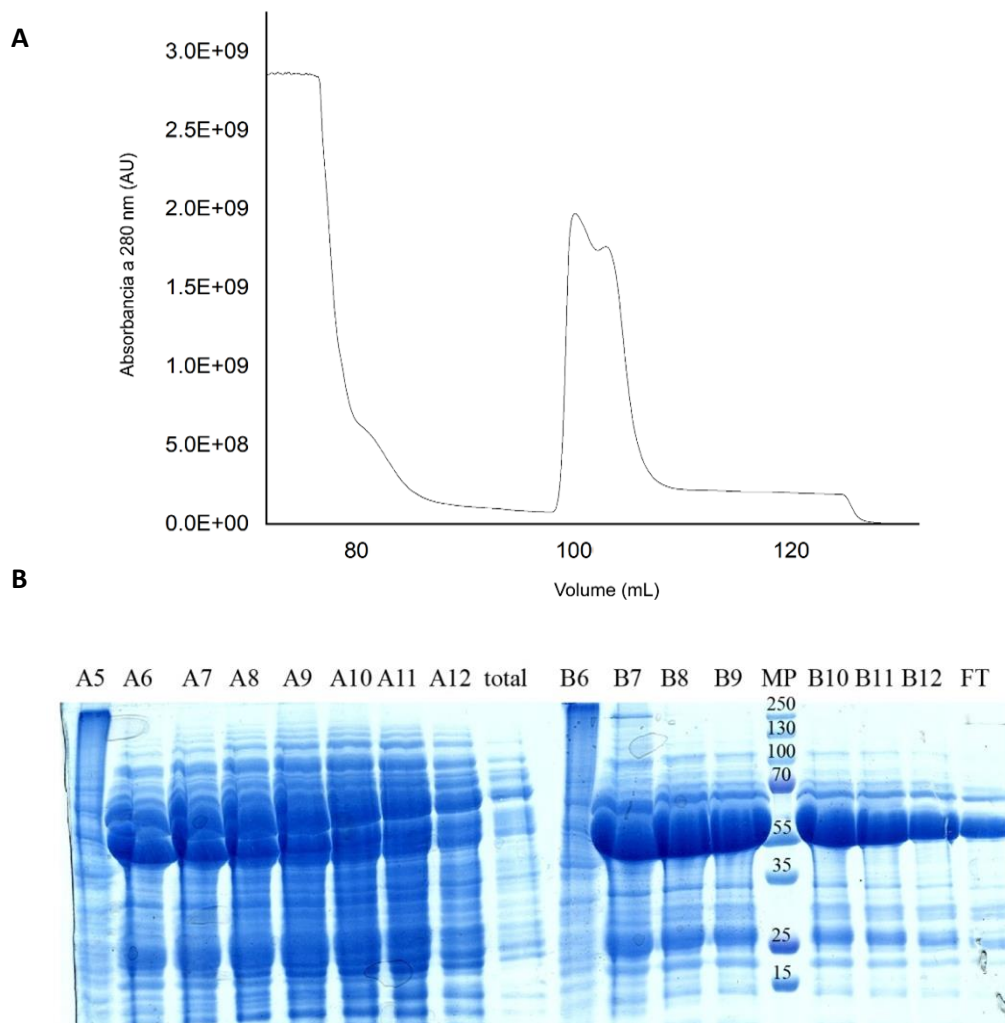


Figura 20: Purificación de GlnA1 recombinante mediante IMAC. (A) Perfil cromatográfico de la elución de la columna de IMAC, monitoreada mediante absorbancia UV. La elución de proteína recombinante se da entre las fracciones A5 a A12 y B12 a B6. (B) SDS PAGE de las eluciones A5 a A12 y B12 a B6. Se puede ver una banda que se corresponde con la masa molecular esperada para la proteína recombinante. Total: extracto total. FT: *Flow through*.

En paralelo la proteína se sometió a análisis mediante geles de PAGE nativa (Figura 22B). En la misma se observó una banda correspondiente a un peso molecular entre 480 y 720 kDa. En concordancia con la SEC y el DLS, los resultados obtenidos sugieren que GlnA1 se expresa mayoritariamente en su forma dodecamérica (Masa molecular teórica para el

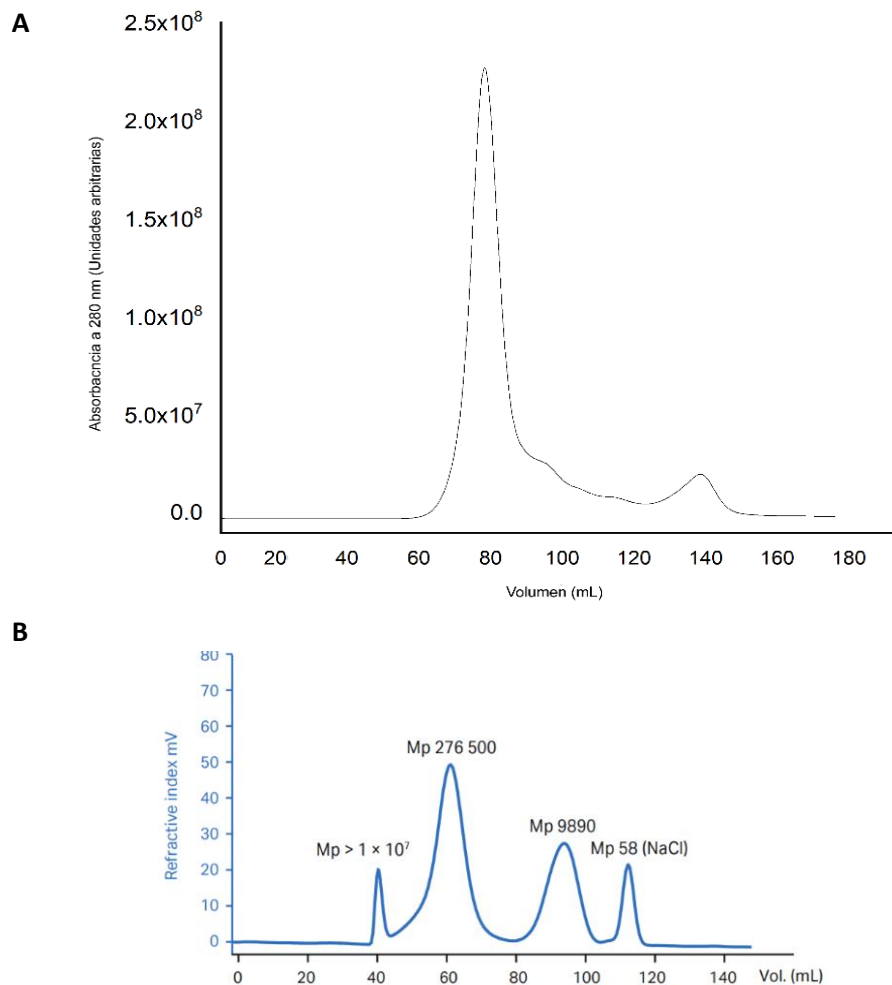


Figura 21: Purificación de GlnA1 recombinante mediante SEC. (A) Perfil cromatográfico de la elución de la columna de SEC monitoreada mediante absorbancia a 280 nm. La elución de proteína recombinante se da entre los 60 y 90 mL. (B) Cromatograma reportado por el fabricante de la columna donde se observa el volumen de retención para proteínas standard de distintos tamaños moleculares.

dodecámero: 642.84 KDa), que corresponde a la forma activa de la enzima. La identidad de la proteína presente en la banda se confirmó mediante espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF/TOF, donde se corroboró la presencia de 10 péptidos correspondientes al 29 %

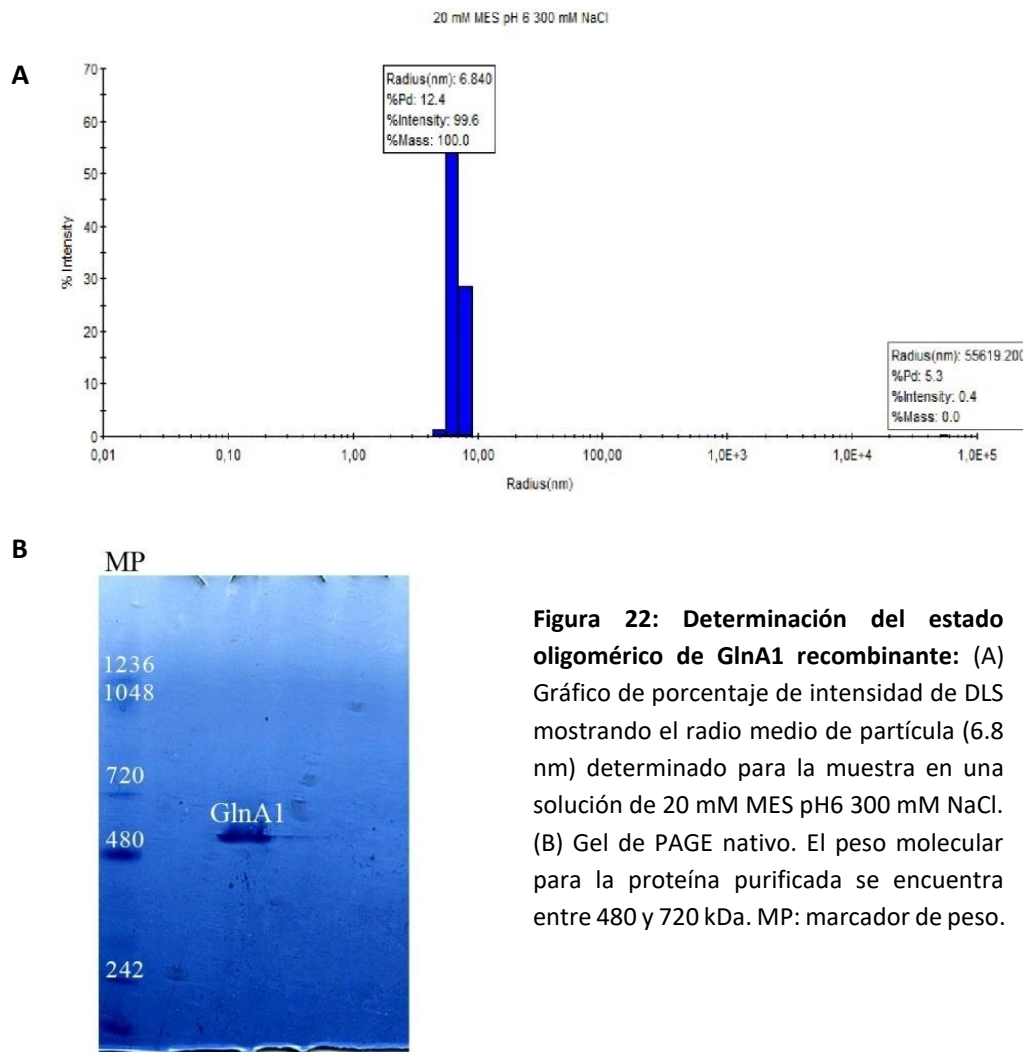
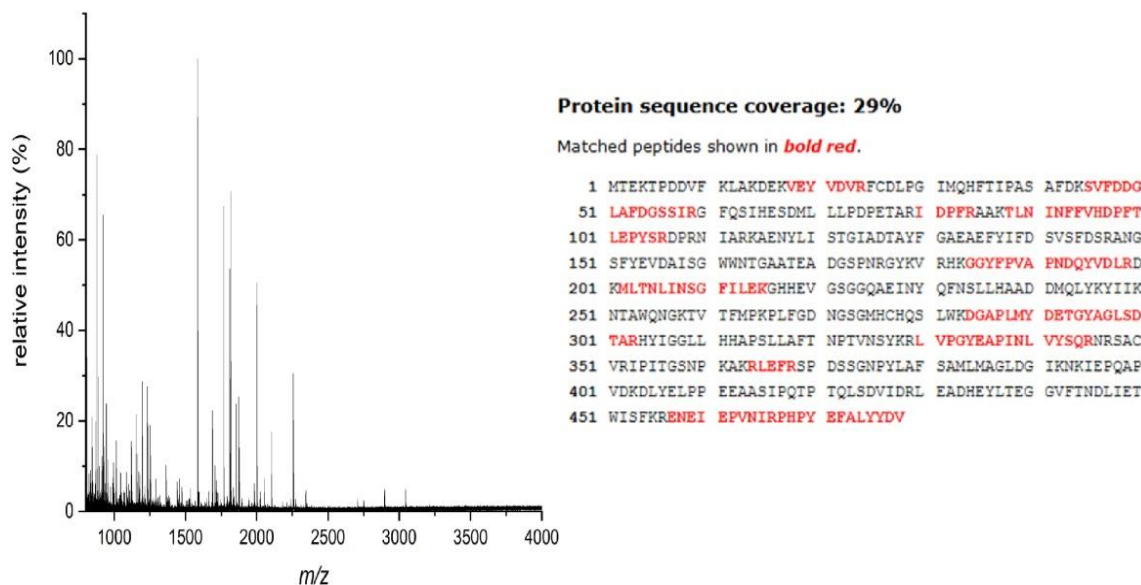


Figura 22: Determinación del estado oligomérico de GlnA1 recombinante: (A) Gráfico de porcentaje de intensidad de DLS mostrando el radio medio de partícula (6.8 nm) determinado para la muestra en una solución de 20 mM MES pH6 300 mM NaCl. (B) Gel de PAGE nativo. El peso molecular para la proteína purificada se encuentra entre 480 y 720 kDa. MP: marcador de peso.

de la secuencia. En la Figura 23A se observa el espectro obtenido, así como la cobertura de secuencia determinada a través de la búsqueda llevada a cabo con el motor de búsqueda Mascot. Con el fin de ampliar la confirmación de secuencia los péptidos tripticos obtenidos a partir de la digestión en gel de la banda se analizaron mediante nano-LC-MS/MS (Figura 23B). La comparación con bases de datos de los espectros obtenidos permitió corroborar el 85.4% de la secuencia.

A



B

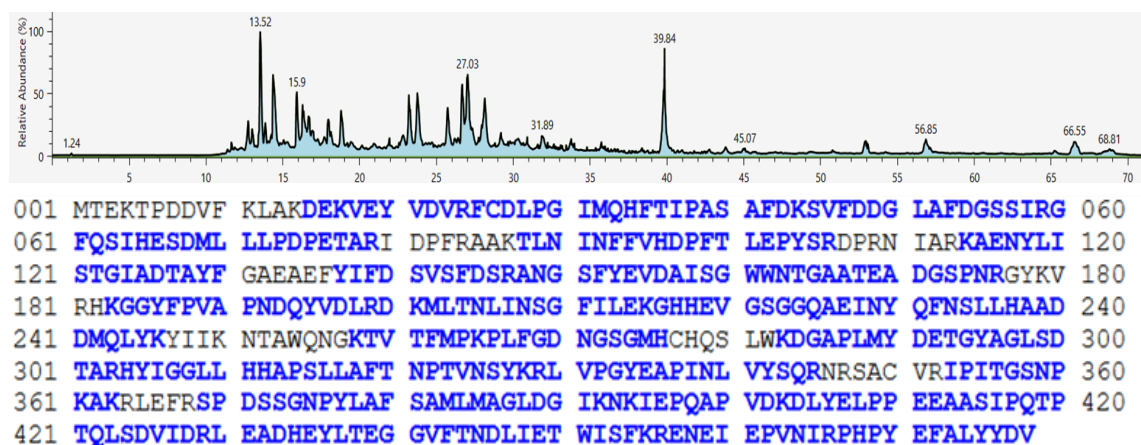


Figura 23: Confirmación de identidad de GlnA1 recombinante: (A) Izq: Espectro de MALDI-TOF/TOF de los péptidos trípticos obtenidos a partir de GlnA1 recombinante. Der: Asignación de los valores de m/z a péptidos de la secuencia de GlnA1 utilizando el motor de búsqueda Mascot. Los péptidos asignados se observan en rojo. (Cobertura de secuencia 29%). (B) Cromatograma y péptidos identificados para GlnA1 mediante nano-LC-MS/MS. Los péptidos asignados a GlnA1 de forma estadísticamente significativa por búsqueda en base a datos se muestran en azul. La cobertura de secuencia obtenida fue de 85.4%.

PknG

La purificación de PknG, al igual que la de GlnA1 se llevó a cabo mediante IMAC como se describió en materiales y métodos. Se recogieron fracciones en el curso de la elución y de aquellas donde existía señal a 280 nm (A7 a C11) se tomaron alícuotas para su separación en geles de SDS-PAGE (Figura 24). Las fracciones conteniendo proteína del peso molecular esperado para PknG (82.6 KDa) se unieron y sometieron a digestión con TEV y luego fueron concentradas en filtros de centrifuga para su inyección en una columna de exclusión molecular. Se tomaron alícuotas de las fracciones eluidas de la columna de exclusión molecular y se corrieron en geles de SDS-PAGE (Figura 25). Las fracciones E8-F5 se unieron y fueron concentradas. Se obtuvieron 2.5 mL de una solución con una concentración de PknG de 13.3 mg/mL.

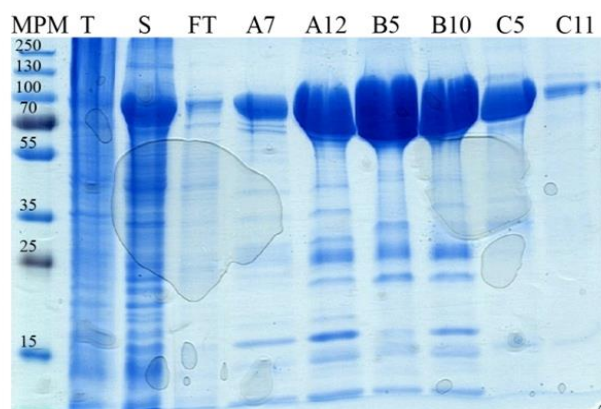


Figura 24: Purificación de PknG recombinante mediante IMAC. SDS PAGE de las eluciones A7 a C11. Se puede ver la acumulación de proteína recombinante en la zona de peso molecular correspondiente a PknG. MPM: Marcador de peso molecular; T: total; S: sobrenadante; FT: *flow through*.

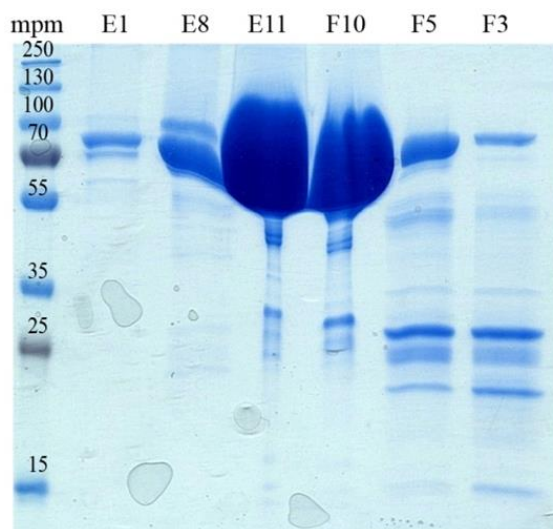


Figura 25: Purificación de PknG recombinante mediante SEC. SDS PAGE de las eluciones E1 a F3. Se puede ver la acumulación de proteína recombinante en la zona de peso molecular correspondiente a PknG. MPM: Marcador de peso molecular.

Evaluación de GlnA1 como sustrato de PknG: Ensayos de fosforilación *in vitro*

Nuestros resultados previos sugieren que GlnA1 es sustrato de PknG. Con el fin de confirmarlo, e identificar el/los residuos fosforilados llevamos a cabo ensayos de fosforilación *in vitro*. Se incubaron GlnA1 y PknG recombinantes durante 30 min en condiciones de fosforilación (ver materiales y métodos). Como control negativo se incubó GlnA1 en las mismas condiciones, pero sin PknG. Se ensayaron distintas relaciones enzima:sustrato, se digirieron las muestras y se procesaron para su análisis. Los sitios de fosforilación se mapearon por nano-LC-MS/MS mediante el uso del programa *Sequest* (Figura 26). El análisis bioinformático de los datos permitió demostrar que GlnA1 es efectivamente un sustrato de PknG *in vitro*, incluso a relaciones de concentración enzima:sustrato tan bajas como 1:150. Se identificaron inequívocamente tres péptidos fosforilados, dos de ellos en la región N-terminal de la enzima. El análisis de los péptidos trípticos permitió detectar dos iones con valores de m/z 833.4 y 1168.2, correspondientes a iones

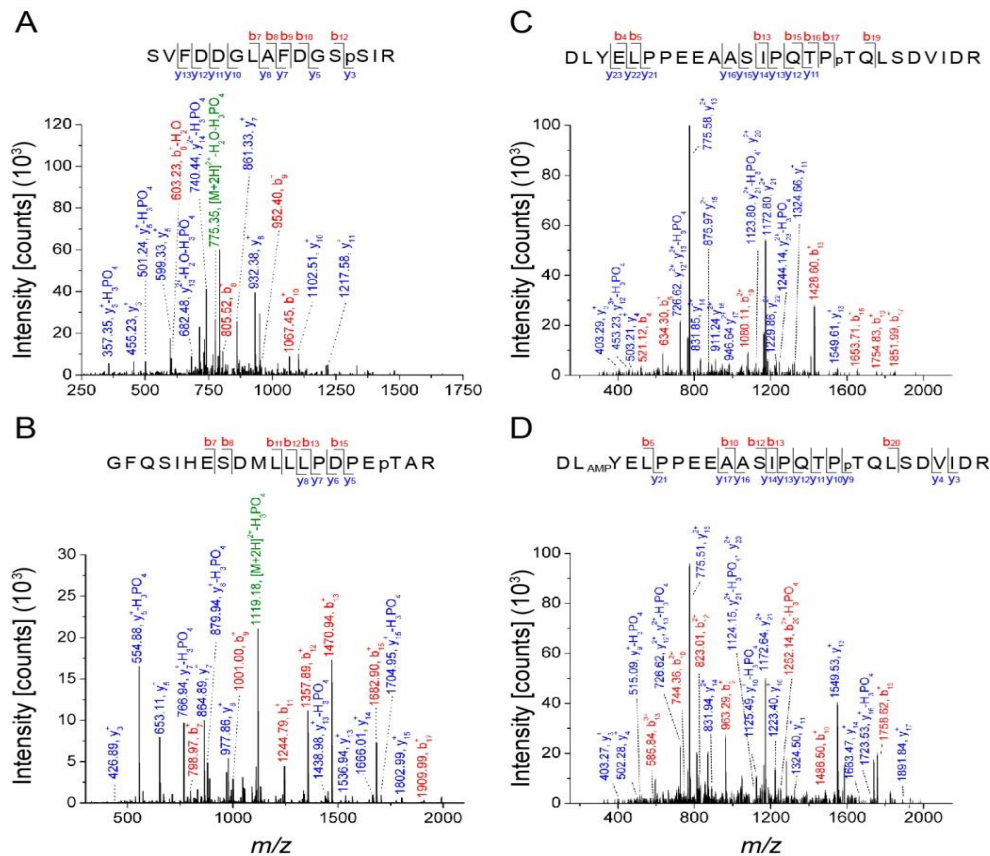


Figura 26: Identificación de los sitios de fosforilación de GlnA1: Los iones asignados a la secuencia de GlnA1 se encuentran resaltados en rojo (N-terminal) y azul (C-terminal).
 (A) Espectro de MS/MS del péptido 45-SVFDDGLAFDGSpS₅₇IR-59.
 (B) Espectro de MS/MS del péptido 60-GFQSIHESDMLLLPDPET₇₇AR-79.
 (C) Espectro de MS/MS del péptido 404-DLYELPPEEAASIPQTPT₄₂₁QLSDVIDR-429.
 (D) Espectro de MS/ME del péptido 404-DLampYELPPEEAASIPQTPT₄₂₁QLSDVIDR-429.

doblemente cargados de péptidos fosforilados comprendidos entre los residuos 45-59 (secuencia SVFDDGLAFDGSSIR, Xcorr 4.82; pRS score 114; pRS site probability 99.8%) y 60-79 (secuencia GFQSIHESDMLLLPDPETAR, X corr 4.34; pRS score 100; pRS 100%), respectivamente. Dentro de estos péptidos, los residuos Ser57 (Figura 26A) y Thr77 (Figura 26B) se identificaron como residuos específicamente fosforilados por PknG. Mientras que la Thr77 se ubica expuesta al solvente y relativamente alejada del sitio activo, la Ser57 encuentra muy cerca de la interfase de oligomerización y del sitio activo de la enzima (Figura 27). Cabe destacar, que si bien la detección de estos fosfopéptidos, así como la

identificación de los residuos fosforilados fue inequívoca, el porcentaje de péptidos fosforilados respecto a su contraparte nativa fue variable pero siempre muy bajo en los distintos ensayos de fosforilación.

Dados estos resultados, resulta tentador especular que la fosforilación de Ser57 podría interferir con la unión al sustrato y/o la oligomerización de GlnA1. Por otra parte, en los ensayos de fosforilación se identificó sistemáticamente un tercer fosfopéptido, correspondiente a un ion triplemente cargado con un valor de m/z de 993.1 (residuos 404-429, secuencia DLYELPPEEAASIPQTPtQLSDVIDR) (Figura 26C). Dentro de esta secuencia se detectó a la Thr421 como el residuo portador de la fosforilación (X corr 4.06; pRS score 58, pRS site probability 90.5%) (Figura 26C). Curiosamente, la Thr421 es cercana en las estructuras primaria y terciaria de la proteína, al residuo conservado Tyr406, cuya adenilación es un mecanismo bien conocido para la modulación de la actividad enzimática de GlnA1 (Mehta et al. 2004). De hecho, nuestros resultados muestran que la fosforilación de esta secuencia puede ocurrir sola o en combinación con la adenilación de la Tyr406 (m/z 1101.9, secuencia DLampYELPPEEAASIPQTPtQLSDVIDR), lo que sugiere que ambos residuos podrían tener funciones reguladoras (Figura 26D). En este sentido, existen ensayos fosfoproteómicos previos que reportan la fosforilación de GlnA1 *in vivo* en su extremo N-terminal, incluida la fosforilación de la Ser57 observada por nosotros. Los sitios de fosforilación reportados se asignaron a Ser56 o Ser57 en el caso de la secuencia 45-SVFDDGLAFDGSSIR-59 y a Ser63 o Ser67 en el caso de la secuencia 60-GFQSIHESDMLLLPDPETAR-79 (Carette et al. 2018). Interesantemente, estos autores no encontraron diferencias en el estado de fosforilación de estos péptidos cuando se inhiben PknA y PknB, lo cual apunta a que otras quinasas deben ser responsables de estos eventos de fosforilación.

En base a este conjunto de resultados, nos planteamos como objetivo, evaluar el efecto de la fosforilación sobre la actividad enzimática.

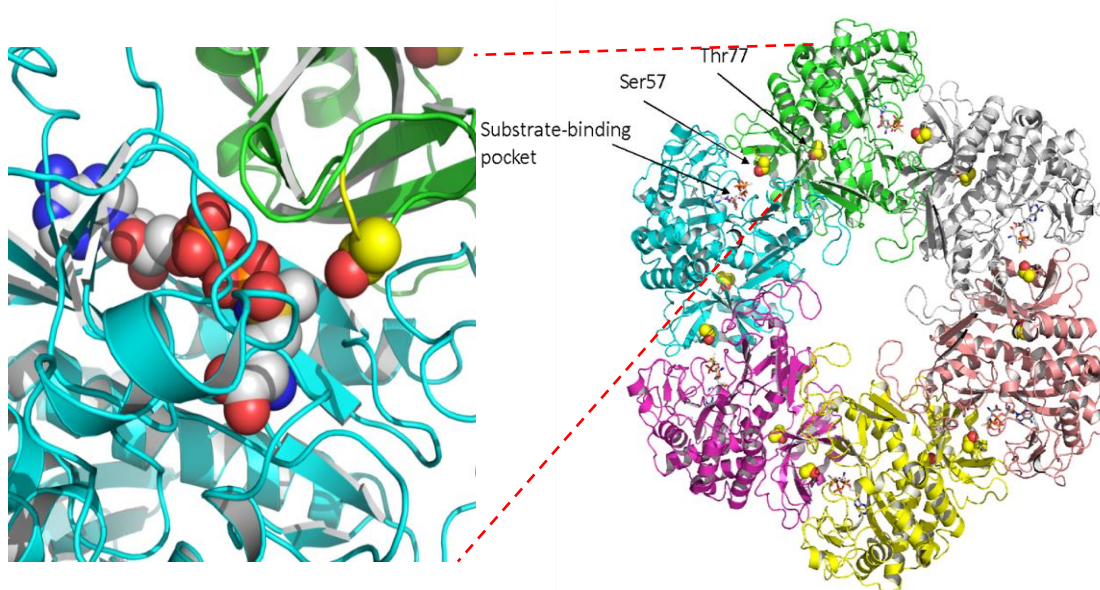


Figura 27: Estructura del protómero de GlnA1 y localización de los sitios de fosforilación en la estructura de GlnA1. La estructura se representó en forma de *cartoon* y se utilizaron distintos colores para cada monómero. Los residuos fosforilados y el sitio activo de la enzima se encuentran representados por esferas. A la izquierda se observa la vista ampliada de la interfase entre dos monómeros, resaltando la proximidad del residuo de Ser 57 al sitio activo de la enzima y la interfase de oligomerización. Imagen cortesía de Natalia Lisa.

Generación de los mutantes fosfomimético y fosfoablativo de la Serina 57 de GlnA1

Como aproximación para evaluar el posible rol de los residuos fosforilados sobre la actividad de GlnA1, se generaron los mutantes fosfomimético y fosfoablativo en el residuo Ser57. Elegimos este residuo para realizar la mutagénesis debido a su proximidad al sitio activo de la enzima. Dado que la fosforilación por PknG es sub-estequiométrica e involucra una pequeña fracción de las moléculas de GlnA1, la generación del mutante fosfomimético representaría una aproximación a una condición donde 100% de la proteína se encuentra fosforilada mientras que el mutante fosfoablativo representa la condición que se encuentra imposibilitada para actuar como sustrato de Ser/Thr quinasas. En el caso de la versión fosfomimética la serina fue reemplazada por glutamato (SxE) mientras que en la versión

fosfoablativa el reemplazo se dio por alanina (SxA). Ambas construcciones se clonaron en el mismo vector que la versión WT, y la purificación se realizó en idénticas condiciones. Las figuras 28 y 29 muestran los perfiles cromatográficos obtenidos durante la purificación por IMAC para los mutantes fosfoablativo y fosfomimético respectivamente.

En el caso del mutante SxA se utilizaron las fracciones A11 a C12 para su purificación por SEC. En el caso del mutante SxE, las fracciones utilizadas para la SEC fueron la A9-C2. El perfil cromatográfico de ambos mutantes se observa en la figura 30.

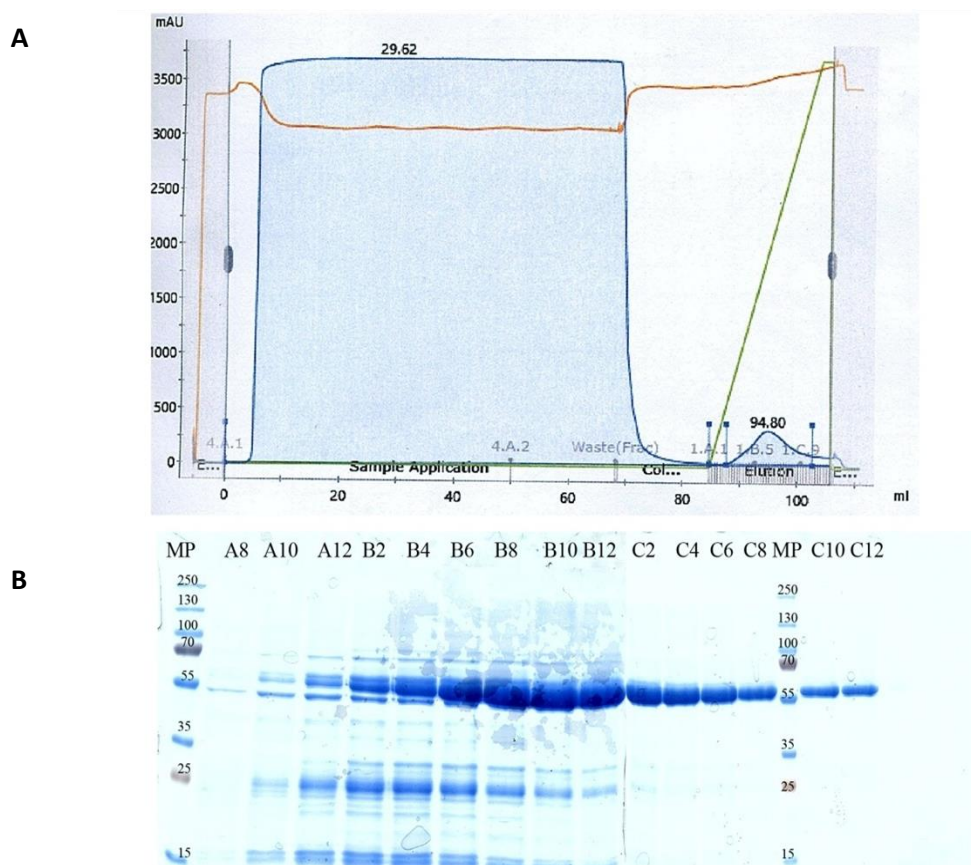


Figura 28: Purificación de SxA recombinante mediante IMAC. (A) Perfil cromatográfico de la elución de la columna de IMAC, monitoreada mediante absorbancia UV. La elución de proteína recombinante se da entre las fracciones A11 a C12 MP: Marcador de peso. (B) SDS PAGE de las eluciones A8 a C12. Se puede ver la acumulación de proteína recombinante en la zona de peso molecular correspondiente a GlnA1.

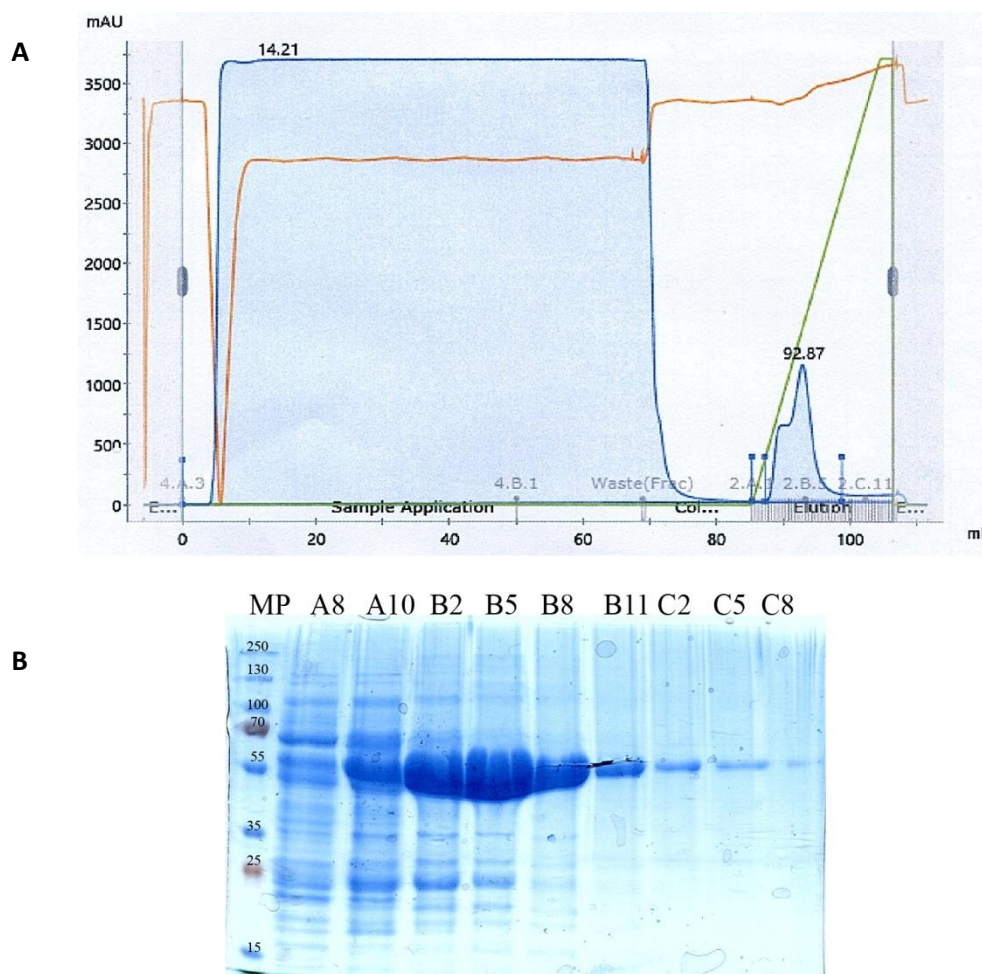


Figura 29: Purificación de SxE recombinante mediante IMAC. (A) Perfil cromatográfico de la elución de la columna de IMAC, monitoreada mediante absorbancia UV. La elución de proteína recombinante se da entre las fracciones A9 a C2. MP: Marcador de peso. (B) SDS PAGE de las eluciones A8 a C8. Se puede ver la acumulación de proteína recombinante en la zona de peso molecular correspondiente a GlnA1.

La identidad de la proteína purificada, así como la presencia de las mutaciones introducidas fueron confirmadas mediante espectrometría de masa de tipo MALDI TOF-TOF. En particular, el ion monocargado de m/z 1585.7 correspondiente a la secuencia SVFDDGLAFDGSSIR de la GlnA1 nativa (Figura 31A), no se detecta en las mutantes puntuales generadas, observándose en cambio una nueva señal de m/z 1627.7 en el caso del mutante

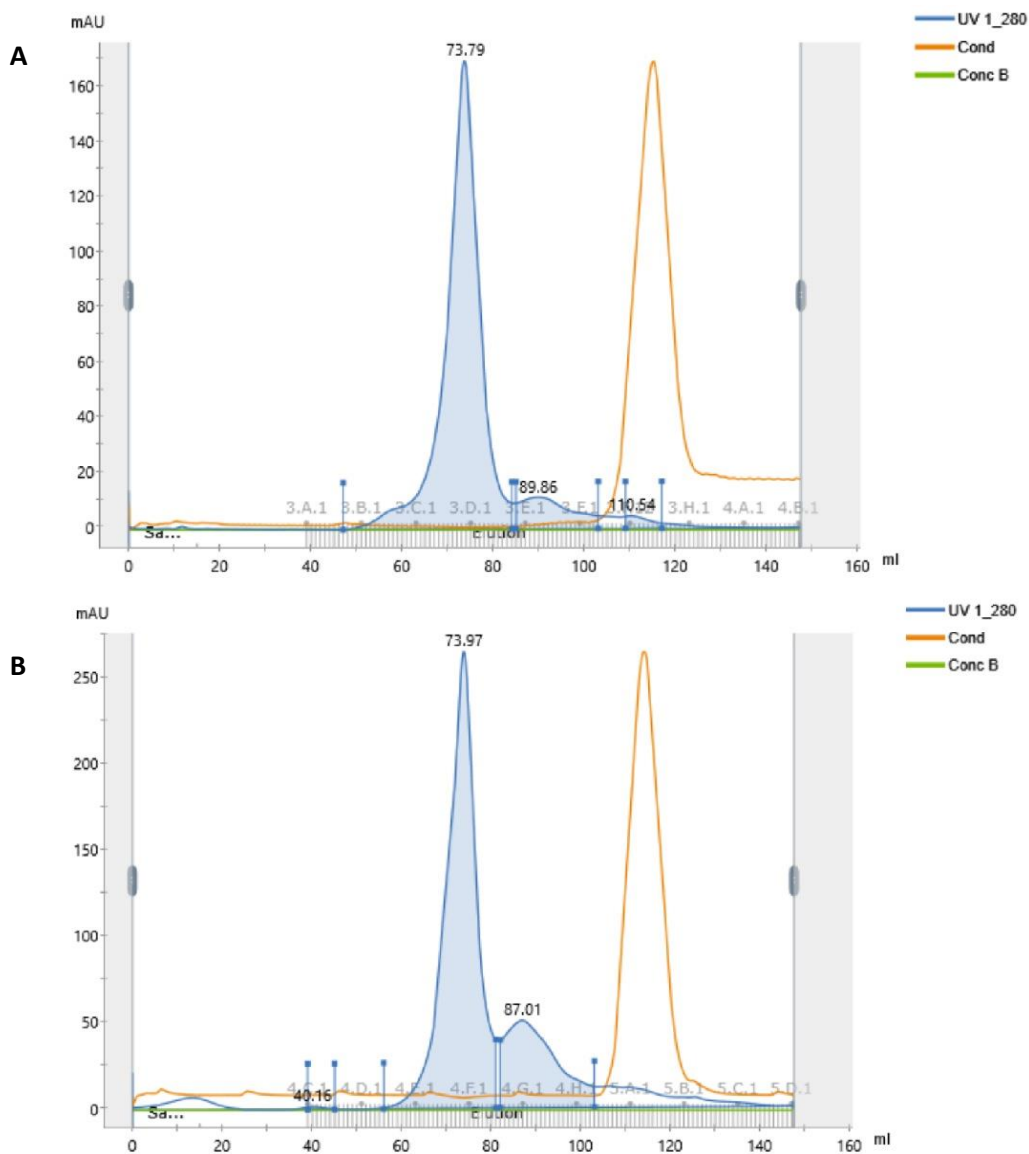


Figura 30: Purificación de SxA y SxE recombinante mediante SEC. Perfil cromatográfico de la elución de la columna de SEC monitoreada mediante absorbancia UV. La elución de proteína se da entre los 60 y 80 mL. (A) Elución de SxA. (B) Elución de SxE.

SxE, (correspondiente a la secuencia SVFDDGLAFDGSEIR Figura 31B, y de m/z 1569.7 en el caso de la mutante SxA (correspondiente a la secuencia SVFDDGLAFDGSAIR, Figura 31 C).

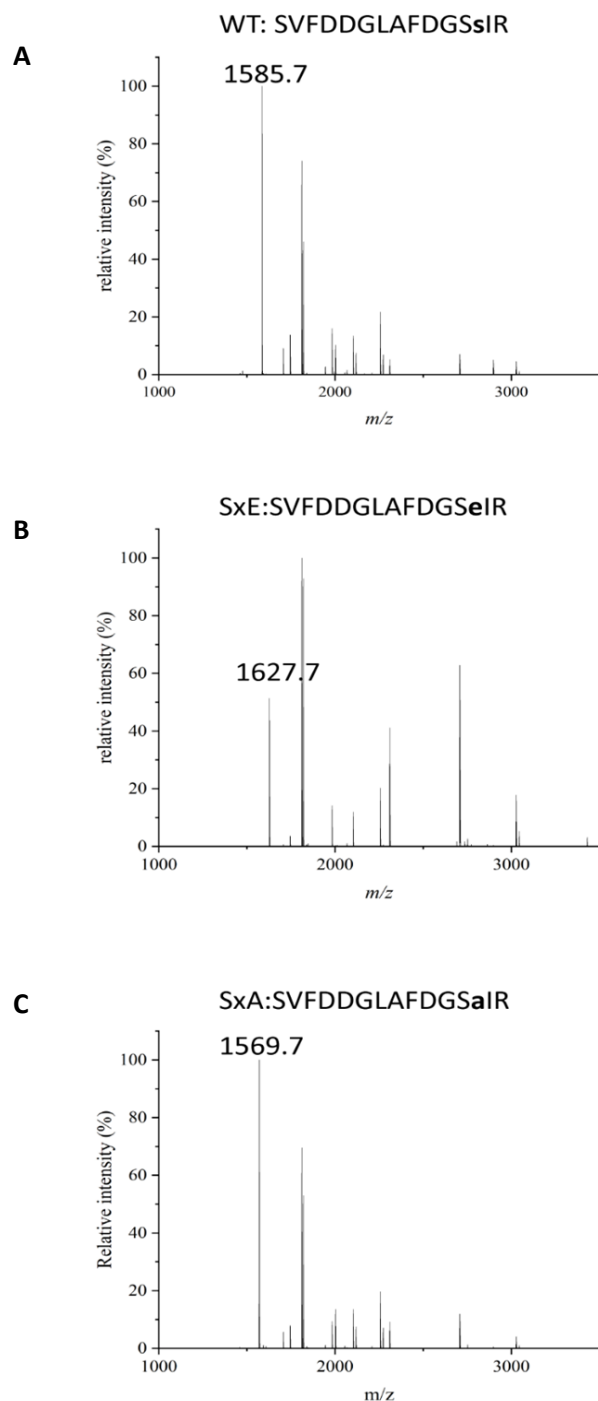


Figura 31: Confirmación de mutaciones fosfomimética y fosfoablativa de GlnA1 recombinante: Espectros de MS de los péptidos tripticos obtenidos a partir de la purificación de GlnA1. (A) Espectro correspondiente a la isoforma salvaje de GlnA1. La señal con un m/z de 1585.7 corresponde a la secuencia SVFDDGLAFDGSSIR. (B) Espectro correspondiente al reemplazo S57E. La señal con un m/z de 1627.7 corresponde a la secuencia SVFDDGLAFDGSEIR. (C) Espectro correspondiente al reemplazo S57A. La señal con un m/z de 1569.7 corresponde a la secuencia SVFDDGLAFDGSaIR.

Con el fin de determinar el estado de oligomerización de la proteína recombinante producida para los mutantes fosfomimético y fosfoablativo, se corrieron geles de PAGE nativos (Figura 32). Como control positivo de oligomerización, se utilizó la GlnA1 salvaje recombinante, cuyo estado de oligomerización había sido previamente caracterizado por PAGE nativa y dispersión dinámica de luz. Mediante este análisis pudimos determinar que las isoformas recombinantes producidas se encuentran en estado dodecamérico. Las bandas de este gel fueron recortadas y su identidad confirmada mediante espectrometría de masa de tipo MALDI TOF/TOF.

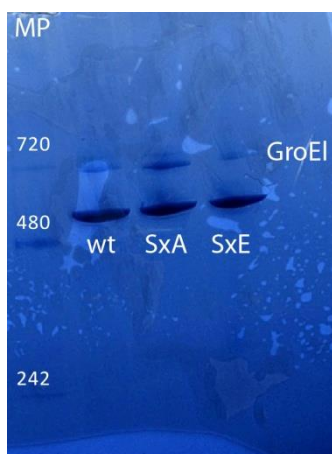


Figura 32: Determinación del estado oligomérico de los mutantes fosfoablativo y fosfomimético recombinantes: Gel de PAGE nativo. El peso molecular de las proteínas purificadas se encuentra entre 480 y 720 kDa, consistentemente con el peso molecular del dodecámero. Masa molecular del dodecámero para la proteína wt 642.8 kDa (MP: marcador de peso).

Efecto de la fosforilación de GlnA1 sobre la actividad enzimática

Luego de confirmar a GlnA1 como sustrato de PknG, decidimos evaluar si la fosforilación de GlnA1 afecta en manera alguna su actividad. Para ello analizamos la actividad glutamina sintetasa en condiciones de fosforilación, utilizando como control negativo la mezcla de fosforilación sin PknG. (ver materiales y métodos sección “ensayos de fosforilación”). Como primera aproximación, optimizamos el ensayo de detección de fosfato inorgánico que

permite medir actividad enzimática a través de la cuantificación del fosfato inorgánico liberado en la hidrólisis de ATP. Utilizando un estándar de fosfato inorgánico (Pi) se logró observar una respuesta lineal entre la concentración de Pi y la señal espectrofotométrica a tiempo final (Figura 33).

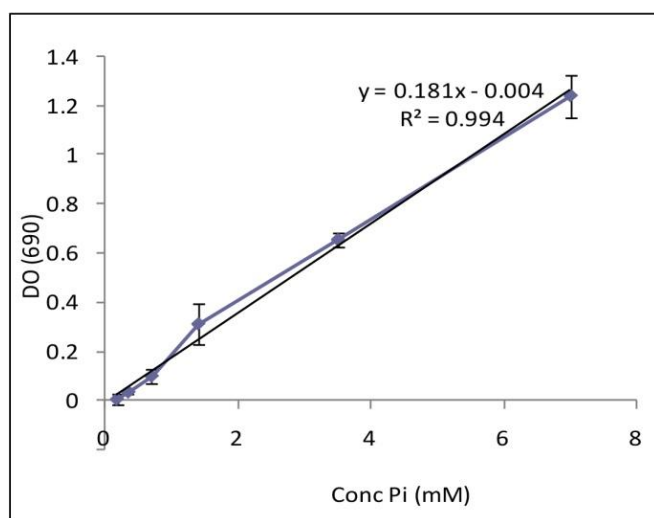


Figura 33: Optimización de las condiciones para detección de actividad glutamina sintetasa mediante el método de fosfomolibdato. El gráfico muestra la relación entre densidad óptica a 690 nm y la concentración de estándar de fosfato inorgánico (Pi). Se puede observar una respuesta lineal. El gráfico muestra el promedio y DE para 3 experimentos independientes. En negro se muestra el ajuste lineal y su ecuación correspondiente.

Si bien esta metodología permitió cuantificar cantidades de fosfato inorgánico del orden de nanomoles, en nuestro sistema no fue posible observar cambios en la actividad enzimática como consecuencia de la fosforilación por PknG. Se ensayaron distintas relaciones enzima sustrato y condiciones de incubación, sin éxito. Sin embargo, pudimos determinar que nuestro ensayo poseía una limitación, debido a que la mezcla de fosforilación generaba interferencia con el desarrollo de color. Sin embargo, si fue posible utilizar esta metodología para evaluar el impacto de las mutaciones puntuales en la actividad enzimática de la glutamina sintetasa. Los resultados obtenidos muestran que ambos mutantes, fosfomimético y fosfoablativo, presentan diferencias significativas en la actividad enzimática evaluada ($p < 0.05$) (Figura 34).

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la Ser57 para la actividad enzimática, reforzando el posible rol de su fosforilación en la regulación de la enzima. Con el fin de evaluar el efecto de la fosforilación en la actividad enzimática optimizamos un segundo ensayo de actividad, más robusto. Para ello elegimos el método, basado en la catálisis de la reacción de glutamina con hidroxilamina para dar glutamil-hidroxamato.

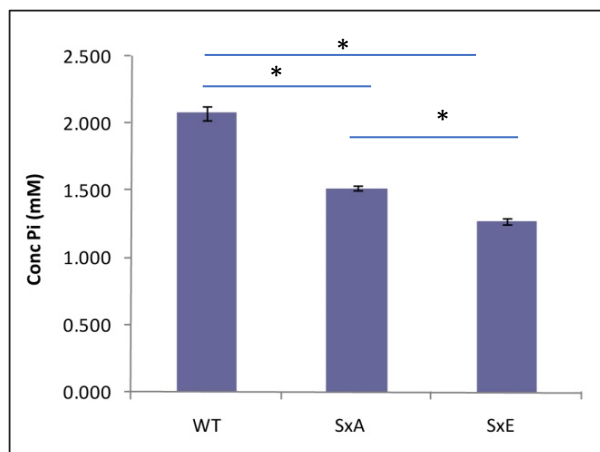


Figura 34: Actividad enzimática de los mutantes fosfoablativo (SxA) y fosfomimético (SxE) en la Ser 57, determinadas a través del método de fosfato inorgánico (Pi) El gráfico muestra que ambos mutantes exhiben una reducción de la actividad enzimática estadísticamente significativa en comparación con la cepa salvaje (wt). El gráfico es el resultado del promedio para 3 experimentos independientes. Las barras muestran el DE. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) por ANOVA de una vía.

Con el fin de optimizar la cantidad de enzima y tiempo de reacción ideales para llevar a cabo el ensayo y determinar en qué punto ocurre la saturación de la señal, se analizó la variación de la absorbancia a 490 nm en relación a la concentración de GlnA1 y así como la variación en la absorbancia en función del tiempo de reacción para una concentración de enzima fija (Figura 35). La curva absorbancia vs concentración de GlnA1 se realizó utilizando concentraciones entre 0.1 y 5 nM de la proteína dodecamérica y tomando las medidas a los 10 minutos de reacción. En estas condiciones la respuesta es lineal (Figura 35B). Por otra parte, la curva absorbancia vs tiempo se realizó a partir de los 5 min, a intervalos de 10 min hasta los 55, utilizando una concentración de GlnA1 fija, de 1 nM. En estas condiciones, la saturación ocurre a partir de los 45 min de reacción. A partir de dichas curvas, se determinó que los ensayos serían realizados a una concentración de GlnA1 de 1 nM y las medidas serían tomadas a los 10 y 20 minutos.

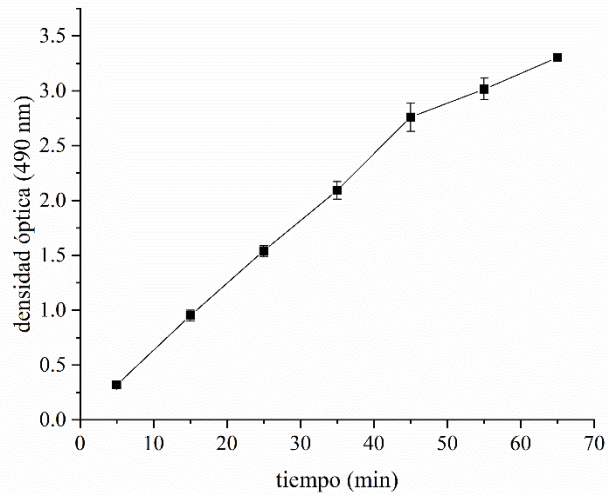
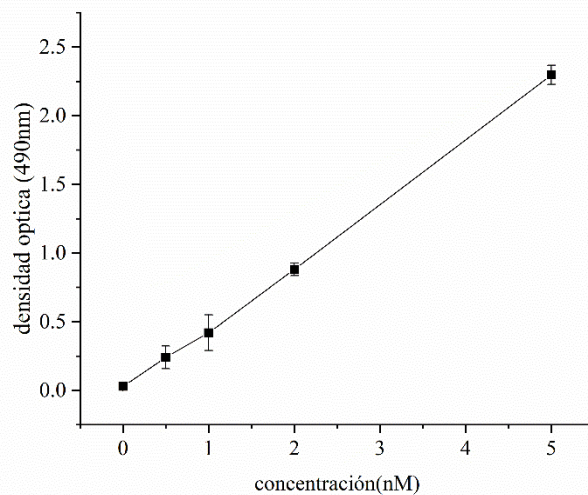
A**B**

Figura 35: Optimización de las condiciones para detección de actividad glutamina sintetasa mediante el método de γ -glutamihidroxamato. (A) Densidad óptica en función del tiempo para una concentración de enzima de 1 nM. La función es lineal hasta los 45 min de reacción. Se muestran el promedio y DE para 3 réplicas biológicas (B) Densidad óptica en función de la concentración de GlnA1 para un tiempo de reacción de 10 min. La función es lineal para todas las concentraciones evaluadas. Se muestran el promedio y DE para 3 réplicas biológicas.

Si bien este protocolo es altamente reproducible y nos permitió detectar concentraciones de glutamil hidroxamato de orden nanomolar, no pudimos detectar cambios estadísticamente significativos en la actividad enzimática como consecuencia de la fosforilación de GlnA1 (Figura 36).

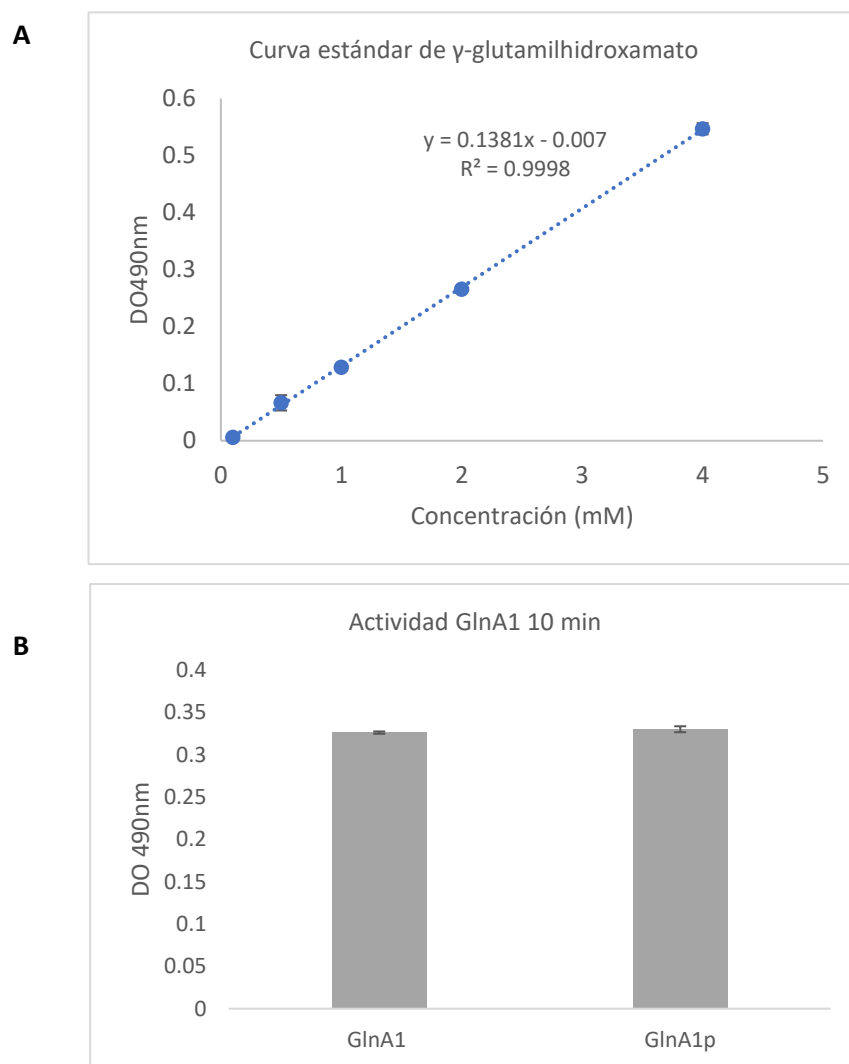


Figura 36: Efecto de la fosforilación sobre la actividad de GlnA1 (A) Curva estándar de a partir de la cual es posible estimar la concentración de γ -glutamihidroxamato producido por la actividad GlnA1. La misma es resultado de dos experimentos independientes. Se observa el promedio de los mismos y la DE. (B) Efecto de la fosforilación en la actividad enzimática de GlnA1 determinada a través del método γ -glutamihidroxamato. Los gráficos muestran las formas fosforiladas (GlnA1p) y no fosforilada (GlnA1) exhiben actividades enzimáticas comparables (ensayo de 10 min de duración). El gráfico muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden a la DE. El mismo resultado se obtuvo usando 20 minutos de reacción.

Cabe destacar, como mencionamos anteriormente, que en nuestras condiciones de trabajo las moléculas de GlnA1 fosforiladas representan una pequeña proporción respecto al total. Una posible explicación para esta baja estequiometría de fosforilación es que el residuo de Ser57 se encuentra poco expuesto en el dodecámero debido a que forma parte de la interacción entre monómeros, dejando abierta la posibilidad de que *in vivo* la fosforilación pueda ocurrir en un paso previo a la oligomerización, o que otros factores celulares participen en la desestabilización del oligómero. Por esto consideramos importante corroborar por este método los resultados obtenidos previamente para los mutantes fosfomimético y fosfoablativo como aproximación para evaluar el posible rol de estos residuos fosforilados sobre la actividad de GlnA. Los resultados obtenidos muestran que tanto el mutante fosfomimético (SxE) como el fosfoablativo exhiben una disminución significativa en la actividad respecto a la forma nativa de GlnA1 (Figura 37). Estos resultados no permitieron sacar conclusiones en cuanto al rol de la fosforilación en la modulación de la actividad, pero confirman que la S57 es un aminoácido fundamental en la catálisis, ya que su reemplazo genera una disminución en la actividad enzimática.

Fosforilación de GlnA1 *in vivo*

En línea con los resultados anteriores, realizamos la búsqueda de fosforilación endógena de GlnA1 en *M. smegmatis*. Para esto se generaron extractos totales de *M. smegmatis*, se separaron en geles bidimensionales y se recortó la zona de peso molecular correspondiente a GlnA1 (Figura 38). En este sentido, nuestro grupo de trabajo había identificado previamente la existencia de varias isoformas de GlnA1 en extractos de *M. tuberculosis* (Gil et al, 2019) en la zona de peso molecular comprendida entre 40 y 55 kDa mediante 2D DIGE. La digestión de proteínas y la extracción de péptidos se llevó a cabo como se detalla en materiales y métodos.

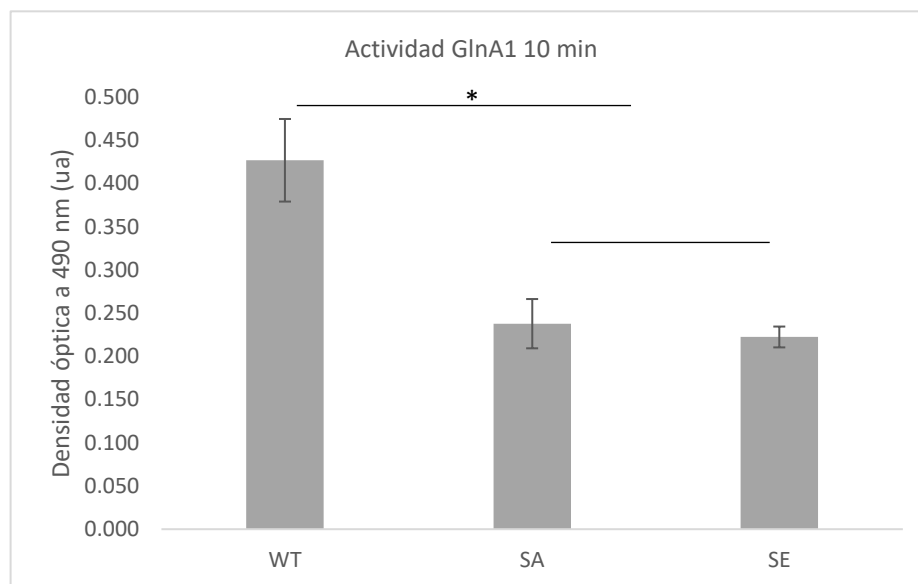
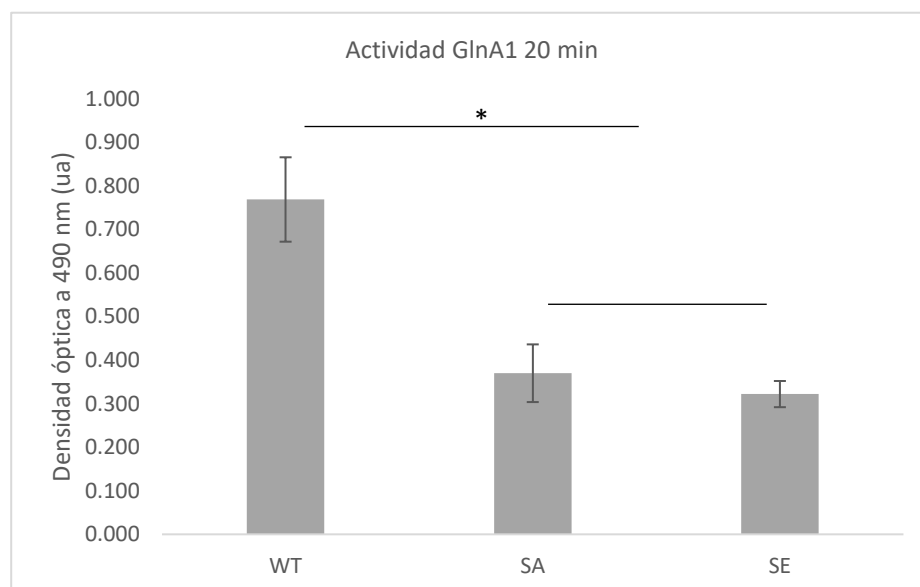
A**B**

Figura 37: Actividad enzimática de los mutantes fosfoablatoivo (SxA) y fosfomimético (SxE) en la Ser 57, determinadas a través del método γ -glutamihidroxamato. Los gráficos muestran que ambos mutantes exhiben una reducción de la actividad enzimática estadísticamente significativa en comparación con la cepa salvaje (wt). (A) Densidad óptica a los 10 minutos de reacción, 1 nM de enzima. (B) Densidad óptica a los 20 minutos de reacción, 1 nM de enzima.

Los gráficos corresponden al promedio de 4 ensayos independientes. Las barras de error corresponden al DE. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa determinada mediante test de ANOVA ($p < 0.05$).

La identidad de las proteínas contenidas en dichos spots fue determinada mediante nano-LC-MS/MS y búsqueda en bases de datos. Como motor de búsqueda se utilizó el programa *Sequest*, incluyendo la fosforilación en Ser, Thr y Tyr como modificaciones variables. Si bien se observaron varios péptidos correspondientes a GlnA1, no se recuperaron péptidos fosforilados para esta enzima (Ver Tabla 2). Cabe destacar que ninguno de los tres péptidos detectados por nosotros como sustratos de PknG *in vitro* fue detectado en esta aproximación, ni en estado nativo ni fosforilado, con lo cual no es posible descartar que los mismos se encuentren fosforilados *in vivo*. Dado que en estas condiciones no fue posible identificar sitios de fosforilación en GlnA1 *in vivo*, pensamos que estos eventos podrían ocurrir con una frecuencia baja, que requiera un paso previo de enriquecimiento, o en condiciones de crecimiento particulares, por ejemplo, en respuesta al stress encontrado por la bacteria en el interior del hospedero. Dado que GlnA1 es una enzima central en el metabolismo del nitrógeno consideramos apropiado comparar su estado de fosforilación en condiciones de alto y bajo nitrógeno. Para ello implementamos el modelo de deprivación previamente descrito por Jenkins y colaboradores (Jenkins et al. 2012), utilizando una cepa de *M. smegmatis* que expresa GlnA1 bajo el control de un promotor inducible.

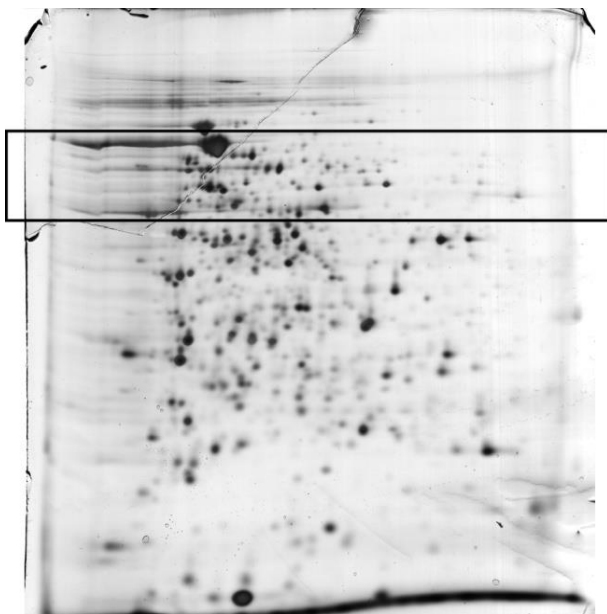


Figura 38: Búsqueda de fosforilación endógena de GlnA1 mediante 2D y espectrometría de masa. Se recortó la zona de peso molecular indicada en la figura. Las proteínas presentes en la muestra se digirieron y analizaron mediante LC-MS/MS. No se hallaron péptidos fosforilados en las condiciones de trabajo. Gradiente pH 4 -7.

Secuencia	Modificaciones	XCorr	Carga	MH+ [Da]	Salto de tripsina
INGTFYEVDSESGWWNTGEPFESDGSANR		5.87	3	3252.1805 2	0
FNTLLAAADDVLLFK		5.69	2	1652.2266 1	0
GHHEVG TAGQAEIN YK		5.23	2	1711.1929 2	0
DGQPLFHDESGYAGLSDIAR		4.68	3	2149.0222 5	0
LIKDENVEYVDIR		4.34	3	1606.7621 8	1
LVPGYEAPINLVYSQR		4.15	3	1819.5538 1	0
IPITGNNPK		2.64	1	953.46191	0
cPDSSGNPYLAFAAmLmAGIDGIKK	C1(Carbamidomethyl); M15(Oxidation); M17(Oxidation)	6.81	3	2659.6479 2	1
cPDSSGNPYLAFAAmLmAGIDGIK	C1(Carbamidomethyl); M15(Oxidation); M17(Oxidation)	6.77	3	2531.1012 9	0
cPDSSGNPYLAFAAMLmAGIDGIKK	C1(Carbamidomethyl); M17(Oxidation)	6.46	3	2644.4904 5	1
GHHEVG TAGQAEIN YK		5.19	2	1711.2290 1	0
IPITGNNPK		2.6	1	953.5979	0
LIKDENVEYVDIR		4.61	3	1606.7537 6	1
HYIGILHHAPSLAFTNPTVNSYK		6.5	3	2751.2321 5	0
GGYFPVAPYDHYVDLR		4.11	2	1870.2561 5	0
DGQPLFHDESGYAGLSDIAR		4.87	2	2148.5542 5	0
TLNMNFFVHDPFTR		4.5	2	1738.7839 8	0
LVPGYEAPINLVYSQR		5.17	2	1818.7078 1	0
INGTFYEVDSESGWWNTGEPFESDGSANR		5.73	3	3252.2457	0
FNTLLAAADDVLLFK		6.58	3	1650.9019 5	0
LEEDHEYLTEGGVFTEDLIETWISYK		5.89	3	3117.1559 8	0
KAENYLASTGIADTAFFGAEEFYIFDSVSFDSK		7.71	3	3711.3196 8	1
cPDSSGNPYLAFAAMLmAGIDGIKK	C1(Carbamidomethyl)	5.78	2	2627.5247 1	1
cPDSSGNPYLAFAAMLmAGIDGIK	C1(Carbamidomethyl)	6.19	3	2499.2636 4	0
cPDSSGNPYLAFAAmLmAGIDGIKK	C1(Carbamidomethyl); M15(Oxidation); M17(Oxidation)	6.4	3	2660.2767 1	1
cPDSSGNPYLAFAAmLmAGIDGIK	C1(Carbamidomethyl); M15(Oxidation); M17(Oxidation)	7.38	3	2532.2226 3	0
cPDSSGNPYLAFAAMLmAGIDGIK	C1(Carbamidomethyl); M17(Oxidation)	5.2	3	2516.1111 8	0
FcDLPGVVQHFSIPASAFDES VFEDGLAFDGSSVR	C2(Carbamidomethyl)	7.59	3	3803.8073 5	0
GGYFPVAPYDHYVDLRDQmATNLQNAGFTLER	M19(Oxidation)	4.76	3	3675.9528 5	1

DQmATNLQNAGFTLER	M3(Oxidation)	5.43	2	1824.7485 8	0
LVPGYEAPINLVYSQR		4.6	2	1818.6311 5	0
LIKDENVEYVDIR		3.73	2	1606.3575 9	1
INGTFYEVDSESGWWNTGEPFESDGSANR		4.75	3	3251.8077 1	0
FNTLLAAADDVLLFK		6.88	3	1650.9144	0
cPDSSGNPYLAFAAmLmAGIDGIK	C1(Carbamidomethyl); M15(Oxidation); M17(Oxidation)	7.02	2	2531.5864 7	0

Tabla 2: Lista de péptidos de GlnA1 presentes en el gel de la Figura 38, detectados mediante nano-LC-MS/MS. La lista detalla todos los péptidos endógenos encontrados para GlnA1 en el gel 2D. No se detectaron péptidos fosforilados.

Fosforilación de GlnA1 *in vivo* en condiciones de privación de nitrógeno

Para poder llevar a cabo el análisis del estado de fosforilación de GlnA1 recombinante *in vivo* generamos una cepa de *M. smegmatis* portadora de un plásmido de expresión, conteniendo la secuencia de GlnA1 de *M. tuberculosis* fusionada a una cola de histidinas y un péptido HA, bajo el control de un promotor inducible. La cepa resultante se creció en medio Sauton pobre o rico en nitrógeno, (1mM o 50mM respectivamente). El contenido de amonio presente en el medio se monitoreo periódicamente mediante el uso del kit AquaQuant (Sigma).

La inducción de la expresión se realizó en fase de crecimiento exponencial temprana (DO=0.2). Para los cultivos ricos en nitrógeno las bacterias se colectaron 24 h después, en fase exponencial tardía (DO=1), punto en que la concentración de nitrógeno remanente en el medio era 25mM, (a esta concentración los niveles de N aún se consideran altos). En el caso de los cultivos pobres en nitrógeno, dado que el crecimiento de los mismos fue sensiblemente más lento, las bacterias alcanzaron la fase exponencial tardía a las 72 hs. En este punto la concentración de nitrógeno del cultivo fue indetectable utilizando el kit antes mencionado.

Los extractos generados para ambas cepas se sometieron a purificación por IMAC y la proteína recuperada se analizó mediante SDS PAGE. Lamentablemente, en condiciones de

deprivación de nitrógeno no se observó inducción de GlnA1, con lo cual no obtuvimos proteína para el análisis bajo esta condición, como lo evidencia la ausencia de bandas en el gel de SDS PAGE (Figura 39). Este resultado no resulta totalmente inesperado, ya que GlnA1 es una enzima involucrada en la asimilación de nitrógeno, y es posible que en estas condiciones de crecimiento la célula sea capaz de generar mecanismos para controlar sus niveles de expresión. También resulta probable que la ausencia de proteína recombinante sea consecuencia de la limitación nutricional.

Para los cultivos crecidos en condiciones de alto nitrógeno la identidad de las bandas observadas se confirmó mediante espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF/TOF. De las tres bandas observadas sólo una corresponde a GlnA1 (Figura 39).

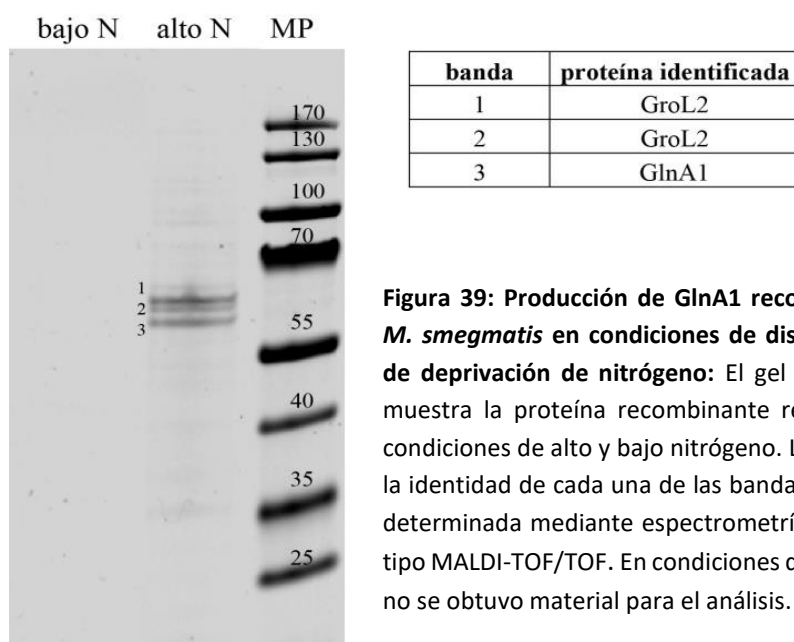


Figura 39: Producción de GlnA1 recombinante en *M. smegmatis* en condiciones de disponibilidad y de deprivación de nitrógeno: El gel de SDS PAGE muestra la proteína recombinante recuperada en condiciones de alto y bajo nitrógeno. La tabla indica la identidad de cada una de las bandas observadas, determinada mediante espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF/TOF. En condiciones de deprivación no se obtuvo material para el análisis.

Las distintas isoformas presentes en la muestra se analizaron mediante geles bidimensionales (Figura 40). Se observaron 7 spots, los cuales se cortaron, se realizó la digestión y extracción de péptidos y los mismos fueron separados y analizados mediante un nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masa con una trampa iónica como analizador de masa. Los datos generados se procesaron con el programa Patternlab, incluyendo la fosforilación en Ser Thr y Tyr así como la adenilación en Tyr como modificaciones variables.

Sólo 2 spots corresponden a isoformas de GlnA1. Los spots 6 y 7 se identificaron como GlnA1, con coberturas de secuencia de 30% y 36% respectivamente. Los péptidos asignados para cada spot se muestran en la Tabla 3. Desafortunadamente, en las condiciones utilizadas no pudimos confirmar los sitios de fosforilación *in vivo*.

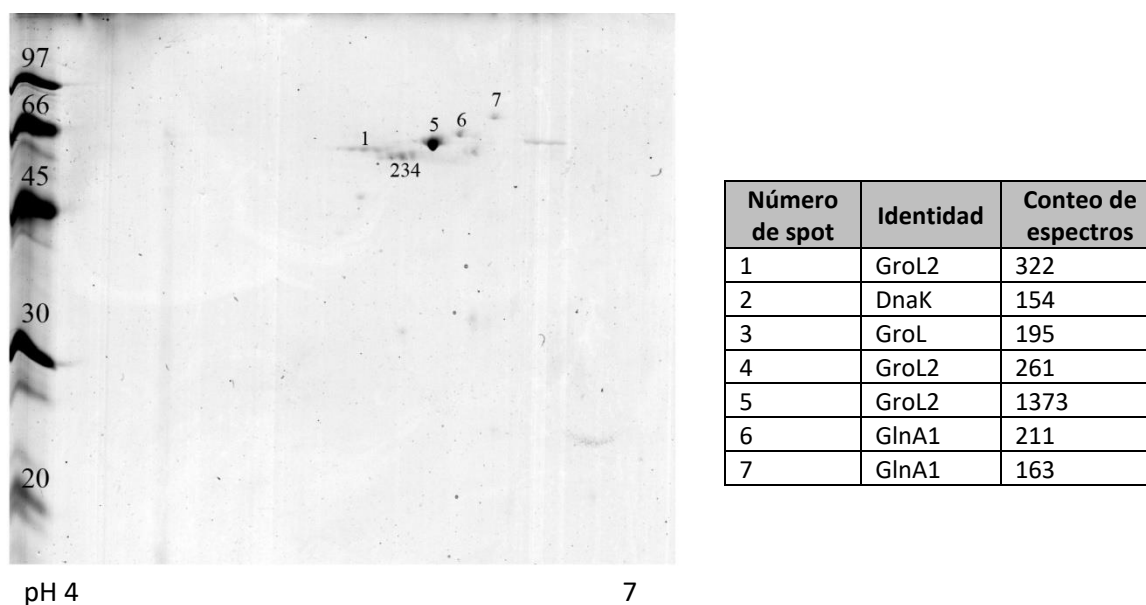


Figura 40: Producción de GlnA1 recombinante en *M. smegmatis* en altos niveles de nitrógeno: El gel de 2D muestra la proteína recombinante recuperada en condiciones de alto nitrógeno. La tabla indica la identidad de cada proteína, determinada por análisis por nano-LC-MS/MS. Sólo dos spots corresponden a GlnA1. Gradiente de pH 4-7.

Secuencia	Conteo de espectros
Spot 6	
IPITGSNPK	3
DGAPLM[15.9949]YDETGYAGLSDTAR	9
M[15.9949]LTNLINSGFILEK	3
TPDDVFK	1
SAM[15.9949]LM[15.9949]AGLDGIK	5
GGYFPVAPNDQYVDLR	7
DGAPLMYDETGYAGLSDTAR	4
SVFDDGLAFDGSSIR	3
DEKVEYVDVR	4
VEYVDVR	3
PGYEAPINLVYSQR	6
LAFTNPTVNSYK	3
LLAFTNPTVNSYK	3
LVPGYEAPINLVYSQR	24
TVTFM[15.9949]PKPL	3
spot 7	
TPDDVFK	6
KAENYLISTGIADT	3
M[15.9949]LTNLINSGF	3
IFDSVSFDSR	2
DKM[15.9949]LTNLINSGFILEK	1
SVFDDGLAFDGSSIR	11
DEKVEYVDVR	6
MLTNLINSGFILEK	2
LINSGFILEK	3
SPDSSGNPYLAFSAM[15.9949]LM[15.9949]AGLDGIK	1
M[15.9949]LTNLINSGFILEK	9
IPITGSNPK	6
WNTGAATEADGSPNR	1
GLAFDGSSIR	1
ENEIEPVNIRPHPY	6
GGYFPVAPNDQYVDLR	11
SPDSSGNPYLAF	2
SVFDDGLAFD	1
GAPLM[15.9949]YDETGYAGLSDTAR	3
DGAPLM[15.9949]YDETGYAGLSDTAR	26
DGAPLMYDETGYAGLSDTAR	13
SLLHAADDMM[15.9949]QLYK	1
ENEIEPVNIR	1
TEKTPDDVFK	3

VEYVDVR	8
SPDSSGNPYLAFSAM[15.9949]	2
SAM[15.9949]LM[15.9949]AGLDGIK	6
SPDSSGNPYLAFSAM	3
TGAATEADGSPNR	1
NKIEPQAPVDK	6
NTAWQNGK	1
LVPGYEAPINLVYSQR	16
EAPINLVYSQR	1
TVTFM[15.9949]PKPL	1
TNPTVNSYK	1
PLFGDNGSGM[15.9949]H	3

Tabla 3: Lista de péptidos de GlnA1 presentes en los spots 6 y 7 de la Figura 40. La lista detalla todos los péptidos encontrados para GlnA1 en el gel 2D. No se detectaron péptidos fosforilados.

Globalmente nuestros resultados indican que GlnA1 es un sustrato de PknG *in vitro* y nos permiten postular que esta fosforilación, y en particular en el residuo de Ser 57, podría tener un rol relevante en la regulación de la actividad de una enzima clave para la asimilación de nitrógeno, tanto en condiciones de cultivo como en el hospedero. Estos resultados fueron publicados y el artículo se adjunta como anexo (Gil *et al*, 2019).

Sin embargo, el trabajo realizado no nos permitió corroborar la relevancia fisiológica de dichos eventos de fosforilación. Es posible que la misma ocurra en condiciones de crecimiento, o en respuesta a estímulos que no fueron ensayados en este trabajo. Por tanto, la identificación de los sitios de fosforilación fisiológicos de GlnA1 y su implicancia para la fisiología de la bacteria y su interacción con el hospedero es aún un tema que requiere esfuerzo de investigación.

Capítulo 2: FhaA

Con el fin de descifrar el interactoma de FhaA dentro de micobacterias vivas, empleamos una metodología basada en la sobreexpresión de FhaA recombinante de *M. tuberculosis* fusionada a un streptag en *M. smegmatis*. Esta estrategia fue llevada a cabo por B. Rivera en el marco de su tesis de Maestría, y los resultados fueron reanalizados e interpretados en el marco de esta tesis. Brevemente, el método se basó en una combinación de entrecruzamiento químico con formaldehído, seguido de purificación de los complejos entrecruzados mediante cromatografía de afinidad y posterior identificación de las

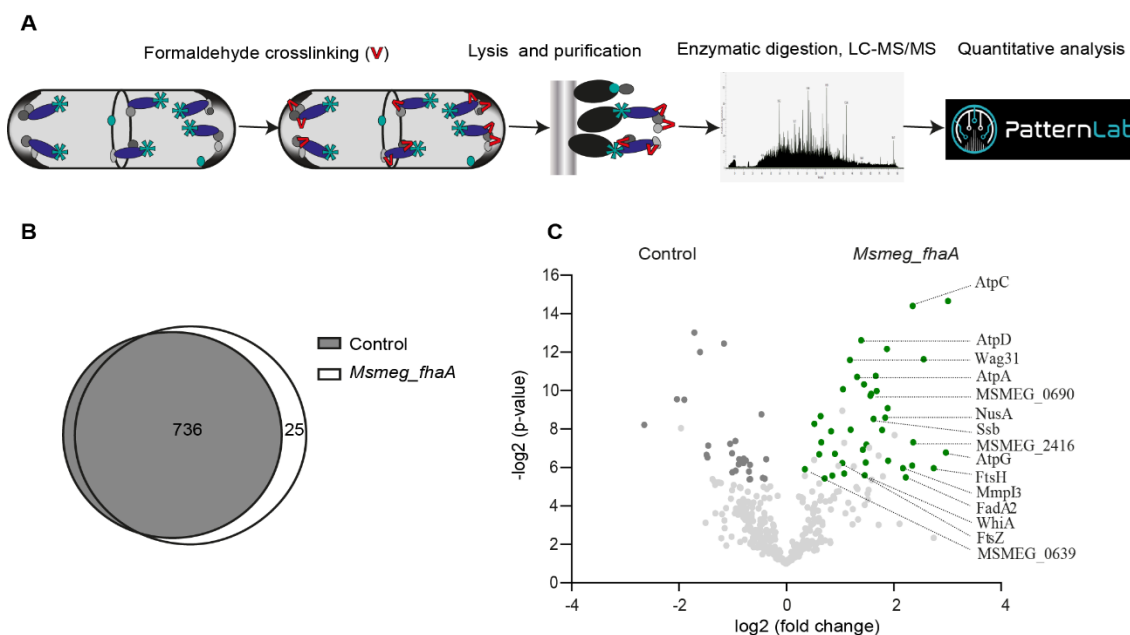


Figura 41: Interactoma FhaA en la célula viva. (A) Esquema de la estrategia utilizada para identificar interactores de FhaA. Se incubaron con formaldehído cultivos de *M. smegmatis* sobreexpresando de FhaA de *M. tuberculosis* fusionada a un Streptag. Los complejos de FhaA entrecruzados se purificaron utilizando columnas Strep-Tactin, y las proteínas aisladas se digirieron e identificaron mediante Nano-LC acoplada a espectrometría de masa (nano-LC-MS/MS). (B) Diagrama de Venn generado mediante el programa PatternLab, que muestra el número de proteínas identificadas en las cepas *Msmeg_fhaA* y Control. Se identificaron 25 proteínas como exclusivas del interactoma de FhaA ($p < 0.01$). (C) Gráfico de volcán que muestra las proteínas identificadas en al menos 7 de 10 réplicas analizadas, trazadas según su valor p y tasa de cambio. Las proteínas estadísticamente enriquecidas en complejos mediados por FhaA (valor $q \leq 0.05$) y con una tasa de cambio mayor a 2 se muestran en verde. Se etiquetaron aquellas relacionadas con la elongación celular/biosíntesis de la envoltura. La lista completa se muestra en la Tabla S1 del Anexo.

proteínas presentes en dichos complejos mediante espectrometría de masa (Figura 41A). Se seleccionó formaldehído como agente entrecruzante debido a su capacidad para penetrar la altamente hidrofóbica envoltura celular de las micobacterias y unir covalentemente aminoácidos en estrecha proximidad (Lougheed, Bennett, and Williams 2014). Como control negativo se utilizó una cepa de *M. smegmatis* transformada con el vector de expresión vacío. Para definir el interactoma de FhaA, se compararon las proteínas presentes en los complejos de las cepas *control* y *Msmeg_fhaA*. Se utilizaron 5 réplicas biológicas por condición. Como se muestra en la Figura 1B, se detectaron 25 proteínas presentes exclusivamente en los complejos de proteínas purificadas de *Msmeg_fhaA* ($p \leq 0.01$) (Tabla 4).

La lista de interactores de FhaA incluye a la propia FhaA y a Mvin, la flipasa de lípido II previamente reportada como interactor de FhaA (Gee et al. 2012) lo cual valida nuestra estrategia experimental. Además, reportamos 23 nuevos candidatos que se detectan exclusivamente en la cepa *Msmeg_fhaA* (consideramos como “exclusivas” aquellas proteínas estadísticamente diferenciales ($p < 0.01$) y detectadas en al menos 4 réplicas de los complejos purificados de la cepa *Msmeg_fhaA* pero no en la cepa control) (Tabla 4). Además de las proteínas exclusivamente identificadas en la cepa que sobreexpresa FhaA, 736 proteínas fueron identificadas en complejos recuperados de ambas cepas. De estas 736, 31 de ellas se encontraban aumentadas en forma estadísticamente significativa en complejos aislados de *Msmeg_fhaA* (fold change ≥ 2 ; stringency F: 0.04; q value ≤ 0.05) (Figura 41C, Tabla S1 del Anexo).

En total, reportamos una lista de 55 proteínas que representan nuevos candidatos a interactores, directos o indirectos de FhaA (Tabla 4 y Tabla S1 del Anexo). El estudio detallado de las 55 proteínas recuperadas en el interactoma de FhaA, a través de búsquedas tanto en la literatura como en bases de datos nos permitió obtener un panorama del entorno molecular en que se encuentra FhaA y plantear una estrategia para dilucidar su rol biológico en micobacterias.

Identidad	Ortólogo en Mtb	Nombre de la proteína	localización	Función propuesta/activa
FhaA	Rv0020c	FhaA	Poles and septum	Peptidoglycan synthesis/cell envelope biogenesis
MSMEG_0317	Rv0227c	Integral membrane protein	Membrane (2HTM) Septum and poles, mainly old pole	Mycolate precursors translocation/LAM and LM maturation
MSMEG_6284	Rv3720	Cyclopropane fatty-acyl-phospholipid synthase	Cytosol	Lipid Biosynthetic process
MSMEG_5308	Rv1057	Uncharacterized Protein	Poles and septum	Mycolate precursor translocation-Stabilizes the TMM transport complex under stress conditions
MSMEG_6929	Rv3910	Integral membrane protein (MviN)	Membrane (15 HTM). Poles and septum	Peptidoglycan synthesis
MSMEG_0692	Rv0312	Conserved hypothetical Pro and Thr rich protein	Membrane (1HTM)	ATP binding
MSMEG_5048	Rv1249c	Putative membrane protein	Membrane (2HTM) - IMD peri-polar region	Unknown
MSMEG_1193	Rv1940	TROVE domain protein	Cytosol	Unknown -RNA binding
CswA	Rv0008c	Cell wall synthesis protein CwsA	Membrane (1HTM) Poles and septum	Cell division, cell wall synthesis and the maintenance of cell shape
MsrB	Rv2674	Methionine-R-sulfoxide reductase	Cytosol	Protein repair/Response to oxidative stress
Ppm1	Rv2051c	Polyprenol monophosphomannose synthase	Cytosol	Glycosyltransferase/LAM/LM synthesis
MSMEG_5336	Rv1063c	Amidate substrates transporter protein	Membrane (7 HTM)	Transport

MSMEG_3148	Rv1480	Uncharacterized protein	Cytosolic	Transcriptional regulator vWFA_domain
MSMEG_6282	Rv3718c	KanY protein	Cytosolic	Polyketide synthesis
MSMEG_3641	Rv1836c	Uncharacterized protein	Membrane (1HTM)	Unknown
MSMEG_6757	Rv2989	Glycerol operon regulatory protein	-	Regulation of DNA-templated transcription
MSMEG_3255	Rv2458	DoxX subfamily protein	Membrane (2HTM)	Unknown
Spa	Rv0724	Putative protease IV Sppa	Membrane	Peptidase
MSMEG_3080	Rv1422	Putative gluconeogenesis factor	Cytosol Poles, mainly old pole	Cell shape/peptidoglycan synthesis
MSMEG_4753	Rv2521	Antioxidant, AhpC/TSA family protein	-	Cell redox homeostasis
MSMEG_1011	Rv3057c	Short chain dehydrogenase	IMD peri-polar region	
SecD	Rv2587c	Protein translocase subunit SecD	Membrane (6 HTM)	Protein transport
MSMEG_0736	Rv0383c	Putative conserved secreted protein	Membrane (1 HTM) Poles	MmpL3-dependent trehalose monomycolate transport to the cell wall. Cell elongation
MSMEG_5505	Rv0966c	Uncharacterized protein	-	Uncharacterized
MSMEG_4188	Rv2129c	Short chain dehydrogenase	-	Unknown

Tabla 4: Proteínas exclusivamente identificadas en los complejos de FhaA. Se muestran las proteínas detectadas en al menos 4 de 5 réplicas de *Msmeg_fhaA*, y ausentes en las réplicas del Control. Las mismas fueron validadas estadísticamente utilizando el modelo bayesiano integrado en PatternLab for Proteomics.

HTM: hélice transmembrana

- : Desconocido

Este interactoma está comprendido por proteínas que poseen asociaciones físicas y funcionales entre sí, y que comparten la misma localización subcelular: los polos celulares, el septo y la fracción de membrana. (Tabla S2 del Anexo). La recuperación de interactores previamente conocidos, junto con proteínas que comparten la misma localización subcelular y están involucradas en los mismos procesos biológicos, apuntan a un interactoma de FhaA confiable y fisiológicamente relevante. Entre los interactores polares identificados (Fay et al. 2019; Gee et al. 2012; Gupta et al. 2022; Mir et al. 2014; Plocinski et al. 2012), dos de ellos (MSMEG_0317 y MSMEG_3080) exhiben una distribución asimétrica, localizándose específicamente en el polo de crecimiento rápido (Tabla 4). Además, a partir del análisis de enriquecimiento funcional destacan varios procesos biológicos interconectados, que van desde la regulación de procesos de desarrollo, forma celular, así como la regulación del ciclo y la división celular (Tabla S2 en Anexo). El análisis de los interactores recuperados nos permitió postular que FhaA interacciona con proteínas relacionadas a la biosíntesis de la envoltura celular y la división/elongación de la bacteria, apuntando a un posible rol de FhaA en estos procesos biológicos.

Las proteínas recuperadas en el interactoma FhaA están relacionadas con la división y elongación celular, así como la biogénesis de la envoltura celular.

El análisis detallado de los interactores de FhaA en distintas bases de datos (Kegg, Uniprot, String, PantherDB) apunta a la posible participación de esta proteína en algunos procesos biológicos. El interactor más abundante en el interactoma, la proteína integral de membrana MSMEG_0317, recientemente renombrada como PgfA (por *Polar growing factor A*) ha sido recientemente identificada como un factor crucial para el crecimiento

asimétrico desde el polo viejo (Gupta et al. 2022). PgfA también interactúa con, el transportador de Trehalosa Mono Micolato (TMM) MmpL3, el cual desempeña un papel central en el tráfico de ácidos micólicos a través de la membrana, así como en la regulación de composición de la envoltura celular (Fay et al. 2019; Gupta et al. 2022). Curiosamente, otros dos interactores de FhaA participan en la regulación de la translocación de ácidos micólicos mediada por MmpL3: MSMEG_5308 y TtfA (*TMM Transport factor A*, MSMEG_0736) (Fay et al. 2019). En suma, el interactoma incluye 9 interactores de MmpL3 previamente reportados (Belardinelli et al. 2019; Fay et al. 2019), además del propio MmpL3.

También se recuperaron como interactores de FhaA proteínas que participan en la biosíntesis de las diferentes capas de la compleja pared celular micobacteriana. Además de Mvin (Gee et al. 2012), la lista incluye a CwsA (*Cell wall synthesis A*) (Plocinski et al. 2013), proteínas que participan en la biosíntesis de lipomanano (LM) y lipoarabinomanano (LAM) como la poliprenil monofosfomanosa sintasa Ppm1 (Gurcha et al. 2002; Rana et al. 2012) y MSMEG_0317 (Cashmore et al. 2017; Fay et al. 2019), o incluso el regulador transcripcional WhiA y la proteína que contiene el dominio DivIVA, SepIVA (MSMEG_2416), ambos involucrados en la división, longitud y la biosíntesis de la envoltura celular (Lee et al. 2020; Pickford et al. 2020). Finalmente, el interactoma también incluye las proteínas de andamiaje del divisoma y elongasoma (FtsZ y Wag31 respectivamente). En conjunto, estos resultados apuntan fuertemente a la participación de FhaA en la biosíntesis de la envoltura celular de micobacterias durante el crecimiento y la división celular.

La sobreexpresión de FhaA altera la composición/estructura de la envoltura celular.

Teniendo en cuenta los procesos a los que apunta nuestro interactoma, nos propusimos caracterizar fenotípicamente a la cepa que sobreexpresa FhaA, respecto a posibles cambios o alteraciones a nivel de la envoltura celular. Para ello evaluamos la hidrofobicidad de la superficie celular a través del ensayo de reparto en xileno. Como se muestra en la Figura 42A, observamos que la sobreexpresión de FhaA genera a una disminución significativa de

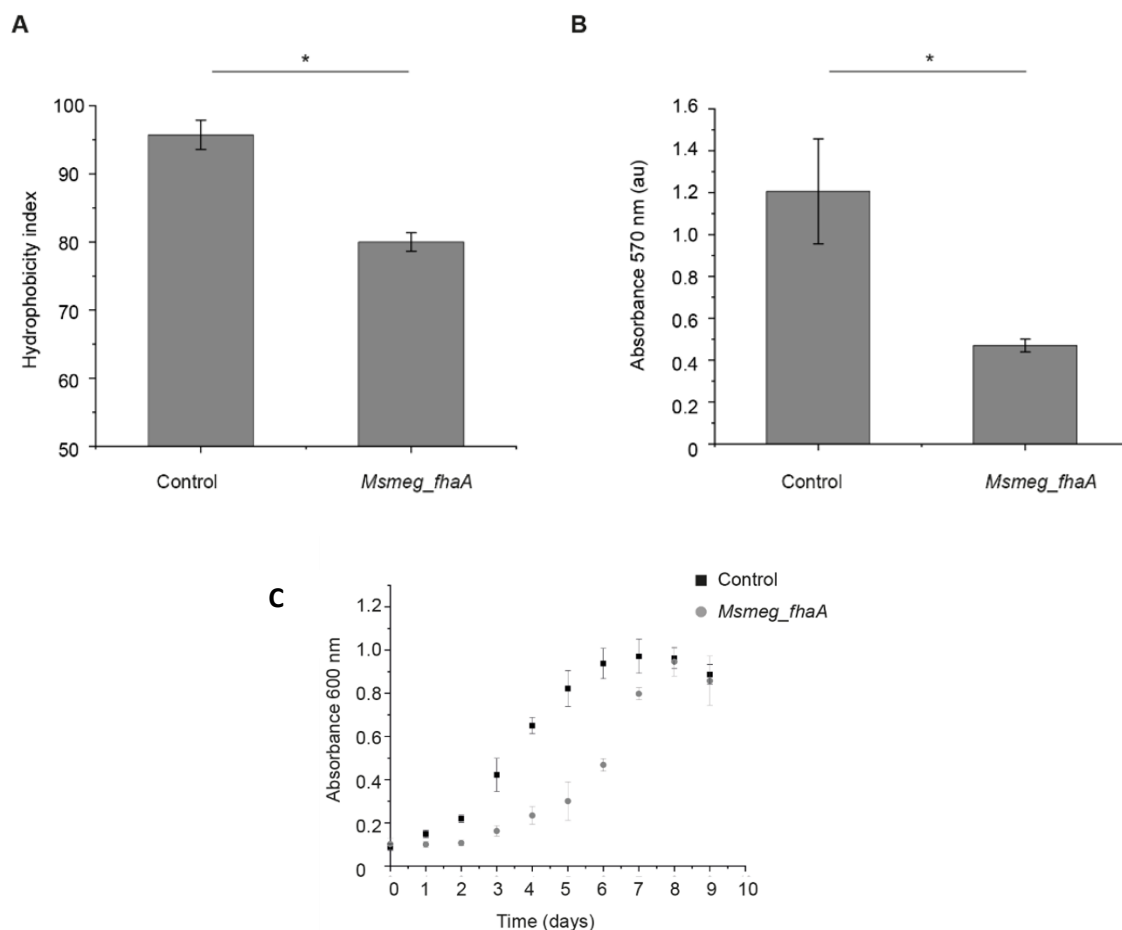


Figura 42: La sobreexpresión de FhaA altera la composición/estructura de la envoltura celular. (A) Prueba de hidrofobicidad de superficie. La figura muestra la partición de las cepas control y *Msmeg_fhaA* entre PBS y xileno. El gráfico representa el índice de hidrofobicidad, definido como el porcentaje de la absorbancia inicial de la capa acuosa retenida en la fracción de xileno después de la partición. Los ensayos se realizaron por triplicado. Media $\pm$ DE; * indica una diferencia estadísticamente significativa determinada mediante análisis de varianza (ANOVA), $p < 0.05$. (B) Ensayo de formación de biopelículas. La formación de biopelículas se evaluó en placas de 96 pocillos, tiñendo las mismas con cristal violeta y midiendo la absorbancia a 570 nm del cristal violeta retenido en el biofilm. Media $\pm$ DE; * indica una diferencia estadísticamente significativa determinada por ANOVA, $p < 0.05$. (C) Curva de crecimiento estática. Las células se crecieron en medio 7H9 a 37 °C, sin agitación. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 wells utilizando 3 cultivos independientes en quintuplicado. El crecimiento se determinó midiendo la DO600 durante 10 días consecutivos. Las dos cepas alcanzan la misma densidad óptica final en fase estacionaria.

la hidrofobicidad de la superficie celular. Esta observación respalda la hipótesis de que esta proteína está involucrada en la biogénesis de la pared. Dado que la hidrofobicidad de superficie es una propiedad fisicoquímica fundamental para comportamientos

multicelulares como la adhesión a sustratos y entre células (Chakraborty and Kumar 2019; Mazumder et al. 2010), nos propusimos investigar el impacto de la sobreexpresión de FhaA en la formación de biopelículas. Observamos que en la cepa *Msmeg_fhaA* la capacidad de formación de estas estructuras multicelulares es reducida (Figura 42B), y que este efecto no está relacionado con defectos en la biomasa final alcanzada por el biofilm (Figura 42C).

Con el fin de evaluar la permeabilidad de la envoltura celular, realizamos ensayos de captación de BrEt (G. Viswanathan et al. 2017). El principio de este ensayo consiste en el aumento de la emisión de fluorescencia en el tiempo, como resultado del intercalado del BrEt en el ADN, consecuencia de la penetración del mismo dentro de la célula. Dicho ensayo mostró que la cepa que sobreexpresa FhaA es más permeable en comparación con la cepa Control (Fig. 43), lo que coincide con las observaciones anteriores.

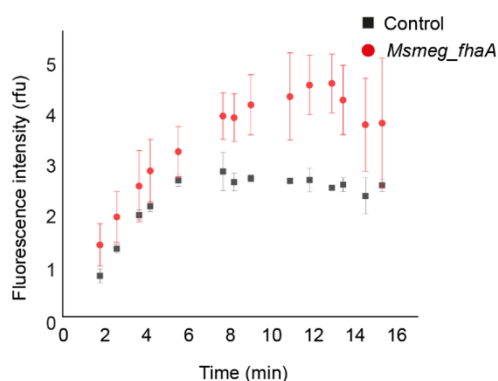


Figura 43: Ensayo de permeabilidad al Bromuro de Etidio, mostrando que la permeabilidad de la envoltura celular se ve comprometida en la cepa que sobreexpresa FhaA. El ensayo se llevó a cabo por quintuplicado. La diferencia entre las curvas es estadísticamente significativa por test de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$).

Para caracterizar en mayor profundidad las diferencias observadas en las cepas Control y *Msmeg_fhaA*, realizamos ensayos de Microscopía electrónica de transmisión (MET), así como de tomografía electrónica (TE). El uso conjunto de estas dos técnicas nos permitió obtener información valiosa sobre la estructura y organización de la envoltura celular en nuestra cepa de estudio.

Las imágenes de MET confirmaron que la cepa que sobreexpresa FhaA exhibe una envoltura celular anómala (Figura 44A y 44B). Se observan áreas con una pared celular inusualmente gruesa, que aparecen como manchas electrón lúcidas con una distribución aberrante (Figura 44A). En comparación con el Control, hay un aumento en el espesor promedio de la envoltura celular (Figura 44B), estando estas áreas engrosadas, heterogéneamente distribuidas alrededor superficie celular.

Por otra parte, los mapas de espesor de pared celular obtenidos mediante tomografía electrónica (TE) reafirman las alteraciones de la cepa *Msmeg_fhaA* y resaltan la heterogeneidad del espesor de la envoltura a lo largo del volumen celular (Figura 45).

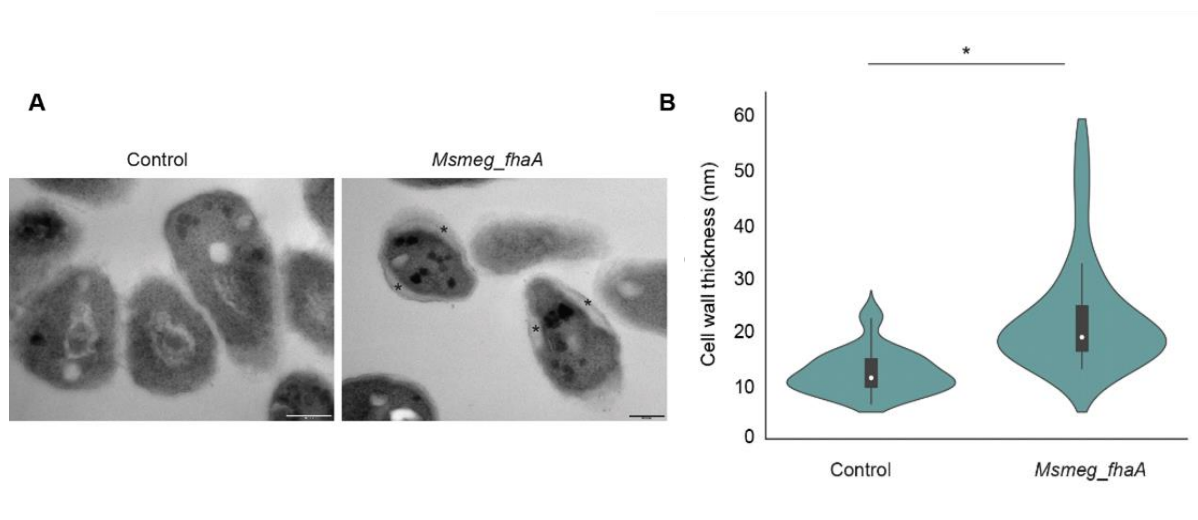


Figura 44: Microscopía electrónica de transmisión mostrando alteraciones en la envoltura celular en la cepa que sobreexpresa FhaA (A) Micrografías de secciones ultrafinas para las cepas Control y *Msmeg_fhaA*, donde se observan diferencias en el grosor y la apariencia de la pared celular. Los asteriscos indican zonas de grosor anormal. Barra de escala: 200 nm.

(B) Grafico de violín comparando el espesor promedio de la pared celular determinado a partir de imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para cada cepa. Se aplicó Kolmogorov-Smirnov; $n = 30$ células para cada grupo; $* = p < 0.05$. Los círculos blancos representan la mediana; los cuadros grises representan el percentil 25%-75%; los valores fuera de los bigotes representan valores atípicos.

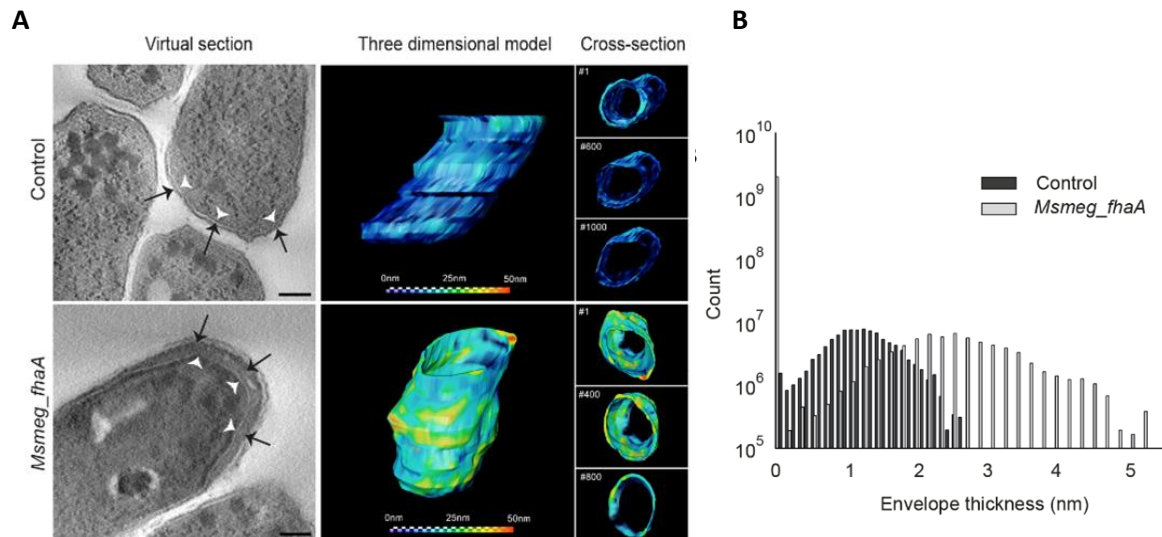


Figura 45: Tomografía electrónica mostrando alteraciones en la envoltura celular de la cepa *Msmeg_fhaA* (A) Mapa de variaciones en el espesor de la pared a lo largo del volumen celular. Los tonos más cálidos indican un mayor espesor (25 a 50 nm) y los tonos más fríos denotan regiones más delgadas (0 a 25 nm). Panel izquierdo: secciones virtuales de tomogramas representativos de las cepas Control y *Msmeg_fhaA* (aumento de la cepa Control 25.000 ×; aumento de *Msmeg_fhaA* 14.500 ×). Las puntas de flecha blancas indican la membrana plasmática. En particular, se observa un aumento en la capa intermedia (flechas negras) de la pared celular de *Msmeg_fhaA*, en contraste con la capa consistentemente más delgada exhibida en el Control. Barra de escala: 100 nm. Panel derecho: modelo tridimensional de volúmenes parciales para las cepas Control y *Msmeg_fhaA*. Se observa un fenotipo azul oscuro predominante en todo el volumen para la cepa Control, mientras que hay una prevalencia de tonos cálidos en la mayor parte del volumen muestreado de *Msmeg_fhaA*, lo que indica el aumento en el espesor de la pared. En el lado derecho, vista en sección transversal de diferentes cortes secuenciales a lo largo del eje Z. Los números indican dónde se seccionaron los modelos. (B) Histogramas representando el grosor de la envoltura celular medido en los tomogramas de A, para las cepas Control y *Msmeg_fhaA*

Otra evidencia del efecto de la sobreexpresión de FhaA en la envoltura celular proviene del análisis de las propiedades fisicoquímicas de la membrana de las dos cepas. Usamos microscopía confocal de barrido laser espectral para obtener imágenes de células previamente teñidas con LAURDAN. LAURDAN es un colorante fluorescente anfifílico, que penetra en las bicapas lipídicas y permite obtener información sobre la fluidez de las membranas, ya que su espectro de emisión cambia en dependencia de la composición molecular y la polaridad del entorno (Malacrida and Gratton 2018; Malacrida, Jameson, and

Gratton 2017). Cuando aumenta la accesibilidad al agua en la interfaz de la membrana, LAURDAN exhibe un corrimiento espectral hacia el verde, mientras que, en membranas más ordenadas, su emisión se desplaza hacia el azul. Utilizamos esta propiedad para proporcionar una evaluación inicial de posibles diferencias en la composición y/o estructura física de las capas lipídicas y/o sus estructuras de pared celular asociadas, como consecuencia de la sobreexpresión de FhaA.

Cuando se representan los píxeles en un diagrama de fasores, aquellos correspondientes a la cepa Control tienden a agruparse en ángulos más altos y más cerca del origen de los ejes en comparación a la cepa *Msmeg_fhaA* (Figura 46). Además, existe una diferencia en las combinaciones lineales que explican las trayectorias de los grupos de píxeles para ambas cepas. Tomados en su conjunto, la diferencia entre las dos trayectorias más el corrimiento espectral y el ensanchamiento observados para la cepa que sobreexpresa FhaA indican que existen cambios a nivel del entorno molecular detectado por LAURDAN (Figura 46B).

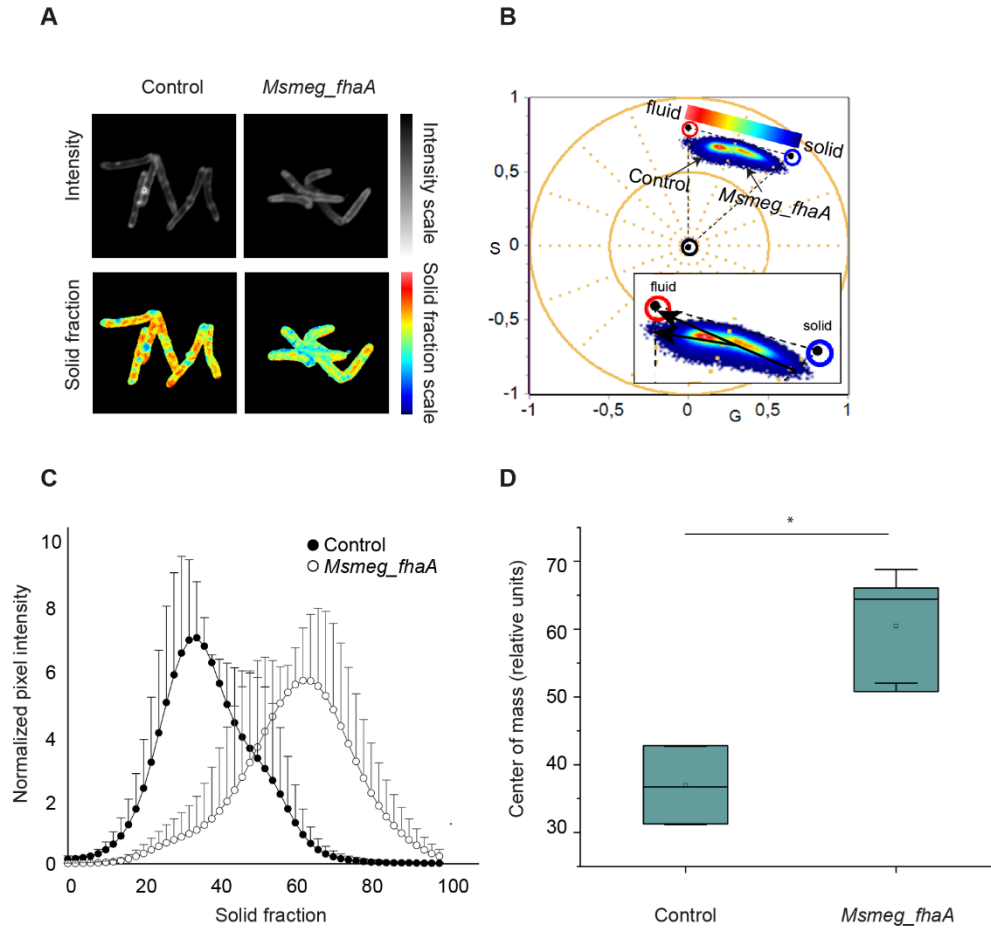


Figura 46: Microscopía confocal de barrido laser espectral utilizando la sonda fluorescente LAURDAN. (A) Imágenes representativas de intensidad e imagen pseudocolor de LAURDAN para las cepas Control y *Msmeg_fhaA*. Las imágenes en pseudocolor se generaron utilizando la escala de colores indicada en el panel B y representan el cambio espectral del azul al rojo. (B) Gráfico de fasores espectrales de la emisión de fluorescencia de LAURDAN para las cepas Control y *Msmeg_fhaA*. A los espectros de emisión se aplicó la transformada de Fourier y se graficaron G y S (correspondientes a las partes real e imaginaria del primer armónico de la transformada de Fourier) para obtener el gráfico de fasor espectral. Los datos indican fuertes diferencias en la fluidez entre la envoltura de ambas cepas. Los píxeles correspondientes a *Msmeg_fhaA* se encuentran desplazados en el sentido de las agujas del reloj (hacia el azul) en relación con la cepa Control y están más lejos del origen de los ejes (lo que indica un ensanchamiento espectral). Además, la sección ampliada muestra que las trayectorias correspondientes a cada cepa son diferentes, lo que indica claramente que los entornos moleculares sentidos por LAURDAN son distintos. (C) Gráfico que ilustran la intensidad de píxel normalizada vs fracción sólida. Los puntos negros representan la cepa Control; Los puntos blancos representan la cepa *Msmeg_fhaA*. (D) Box plot representando los valores del centro de masas para las curvas representadas en el panel C.

Efecto de la sobreexpresión de FhaA sobre la composición de lípidos.

Anteriormente se ha demostrado que las micobacterias con defectos en la organización de la envoltura celular o en la biosíntesis de sus componentes lipídicos son incapaces de formar biopelículas (Chakraborty and Kumar 2019; Mazumder et al. 2010). En conjunto, los resultados expuestos hasta el momento apuntan a una posible alteración en la estructura y/o composición lipídica de la envoltura celular como consecuencia de la sobreexpresión de FhaA. Por otra parte, también el análisis interactómico de la cepa *Msmeg_fhaA* sugiere un posible rol de FhaA en la regulación de la composición lipídica de la envoltura celular. Como primer enfoque para evaluar esta posibilidad, realizamos una extracción de lípidos libres totales y analizamos dicha fracción utilizando técnicas ortogonales. Como punto de partida analizamos el peso seco de los lípidos recuperados a partir de cantidades comparables de biomasa celular. Curiosamente, observamos diferencias claras en el peso de los lípidos totales recuperados entre ambas cepas (Figura 47).

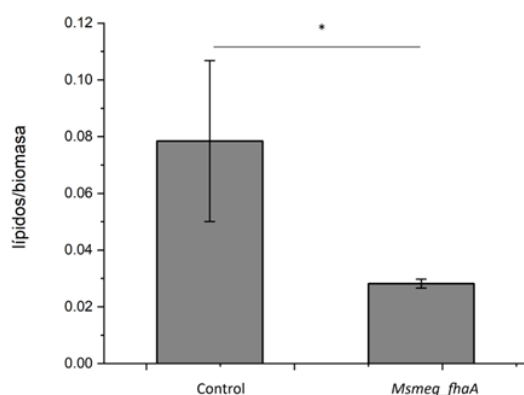


Figura 47: Lípidos libres totales. Se muestra el cociente entre el peso seco de los lípidos totales recuperados a partir de extractos de las cepas Control y *Msmeg_fhaA* y el peso del extracto celular. El gráfico muestra el cociente entre la masa de lípidos recuperados respecto al peso de pellet seco a partir del cual se realizó la extracción. El ensayo se realizó por triplicado. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa determinada mediante test de ANOVA ($p < 0.05$).

Esta fracción lipídica también fue sometida a análisis mediante espectrometría de masa de tipo MALDI TOF seguido de búsqueda en base de datos. Dicho análisis mostró que los perfiles lipídicos son muy similares entre ambas las cepas (Figura 48). Mediante esta técnica sólo se pudieron observar fosfolípidos que forman parte de la membrana celular interna, lo cual apunta a una bicapa lipídica sin cambios mayores a nivel de composición.

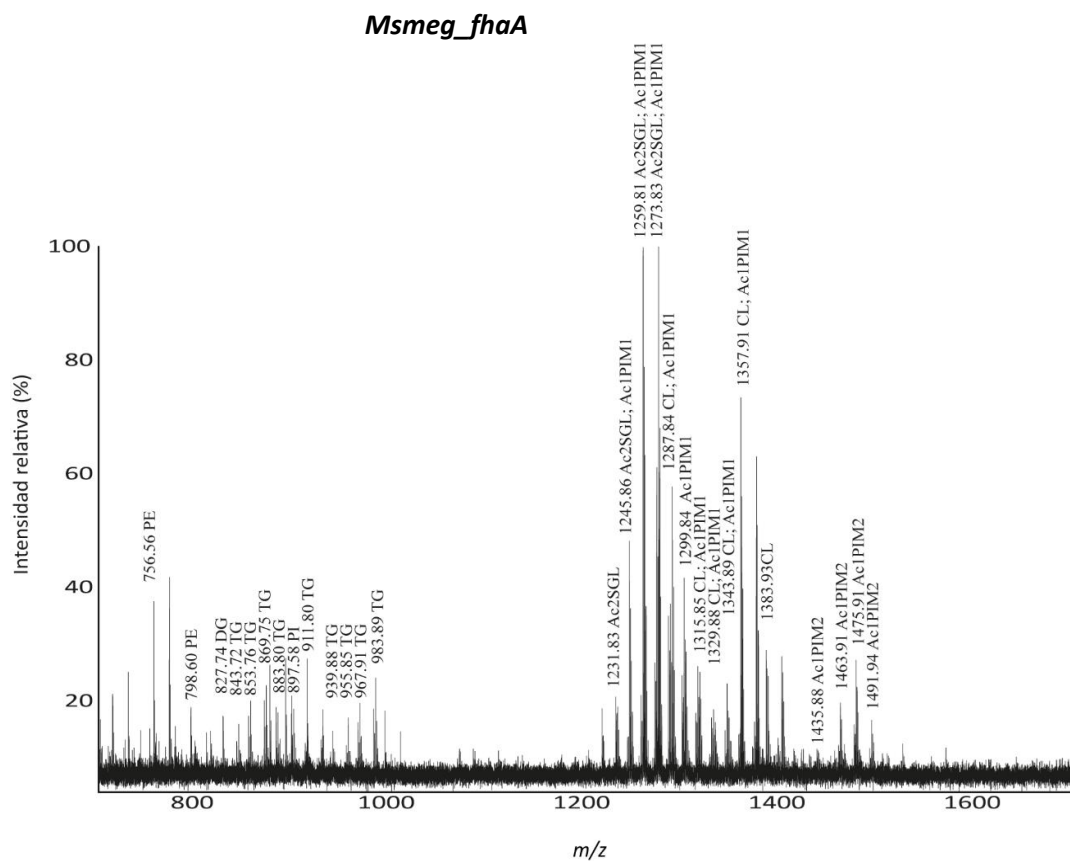
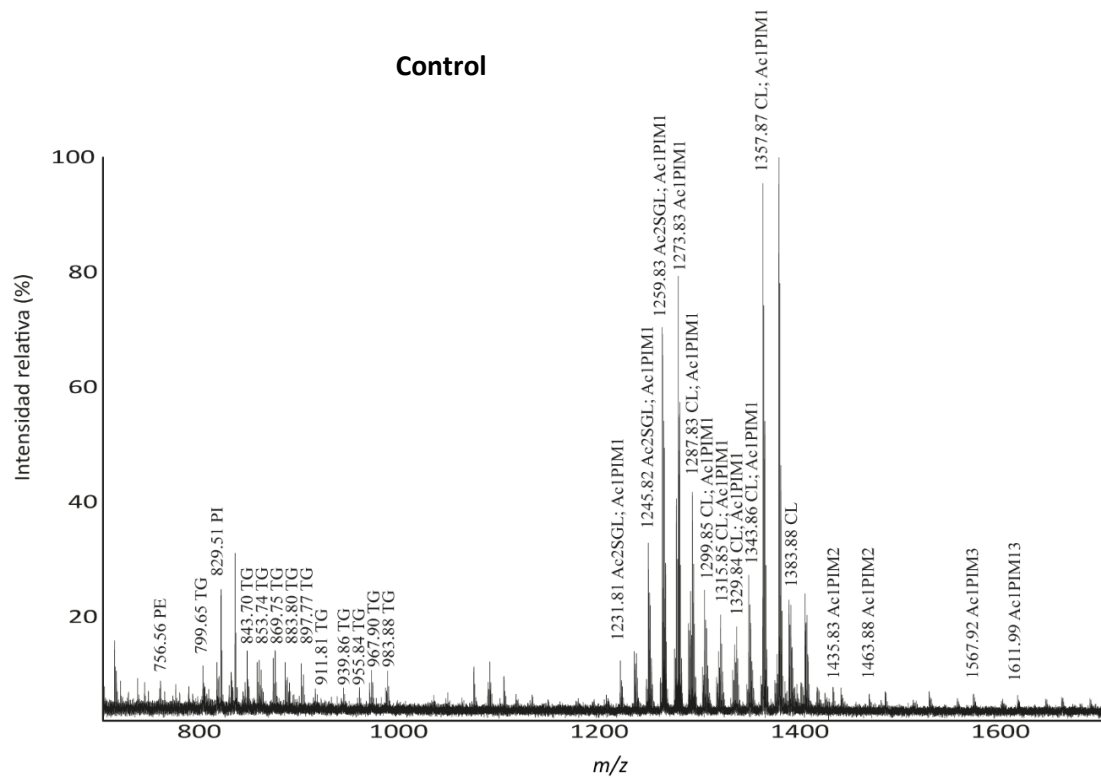


Figura 48: Espectros tipo MALDI-TOF/TOF obtenidos para los extractos lipídicos de las cepas Control y *Msmeg_fhaA*. Las estructuras lipídicas se asignaron buscando los valores m/z en la base de datos de Lipidomics Gateway de LIPID MAPS® (http://www.lipidmaps.org/tools/ms/Mtb_batch_bulk.html), con una tolerancia de masa de 0.05 Da. En estos espectros únicamente se observan señales correspondientes a lípidos característicos de la fracción de membrana interna. No se observan diferencias significativas entre ambas cepas. PE: Fosfatidil etanolamina; PI: Fosfatidil inositol; DG: Diglicéridos; TG: Triglicéridos; CL Cardiolipina; AcPIM fosfatidil inositol manósidos acilados; AcSGL sulfolípidos acilados.

Debido a que mediante espectrometría de masa no fue posible descartar la existencia de cambios a nivel de la fracción de ácidos micólicos, sometimos la fracción lipídica a análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC, *Thin liquid chromatography*). Esta técnica permite observar los alfa, ceto y metoxi metil ésteres de ácidos micólicos (MAMES) así como los metil ésteres de ácidos grasos (FAME) y determinar cambios en la cantidad total o la proporción de los mismos. Mediante esta técnica, no observamos cambios drásticos a nivel de la composición de ácidos micólicos (Figura 49). Nuestros resultados podrían indicar que las diferencias observadas no se corresponden con cambios en la composición lipídica sino con la abundancia de los mismos. Sin embargo, dado que todas las técnicas utilizadas permiten observar sólo una pequeña fracción de los lípidos presentes en la muestra, y dado que las micobacterias presentan una gran riqueza de diversidad de éstos, no es posible, a partir de nuestros resultados, aseverar que no existan diferencias en la composición lipídica.

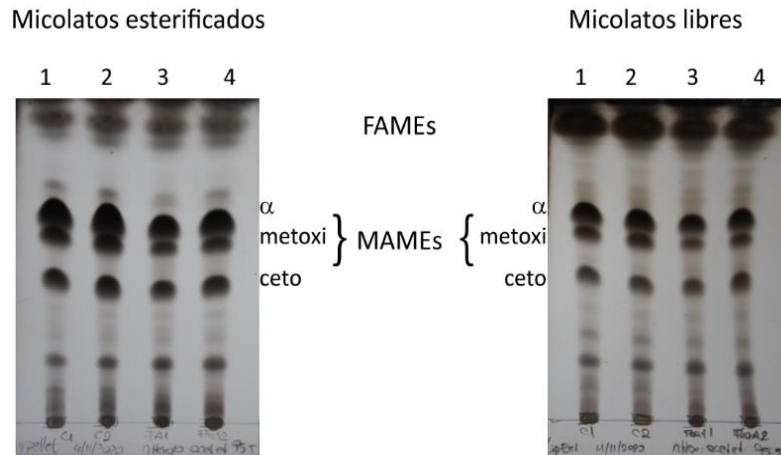


Figura 49: Cromatografía en capa fina donde se observan los perfiles de ácidos micólicos presentes en la fracción lipídica de las cepas Control (carriles 1 y 2) y *Msmeg_fhaA* (carriles 3 y 4). La imagen de la izquierda representa los lípidos que se encontraban esterificando arabinogalactanos y la imagen de la derecha aquellos lípidos que se encuentran en forma libre. Se indican las zonas donde aparecen los metil ésteres de ácido graso (FAME, Fatty acid methyl ester) y los metil ésteres de ácidos micólicos (MAME, Mycolic acid methyl ester) en sus formas α , metoxi y ceto. Los mismos no muestran diferencias importantes en las proporciones de ácidos micólicos entre ambas cepas. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado en duplicados biológicos.

La sobreexpresión de FhaA afecta la morfología celular.

Con la finalidad de investigar el efecto de FhaA en la morfología celular de la cepa *Msmeg_fhaA*, se obtuvieron imágenes de microscopía confocal de bacterias teñidas con sulforodamina-DHPE ($n > 100$) y se analizó el largo celular en base a los perfiles de fluorescencia de bacterias únicas utilizando el programa Image J. Este análisis reveló que la sobreexpresión de FhaA genera células significativamente más cortas en comparación con la cepa Control, exhibiendo una longitud promedio de $4.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (longitud promedio del Control: $7.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$) (Figura 50A). Esta observación fue corroborada posteriormente mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), que reveló que las células *Msmeg_fhaA* no sólo son más cortas, sino que además exhiben morfología y dimensiones anormales y heterogéneas. En las micrografías se observan células más cortas y anchas, con

defectos en los polos y el septo, los sitios de incorporación de nueva pared celular. Mientras que en algunos casos se observó un ensanchamiento en la zona correspondiente al septo, la gran mayoría de las células presentó defectos morfológicos a nivel de los polos (Figura 50B-C). Dicha morfología aberrante se distingue por el engrosamiento y curvatura de los polos, siendo característicos los abultamientos y la hinchazón de los extremos bacterianos. Curiosamente, estos defectos se observaron mayoritariamente en uno de los polos celulares, con una menor proporción de células presentando alteraciones en ambos polos (Figura 50B). Estas observaciones en su conjunto, sugieren una integridad comprometida de la envoltura celular a nivel de los polos.

El análisis ultraestructural de los polos celulares por tomografía electrónica mostró tres capas de pared celular como estaba previsto, correspondientes a la membrana interna, la pared de peptidoglicano/arabinogalactano y la membrana externa compuesta por ácidos micólicos. Interesantemente, la capa intermedia mostró un mayor grosor en *Msmeg_fhaA* en comparación con la cepa Control (Figura 45; 50D y video en Anexo), lo que sugiere una síntesis alterada de la capa entre la micomembrana y la membrana interna, correspondiente al peptidoglicano/arabinogalactano. En la Figura 50D se puede observar una sección virtual de una tomografía celular correspondiente a un polo aberrante de

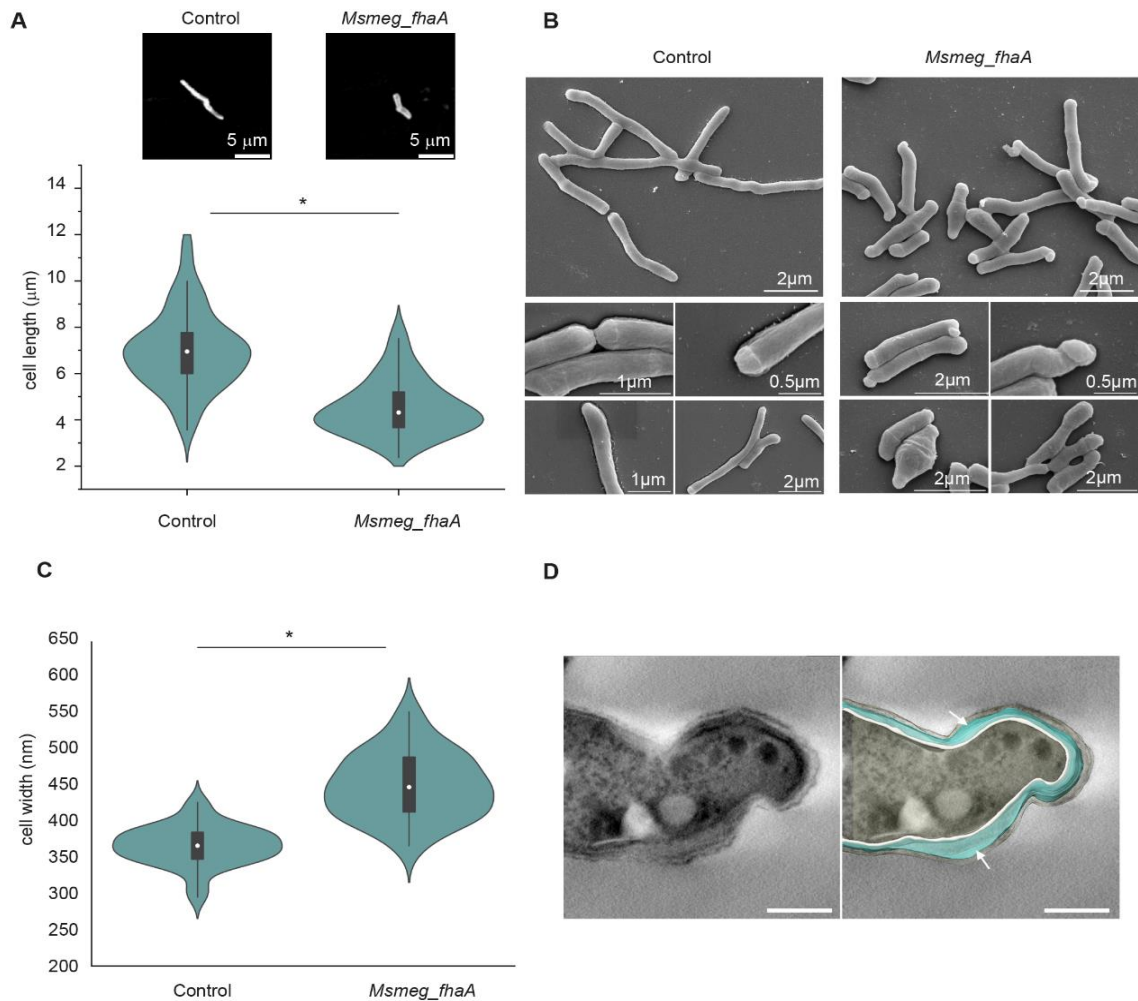


Figura 50: La sobreexpresión de FhaA altera la morfología celular. (A) Gráfico de violín e imágenes representativas de bacterias teñidas con sulforodamina-DHPE ilustrando las diferencias en la longitud celular entre ambas cepas. La longitud media es de $7.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$ para la cepa de control y de $4.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ para la cepa *Msmeg_fhaA*. * indica una diferencia estadísticamente significativa determinada por test de Student para dos muestras. $P < 0.05$; $n > 100$ células para cada grupo. Los círculos blancos representan la mediana; los cuadros grises representan el percentil 25%-75%; los valores fuera de los bigotes representan valores atípicos. (B) SEM mostrando diferencias morfológicas entre cepas. Las imágenes de la cepa *Msmeg_fhaA* revelan heterogeneidad en la forma, la longitud y el ancho de las células en comparación con el Control. Además, se observa que la mayoría de las células *Msmeg_fhaA* exhiben un polo aberrante. (C) Gráfico de violín mostrando que el ancho de la célula se encuentra alterado en la cepa *Msmeg_fhaA*. Las mediciones de ancho fueron realizadas a partir de imágenes SEM. * indica una diferencia estadísticamente significativa determinada por ANOVA de una vía. $P < 0.05$; $n = 30$ células para cada grupo. Los círculos blancos representan la mediana; los cuadros grises representan el percentil 25%-75%; los valores fuera de los bigotes representan valores atípicos. (D) Izquierda: sección virtual de una tomografía celular de un polo curvo de *Msmeg_fhaA*. Derecha: vista superior del modelo 3D correspondiente al tomograma de la izquierda, enfatizando el engrosamiento de la pared celular (flechas blancas). La capa blanca representa la membrana plasmática; la capa azul claro indica PG/arabinogalactano; la capa amarillo claro indica la membrana externa. Barra de escala: 200 nm.

Msmeg_fhaA, corroborando el engrosamiento de la pared celular (Figuras 45A y 50D). Las alteraciones morfológicas observadas, sugieren que la sobreexpresión de FhaA altera la elongación polar y la síntesis de la pared celular.

La sobreexpresión de FhaA genera deslocalización de la biosíntesis de peptidoglicano.

Dado que nuestros resultados de microscopía electrónica apuntan a una alteración en la síntesis de peptidoglicano como consecuencia de la sobreexpresión de FhaA, nos propusimos evaluar el efecto de dicha sobreexpresión en la síntesis de PG. Para ello utilizamos D-HADA, un análogo fluorescente del aminoácido D-alanina (Kuru et al. 2015), el cual se incorpora a los sitios donde está ocurriendo síntesis activa de PG. Acorde a lo esperado, en la cepa control el nuevo material de pared celular se inserta específicamente en los polos y el septo (Figura 51A). Sin embargo, en la cepa *Msmeg_fhaA*, la síntesis de PG no se limita estrictamente a estos sitios, ya que el HADA además se incorpora en focos discretos a lo largo de la envoltura celular (Figura 51A). Para cuantificar el grado de deslocalización en la síntesis de PG, evaluamos la distancia entre focos de HADA en cada bacteria, normalizada respecto a la longitud celular. En la cepa Control detectamos 2 o 3 máximos locales de intensidad de fluorescencia (Figura 51A y C) correspondientes a los dos polos (células no septadas), o a los dos polos más el septo (células septadas), respectivamente (número promedio de focos HADA por célula: 2.7 ± 0.5). En este caso, el espacio entre focos de síntesis de PG se correlaciona con las distancias polo-septo o polo-polo (Figura 51 B-C). Sin embargo, en el caso de la cepa *Msmeg_fhaA*, el número promedio de focos por célula aumenta a 4.5 ± 1.7 , y como consecuencia la distancia relativa entre focos es significativamente más corta, lo que apunta a que la maquinaria biosintética de PG se encuentra deslocalizada (Figura 51B-C). Interesantemente, la cepa que sobreexpresa la versión fosfoablativa de FhaA para la Thr116 (*Msmeg_fhaAT_{116A}*), un residuo identificado por nosotros como fosforilado *in vitro* e *in vivo*, exhibe el mismo fenotipo de deslocalización de peptidoglicano, lo cual apunta a que este efecto no está regulado por fosforilación en este sitio. (Figura 51D).

La localización anormal de la maquinaria de síntesis de la pared celular se demostró previamente para la cepa de *M. smegmatis* que sobreexpresa la proteína de andamiaje del elongasoma Wag31 (Nguyen et al. 2007). Con el fin de evaluar si la deslocalización de la maquinaria de síntesis de PG que observamos en la cepa *Msmeg_fhaA* podría estar asociada con un aumento en los niveles Wag 31, se llevó a cabo un análisis proteómico comparativo de las proteínas totales presentes en ambas cepas mediante espectrometría de masa. Los resultados confirmaron la sobreexpresión de FhaA en la cepa *Msmeg_fhaA*. Sin embargo, los niveles de Wag31 no fueron estadísticamente diferentes a los de la cepa Control (Tabla S3 en Anexo). Este resultado sugiere que los niveles elevados de FhaA en sí mismos podrían

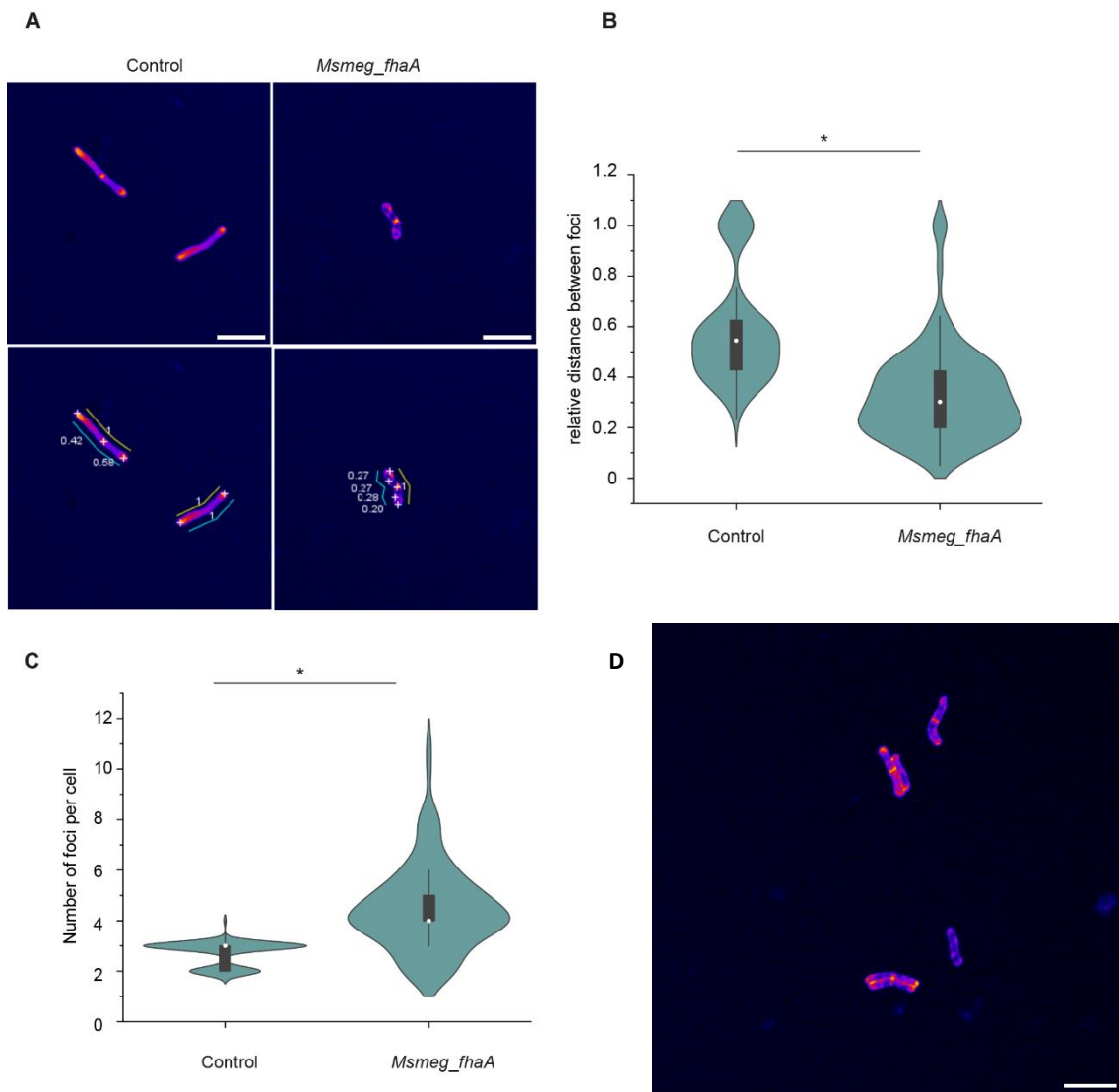


Figura 51: La sobreexpresión de FhaA provoca una deslocalización de la maquinaria de síntesis de PG. (A) Imágenes representativas de las cepas Control y *Msmeg_fhaA* que muestran la distribución de síntesis de PG. Se aplicó “fire” look up table (LUT) a la señal de HADA para resaltar las regiones con mayor intensidad de fluorescencia. Se utilizó la herramienta “find maxima” de *Image J* para detectar máximos locales de intensidad de la señal de HADA (cruces blancas) y se midieron las distancias entre focos (barras cian). Dado que la longitud de las células es significativamente diferente entre ambas cepas, las distancias entre focos se relativizaron respecto a la longitud de las células (barras amarillas). Barra de escala: 5 μ m. (B) Gráfico de violín que muestra las diferencias en las distancias entre focos para las cepas Control y *Msmeg_fhaA*. * indica una diferencia estadísticamente significativa determinada por Kolmogorov-Smirnov. $P < 0.05$; $n > 100$ células para cada grupo. Los círculos blancos representan la mediana; los cuadros grises representan el percentil 25%-75%; los valores fuera de los bigotes representan valores atípicos. (C) Gráfico de violín que muestra el número de focos HADA por célula. Mientras que las células de control exhiben dos focos (ambos polos, bacterias no septadas) o tres (dos polos y tabique, bacterias septadas), las células *Msmeg_fhaA* exhiben múltiples focos, incluso cuando no están septadas. * indica una diferencia estadísticamente significativa determinada por Kolmogorov-Smirnov, $P < 0.05$; $n > 100$ células para cada grupo. Los círculos blancos representan la mediana; los cuadros grises representan el percentil 25%-75%; los valores fuera de los bigotes representan valores atípicos. (D) Imagen representativa mostrando la incorporación de HADA en la cepa que sobreexpresa la versión fosfoablative de FhaA en la Thr116 (*Msmeg_fhaAT116A*), previamente identificada por nosotros como sitio de fosforilación *in vivo* e *in vitro*. El patrón observado coincide con el de la cepa *Msmeg_fhaA*. Barra de escala: 5 μ m.

ser el factor responsable de la deslocalización de la maquinaria de biosíntesis de la pared celular.

FhaA es necesaria para la elongación polar y para el crecimiento asimétrico.

Con la finalidad de profundizar en el papel de la FhaA en la elongación celular, evaluamos la morfología celular e incorporación de HADA en una cepa de *M. smegmatis knockout* para *fhaA* (*Msmeg_ΔfhaA*). Esta cepa, así como la cepa salvaje (WT) y la complementada *Msmeg_ΔfhaA_fhaA* fueron amablemente cedidas por el Dr. Raghunand Tirumalai. De acuerdo a lo reportado previamente en la literatura (Viswanathan et al, 2017), observamos que las bacterias *Msmeg_ΔfhaA* son más cortas en comparación con la cepa WT, y que la longitud celular se recupera parcialmente después de la complementación (Figura 52A), confirmando el papel de la FhaA en la elongación celular.

Los perfiles de intensidad de fluorescencia en células WT que se encontraban en proceso de división (septadas, $n > 100$), revelaron la presencia de tres máximos correspondientes al septo y los polos (Figura 52B), con los polos exhibiendo una mayor intensidad. Además, este resultado muestra que la elongación es asimétrica, como se reportó en la literatura (Aldridge et al. 2012; Hannebelle et al. 2020; Joyce et al. 2012). El polo de crecimiento rápido se caracteriza por poseer una señal de HADA que abarca un área más amplia desde el polo y posee una pendiente más pequeña de intensidad de fluorescencia (Figura 52A-C). Por el contrario, la señal de fluorescencia correspondiente al polo de crecimiento lento aparece concentrada dentro de una región más restringida y la pendiente en el perfil de intensidad de fluorescencia es mayor (Figura 52A-C). Nuestros resultados confirman la existencia de una diferencia estadísticamente significativa en el grado de incorporación de HADA para ambos polos en la cepa WT, acorde a la literatura previa (Figura 52A y 52C). Sin embargo, cuando observamos a la cepa *Msmeg_ΔfhaA* vemos que la misma exhibe un perfil fluorescencia distinto, caracterizado por una mayor intensidad en el septo y niveles significativamente más bajos de incorporación de HADA en los polos (Figura 52B). La relación de intensidad polo/septo (siendo la intensidad del polo, el promedio de ambos polos celulares) es significativamente diferente entre las cepas WT y *Msmeg_ΔfhaA*. Esta distribución anómala de la síntesis de PG se revierte parcialmente después de la complementación (Figura 52D, Figura 53 A). Otro dato interesante que surge del análisis de los perfiles de fluorescencia, es que la incorporación polar de HADA por *Msmeg_ΔfhaA* abarca un área más amplia en ambos polos, en comparación con la cepa WT: la eliminación de FhaA no solo alteró el patrón y la cantidad de HADA incorporado, sino que también resultó en una incorporación simétrica del nuevo material de pared celular en los polos, como lo revela el perfil de fluorescencia promedio y las pendientes de intensidad de fluorescencia en los polo de *Msmeg_ΔfhaA* (Figura 52B y 52C). Otro punto interesante resulta del hecho de que esta pendiente es menor que la medida para el polo de crecimiento rápido del WT.

Este rasgo, junto con la observación de que las células *Msmeg_ΔfhaA* son más cortas, apunta a una localización más difusa de la maquinaria de síntesis de PG en esta cepa (Figura 52B-C y 53 B). Cabe destacar que la complementación de *Msmeg_ΔfhaA* permite recuperar por completo la síntesis polar de la pared celular y la incorporación asimétrica de PG (Figura 52B-C y Figura 53 A-B).

Debido a las diferencias bien documentadas en las tasas de crecimiento entre los polos viejo y nuevo, el septo en las micobacterias se ubica de manera asimétrica, en lugar de ubicarse exactamente en el centro de la célula, como sucede en otras bacterias. En consecuencia, existe una heterogeneidad considerable en el tamaño de las células que conforman una misma población. Como otro indicador de asimetría, evaluamos la posición del septo y la variabilidad de la longitud celular en *Msmeg_ΔfhaA*. En consonancia con la pérdida de crecimiento asimétrico, en la cepa *ko* para *fhaA* el septo se posiciona cerca del ecuador celular con mayor frecuencia que en la cepa WT. La asimetría en la posición septal se restaura después de la complementación (Figura 52E). La pérdida de crecimiento asimétrico en *Msmeg_ΔfhaA* se confirma además por una población más homogénea en longitud, en comparación con la cepa WT o la cepa complementada (Figura 52A).

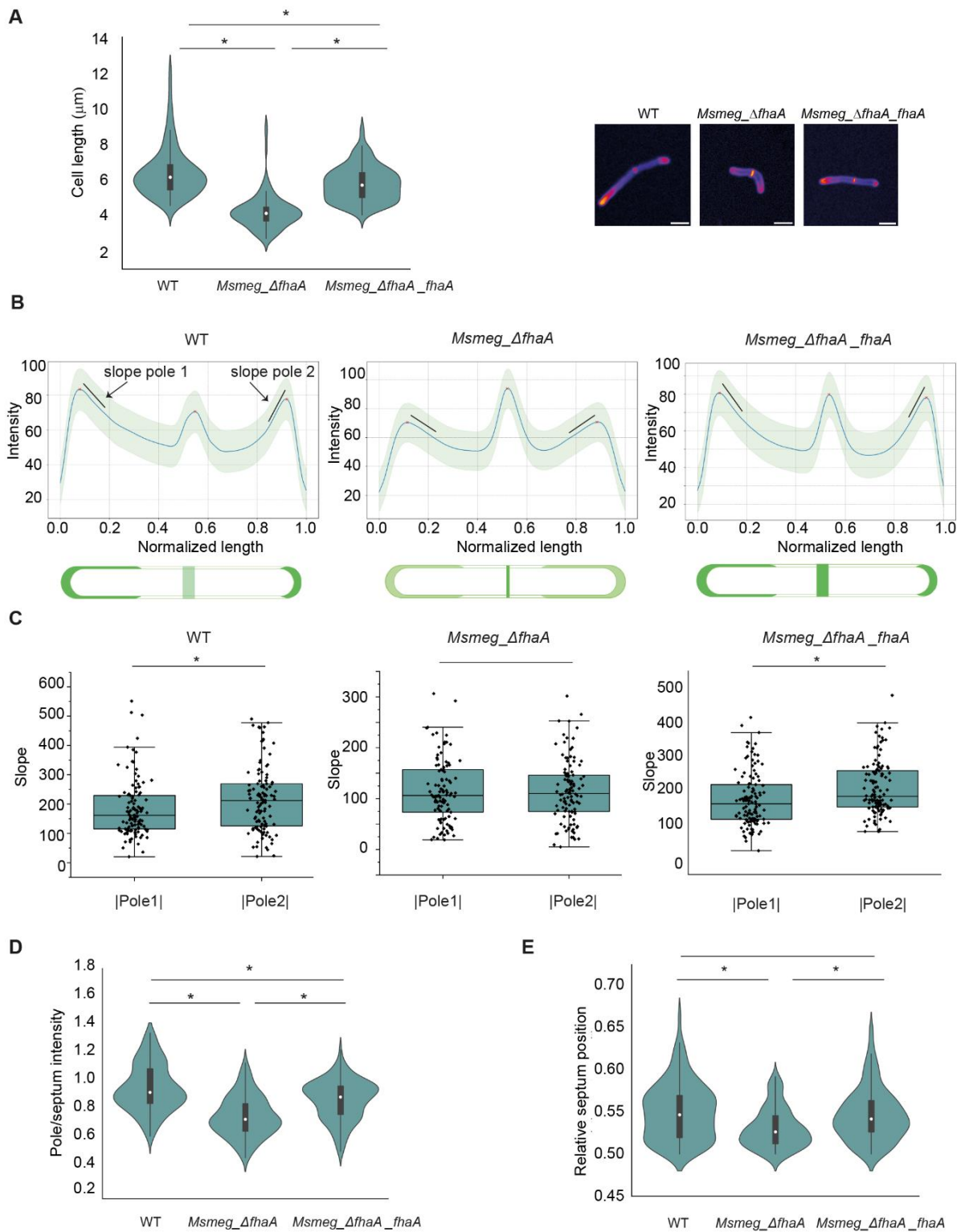


Figura 52: FhaA es necesaria para el crecimiento asimétrico. (A) Gráfico de violín e imágenes representativas que muestran diferencias de longitud entre cepas. Las células *Msmeg_ΔfhaA* son más cortas que las células WT y la longitud se recupera parcialmente después de la complementación. * indica una diferencia estadísticamente significativa determinada mediante la prueba de Kruskal-Wallis, $P < 0.05$; $n > 100$ células para cada grupo. Los círculos blancos representan la mediana; los cuadros grises representan el percentil 25%-75%; los valores fuera de los bigotes representan valores atípicos. Barra de escala 2 μm . (B) Perfiles promedio de fluorescencia HADA a lo largo de la célula para > 100 células septadas. La zona clara representa la DE. Los perfiles constan de tres picos correspondientes a ambos polos (denominados polo 1 y polo 2) y el septo. Para la cepa WT, la intensidad máxima se ubica en los polos, mientras que en *Msmeg_ΔfhaA* se ubica en el tabique. La cepa *Msmeg_ΔfhaA_fhaA* presenta un fenotipo intermedio que exhibe tres picos de intensidad comparable. Los esquemas que se encuentran debajo de los gráficos representan los patrones de deposición de HADA para cada cepa. (C) Box plots mostrando las pendientes promedio (líneas negras en los perfiles de fluorescencia) para los polos 1 y 2 ($n > 100$ células). Los gráficos confirman el crecimiento asimétrico para WT y *Msmeg_ΔfhaA_fhaA*. En el caso de la cepa *Msmeg_ΔfhaA* no se observan diferencias en la incorporación de HADA entre ambos polos. * indica una diferencia estadísticamente significativa determinada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov, $P < 0.05$; $n > 100$ células para cada grupo. El cuadro representa el percentil 25%-75% y la mediana; los valores fuera de los bigotes representan valores atípicos. (D) Gráfico de violín que ilustra el cociente entre la intensidad de fluorescencia en los polos (promedio de ambos) y la intensidad en el tabique. * indica una diferencia estadísticamente significativa determinada por ANOVA unidireccional. $P < 0.05$; $n > 100$ células para cada grupo. Los círculos blancos representan la mediana; los cuadros grises representan el percentil 25%-75%; los valores fuera de los bigotes representan valores atípicos. (E) Gráfico de violín mostrando la posición relativa del tabique en las cepas WT, *Msmeg_ΔfhaA* y *Msmeg_ΔfhaA_fhaA*. La posición asimétrica del tabique se pierde en la cepa *Msmeg_ΔfhaA* y se restaura completamente después de la complementación. * indica una diferencia estadísticamente significativa determinada por ANOVA de una vía. $P < 0.05$; $n > 100$ células para cada grupo. Los círculos blancos representan la mediana; los cuadros grises representan el percentil 25%-75%; los valores fuera de los bigotes representan valores atípicos.

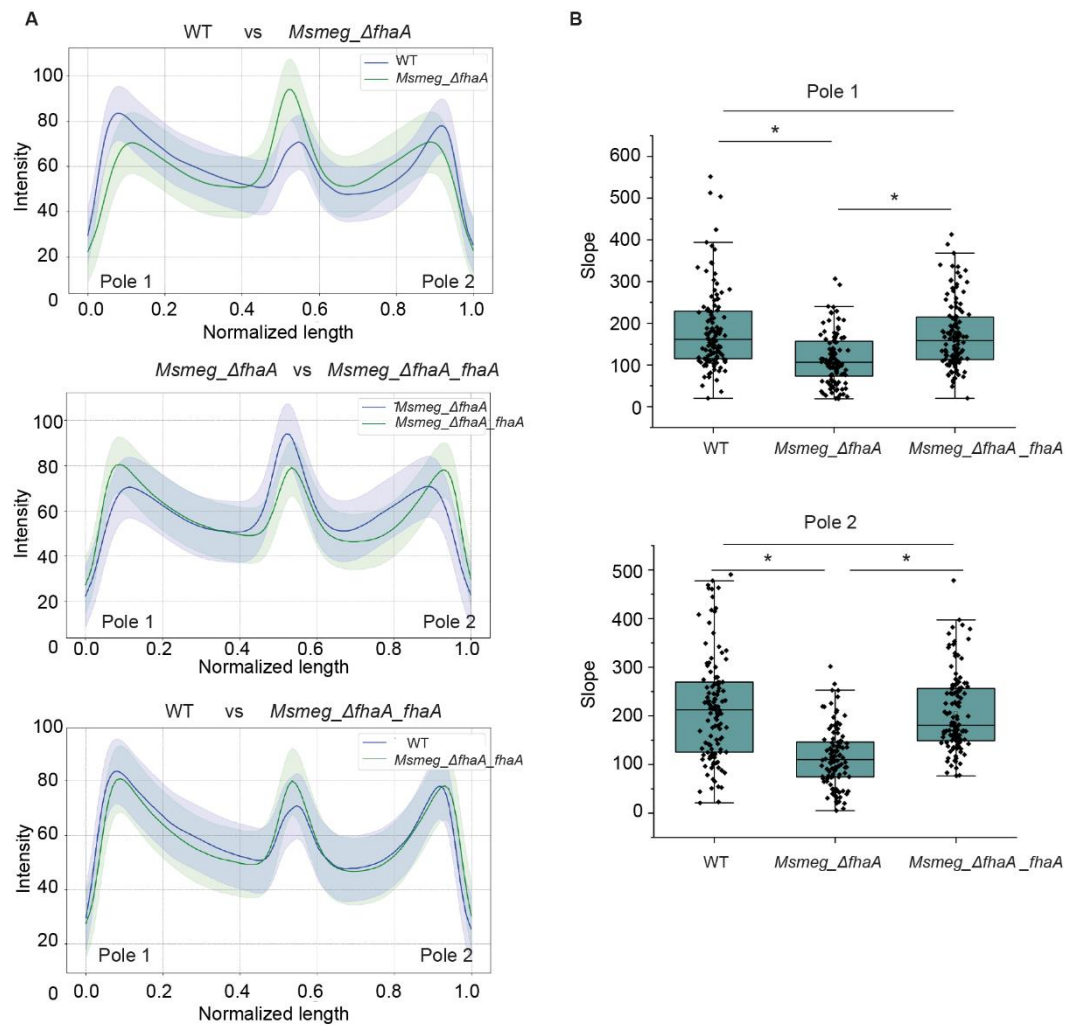


Figura 53: Comparación del perfil de fluorescencia en los polos (A) Alineamiento de los perfiles promedio de intensidad de fluorescencia del HADA entre las distintas cepas. Los perfiles individuales se normalizaron respecto al largo por razones comparativas. Los polos 1 y 2 corresponden al polo de crecimiento rápido y lento respectivamente. B) Box plots mostrando la comparación entre los promedios de las pendientes de los polos en los perfiles de intensidad de fluorescencia de HADA. Ambos polos de *Msmeg_ΔfhaA* tienen pendientes menores que los polos 1 y 2 WT y *Msmeg_ΔfhaA_fhaA*. * indica una diferencia estadísticamente significativa determinada por Kolmogorov-Smirnov, $P < 0.05$; $n > 100$ células para cada grupo. Los círculos blancos representan la mediana; los cuadros grises representan el percentil 25%-75%; los valores fuera de los bigotes representan valores atípicos.

Finalmente, utilizando una cepa de *M. smegmatis* que sobreexpresa FhaA fusionada a la proteína fluorescente mScarlet (*Msmeg_mscarlet_fhaA*), demostramos que FhaA no sólo se localiza en los polos y septos como había sido previamente reportado (Gee *et al*, 2012), sino que, además, lo hace preferencialmente en uno de los polos (Figura 54). Para determinar si FhaA se encuentra asociada al polo de crecimiento rápido o al lento, realizamos ensayos de microscopía, antes de que ocurriera la deslocalización de HADA, pero cuando la expresión de mScarlet-FhaA ya resulta evidente. De esta manera, logramos identificar con certeza los polos de crecimiento rápido y lento, ya que esta tarea se dificulta enormemente una vez que ocurre la deslocalización de la síntesis del peptidoglicano. Este enfoque nos permitió demostrar que FhaA se acumula preferentemente en el polo antiguo, o de crecimiento rápido (Fig. 54).

Un dato curioso que surge de este análisis es que además encontrarse localizada en septo y asimétricamente en los polos, otro sitio frecuente en que encontramos a la construcción m-Scarlet-FhaA corresponde a protuberancias y codos (Figura 54C). Estas protuberancias coinciden con las características morfológicas aberrantes observadas para en la cepa que sobreexpresa FhaA pero que están ausentes en la cepa control (Figuras 45A, 50 ByD). Estos resultados traen nuevamente a colación las observaciones de Nguyen *et al*, 2007 en donde la sobreexpresión de la proteína de andamiaje del elongasoma Wag31 genera una localización anormal de la maquinaria de síntesis de la pared celular, y esto conlleva a la formación de protuberancias y células ramificadas.

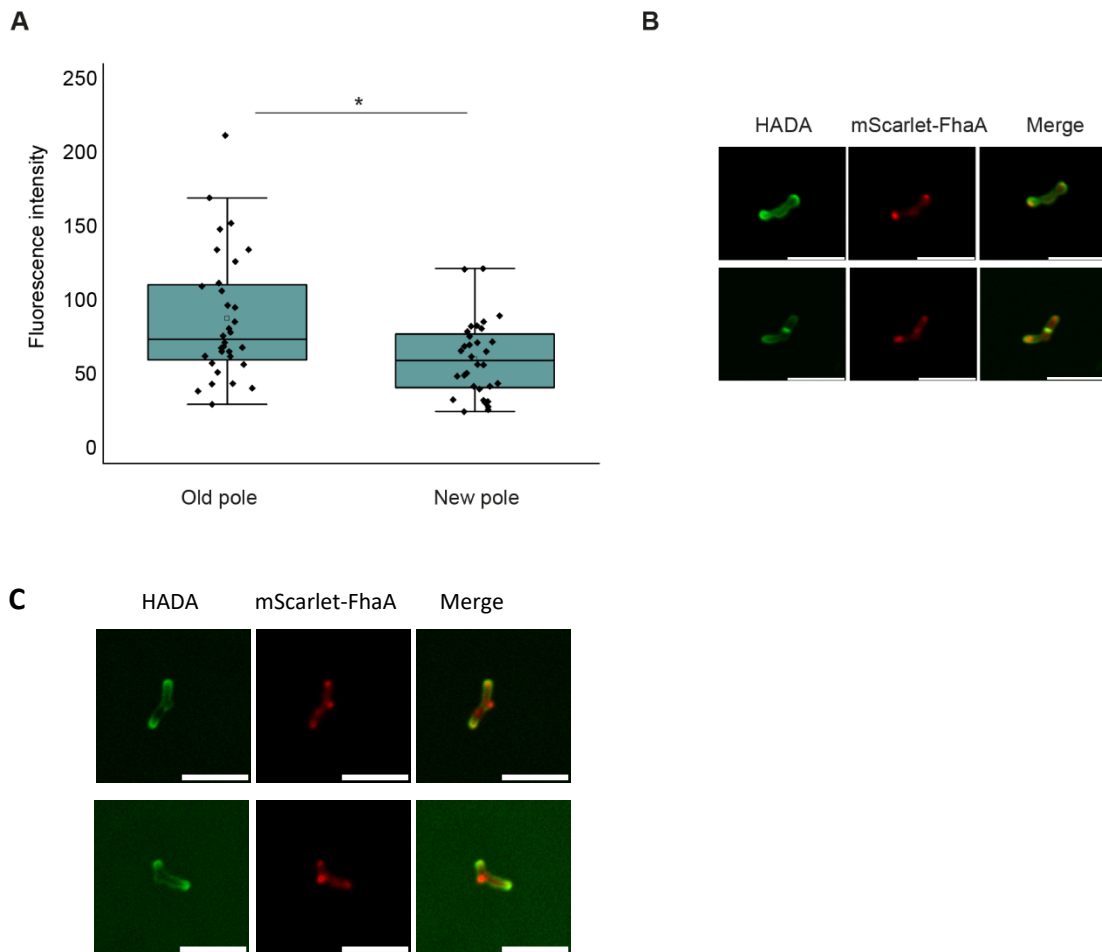


Figura 54: análisis de la localización de mScarlet-FhaA (A) Box plot mostrando las diferencias en la intensidad de fluorescencia de mScarlet-FhaA en ambos polos. Los polos se clasificaron como rápido o lento según el patrón de incorporación de HADA. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa determinada por test de Student ($p < 0.05$); $n = 30$ células. Los círculos blancos representan la mediana; los cuadros grises representan el percentil 25%-75%; los valores fuera de los bigotes representan valores atípicos. (B) Imágenes representativas de la cepa *Msmeg_mscarlet_fhaA* donde se observa la colocación de las señales de HADA y mScarlet-FhaA en los polos y el tabique. Barra de escala: 5 μm . (C) Imágenes representativas mostrando la co-localización de mScarlet-FhaA con las anomalías de forma consecuencia de la sobreexpresión de FhaA. Barra de escala: 5 μm .

En resumen, en este trabajo presentamos evidencia sólida de que FhaA es un factor clave en la elongación de las micobacterias, que se localiza predominantemente en el polo viejo y es crucial para la integridad de la envoltura celular y la asimetría del crecimiento polar. Por un lado, los resultados del interactoma de FhaA y la caracterización fenotípica de la cepa que la sobreexpresa indican que FhaA es parte de la maquinaria molecular responsable de la síntesis de la compleja envoltura celular de las micobacterias y que desempeña un papel funcional en este proceso biosintético.

Durante el crecimiento y la división celular, la síntesis de peptidoglicano es orquestada por dos complejos multiproteicos: el elongasoma, responsable de la elongación polar, y el divisoma, encargado de la división celular y la septación. El fenotipo de células cortas de *Msmeg_ΔfhaA*, junto con una menor incorporación de HADA en los polos, indica claramente que FhaA participa en la síntesis polar de péptidoglicano y en la elongación celular. Un estudio previo mostró que los niveles disminuidos de FhaA resultan en una mayor acumulación de precursores de peptidoglicano, proponiendo así que FhaA inhibe las etapas finales de la biosíntesis de PG a través de su interacción con la flipasa MviN (Gee et al, 2012). Nuestros resultados respaldan consistentemente el papel de FhaA en este proceso, pero nos permiten contrastar la hipótesis previa. Basándonos en los niveles de incorporación de HADA y en caracterizaciones morfológicas, planteamos la hipótesis de que FhaA promueve y no inhibe la síntesis de péptidoglicano.

En conjunto, nuestros resultados nos permiten establecer a FhaA como un integrante del elongasoma necesario para el crecimiento polar asimétrico. El hecho de que PgfA, el principal interactor FhaA, tenga el mismo patrón de localización subcelular que FhaA, y también cumpla un rol en el establecimiento de la asimetría celular respalda nuestros resultados (Gupta et al. 2022). Las bases moleculares del crecimiento asimétrico de las micobacterias todavía son poco conocidas. Se ha postulado que la distribución desigual de los componentes clave de la maquinaria de elongación celular, predominantemente concentrados en el polo viejo, es responsable de las diferentes tasas de crecimiento polar (Chung, Johnson, and Aldridge 2022; Jani et al. 2010; Kang et al. 2008; Kieser et al. 2015).

En este sentido se ha propuesto un modelo de crecimiento bifásico, en el cual el polo nuevo experimenta una fase inicial de crecimiento más lento, durante la cual Wag31 y otros integrantes del elongasoma se acumulan, seguida de un período de crecimiento rápido antes del siguiente ciclo de división (Hannebelle et al. 2020).

Diversos resultados obtenidos en esta tesis apuntan a que FhaA influye directamente en la correcta y precisa localización subcelular de la maquinaria de síntesis de pared celular. En primer lugar, la sobreexpresión de FhaA provoca la incorporación de HADA en múltiples puntos focales a lo largo de la célula, así como en los polos y septos, un fenotipo que no se debe a un aumento en los niveles de Wag31, sino que parece estar directamente relacionado con los niveles alterados de FhaA. Paralelamente, los resultados de TEM y TE revelan un engrosamiento localizado y heterogéneo de la pared celular, lo que sugiere fuertemente que estas áreas anómalas de la pared pueden correlacionarse con los focos adicionales de incorporación de HADA y la deslocalización de la maquinaria del elongasoma. De manera consistente, en la cepa que carece de FhaA, la incorporación de HADA se extiende sobre una región más amplia en los polos, superando incluso el área observada en el polo de crecimiento rápido de la cepa WT. Dado que las células de *Msmeg_ΔfhaA* son más cortas, esta expansión del área de incorporación de HADA sugiere que la maquinaria biosintética está menos restringida espacialmente en los polos, en lugar de indicar un crecimiento acelerado. En conjunto, nuestros resultados indican que FhaA participa en la regulación de la localización precisa del elongasoma y su actividad biosintética. Estos resultados fueron recientemente publicados, se adjunta el artículo en el anexo.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Nuestros resultados apuntan a que GlnA1 representa un nuevo sustrato de PknG. Mediante espectrometría de masa corroboramos que GlnA1 es fosforilada por PknG *in vitro* e identificamos tres residuos como sitios específicamente fosforilados, uno de ellos, el residuo de Ser57, de importancia en la actividad catalítica.

Desafortunadamente, no pudimos identificar sitios fosforilados *in vivo*. Esto puede deberse a varios factores, como la baja abundancia de péptidos fosforilados o la ausencia de fosforilación en las condiciones ensayadas. Es posible que la fosforilación posea un rol importante en el marco de la infección, donde los aminoácidos aspartato y glutamato son una fuente fundamental de nitrógeno y por tanto la actividad de GlnA1 es vital (Lima et al, 2012). En dicho contexto es posible que *M. smegmatis* no sea un buen modelo para el estudio de esta proteína, ya que es incapaz de sobrevivir dentro de los macrófagos. También existe la posibilidad de que la fosforilación ocurra bajo una condición de crecimiento particular, diferente a las ensayadas por nosotros en este trabajo, o incluso o en una fracción subcelular distinta, como por ejemplo la fracción secretada, donde se sabe que GlnA1 es un componente fundamental. Por otra parte, desconocemos si la fosforilación ocurre en el contexto de la proteína monomérica o en el dodecámero. Esta fosforilación del monómero, de ocurrir *in vivo*, no afectaría el estado de oligomerización, pero sí podría tener un rol sobre la regulación de la actividad, de acuerdo a los resultados obtenidos en el mutante fosfomimético.

Cabe destacar que además de que la fosforilación por PknG es sub-estequiométrica e involucra una pequeña fracción de las moléculas de GlnA1 (lo que puede impedir su detección por espectrometría de masa) la detección de fosfopéptidos sin un paso previo de enriquecimiento, es difícil, debido a que existe supresión iónica por péptidos no modificados (Mann et al 2002, Dephore et al 2013)

GlnA1 juega un papel clave en la supervivencia bacteriana dentro del huésped, ya que no solo regula la síntesis del polímero de pared poli L-glutamato/glutamina, sino también la asimilación de amonio por la bacteria. La asimilación de nitrógeno podría incluso tener un efecto en la inhibición de la acidificación lisosomal, ya que regula de la concentración de

amonio libre en el fagosoma y por tanto podría impactar sobre la acidez del mismo. Interesantemente, GlnA1 está involucrada en la misma ruta metabólica que GarA, KGD y GDH, otras tres enzimas reguladas directa o indirectamente por PknG.

La síntesis y actividad de GlnA1 están estrechamente reguladas a distintos niveles y, en particular, la AMPilación reversible del residuo conservado Tyr406 es un mecanismo de regulación bien establecido. Nuestros resultados abren la posibilidad de que la fosforilación de proteínas también participe en la modulación de dicha actividad.

En suma, nuestros resultados sugieren fuertemente que GlnA1 es un nuevo sustrato de PknG. Sin embargo, el efecto específico de la fosforilación sobre su actividad, estado de oligomerización, así como su posible rol en la acidificación lisosomal aún no se ha establecido. La elucidación de estos eventos requiere de más experimentos para verificar esta hipótesis.

En la presente tesis investigamos el rol de la proteína FhaA. Nuestros resultados indican que FhaA es una proteína perteneciente al elongasoma y que no sólo posee un rol central en el crecimiento asimétrico, sino que además, ella misma se distribuye asimétricamente entre los polos, al igual que fue observado para otros determinantes de asimetría (Gupta et al, 2022). Un resultado sorprendente fue la identificación de la proteína MSMEG_0692 como uno de los principales interactores de FhaA. A través de análisis *in silico*, observamos que esta proteína, de función aún desconocida, contiene un dominio con una alta homología estructural a MreB. Este hallazgo desafía el paradigma vigente, que sostiene que las micobacterias no utilizan un homólogo de la actina para su crecimiento. Ensayos preliminares en los que expresamos MSMEG_0692 como proteína de fusión a la proteína fluorescente mScarlet en un plásmido de baja expresión en *Mycobacterium smegmatis*, muestran no sólo que se localiza específicamente en los polos y septos, los sitios en donde ocurren la elongación y división celular respectivamente, sino que además, presenta una distribución asimétrica entre los polos. Interesantemente, este es el mismo patrón de distribución que observamos para FhaA. Estos resultados establecen la base para futuras investigaciones de gran potencial.

Durante la realización de este trabajo obtuvimos múltiples resultados que establecen nuevas interrogantes interesantes de abordar. Una observación que surge del análisis de la cepa sobreexpresante de FhaA es la aparición de aberraciones morfológicas como el engrosamiento y curvatura de los polos, así como múltiples sitios presentando abultamientos codos, y zonas engrosadas. Cuando observamos la localización de la construcción m-Scarlet-FhaA en la célula, vemos que además de encontrarse en polos y septos la misma frecuentemente se localiza en dichas protuberancias y codos. En este contexto consideramos que sería interesante realizar ensayos de microscopía confocal en un *background* alterado de FhaA y Wag31. Observar la localización de una de estas proteínas en ausencia de la otra sería fundamental para establecer un sentido en la cascada de eventos. Por otra parte, si bien se ha propuesto que Wag31 es reclutada a los polos a través del reconocimiento de curvatura de la envoltura (Meniche et al, 2014), esto es tema de debate. Consideramos que la realización de ensayos de *time lapse* en los *backgrounds* planteados nos permitiría dilucidar si la acumulación de FhaA y Wag31 son dependientes una de otra, y qué evento ocurre en primer lugar, si la formación de la curvatura, o el reclutamiento de estas proteínas en sitios curvos.

Finalmente, si bien el presente trabajo representa un aporte importante al estado del conocimiento; aún quedan preguntas abiertas que abordar, como la elucidación del mecanismo a través del cual FhaA ejerce su acción biológica, y el rol de la fosforilación en la regulación de dicho mecanismo.

BIBLIOGRAFÍA

Aldridge, Bree B., Marta Fernandez-Suarez, Danielle Heller, Vijay Ambravaneswaran, Daniel Irimia, Mehmet Toner, and Sarah M. Fortune. 2012. "Asymmetry and Aging of Mycobacterial Cells Lead to Variable Growth and Antibiotic Susceptibility." *Science* 335(6064):100–104. doi: 10.1126/science.1216166.

Amon, Johannes, Fritz Titgemeyer, and Andreas Burkovski. 2009. "A Genomic View on Nitrogen Metabolism and Nitrogen Control in Mycobacteria." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 17(1):20–29. doi: 10.1159/000159195.

Av-Gay, Yossef, and Martin Everett. 2000. "The Eukaryotic-like Ser/Thr Protein Kinases of Mycobacterium Tuberculosis." *Trends in Microbiology* 8(5):238–44. doi: 10.1016/S0966-842X(00)01734-0.

Bansal-Mutalik, Ritu, and Hiroshi Nikaido. 2014. "Mycobacterial Outer Membrane Is a Lipid Bilayer and the Inner Membrane Is Unusually Rich in Diacyl Phosphatidylinositol Dimannosides." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(13):4958–63. doi: 10.1073/pnas.1403078111.

Belardinelli, Juan Manuel, Casey M. Stevens, Wei Li, Yong Zi Tan, Victoria Jones, Filippo Mancia, Helen I. Zgurskaya, and Mary Jackson. 2019. "The MmpL3 Interactome Reveals a Complex Crosstalk between Cell Envelope Biosynthesis and Cell Elongation and Division in Mycobacteria." *Scientific Reports* 9(1):10728. doi: 10.1038/s41598-019-47159-8.

Bellinzoni, M., A. M. Wehenkel, R. Duran, and P. M. Alzari. 2019. "Novel Mechanistic Insights into Physiological Signaling Pathways Mediated by Mycobacterial Ser/Thr Protein Kinases." *Microbes Infect* 21(5–6):222–29. doi: 10.1016/j.micinf.2019.06.015.

Bhatt, Apoorva, Virginie Molle, Gurdyal S. Besra, William R. Jacobs Jr, and Laurent Kremer. 2007. "The Mycobacterium Tuberculosis FAS-II Condensing Enzymes: Their Role in Mycolic Acid Biosynthesis, Acid-Fastness, Pathogenesis and in Future Drug Development." *Molecular Microbiology* 64(6):1442–54. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05761.x.

Bindels, Daphne S., Lindsay Haarbosch, Laura Van Weeren, Marten Postma, Katrin E. Wiese, Marieke Mastop, Sylvain Aumonier, Guillaume Gotthard, Antoine Royant, and Mark A. Hink. 2017. "mScarlet: A Bright Monomeric Red Fluorescent Protein for Cellular Imaging." *Nature Methods* 14(1):53–56.

Blatch, G. L., and M. Lässle. 1999. "The Tetratricopeptide Repeat: A Structural Motif Mediating Protein-Protein Interactions." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 21(11):932–39. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199911)21:11<932::AID-BIES5>3.0.CO;2-N.

Boitel, B., M. Ortiz-Lombardía, R. Durán, F. Pompeo, S. T. Cole, C. Cerveñansky, and P. M. Alzari. 2003. "PknB Kinase Activity Is Regulated by Phosphorylation in Two Thr Residues and Dephosphorylation by PstP, the Cognate Phospho-Ser/Thr Phosphatase, in Mycobacterium Tuberculosis." *Molecular Microbiology* 49(6). doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03657.x.

Brennan, P. J. 2003. "Structure, Function, and Biogenesis of the Cell Wall of Mycobacterium Tuberculosis." *Tuberculosis (Edinb)* 83(1–3):91–97. doi: 10.1016/s1472-9792(02)00089-6.

Brennan, P. J., and H. Nikaido. 1995. "The Envelope of Mycobacteria." *Annual Review of Biochemistry* 64:29–63. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000333.

- Brites, Daniela, and Sebastien Gagneux. 2015. "Co-Evolution of Mycobacterium Tuberculosis and Homo Sapiens." *Immunological Reviews* 264(1):6–24. doi: 10.1111/imr.12264.
- Cambier, C. J., Stanley Falkow, and Lalita Ramakrishnan. 2014. "Host Evasion and Exploitation Schemes of Mycobacterium Tuberculosis." *Cell* 159(7):1497–1509. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.024.
- Cameron, Todd A., and William Margolin. 2024. "Insights into the Assembly and Regulation of the Bacterial Divisome." *Nature Reviews Microbiology* 22(1):33–45.
- Campolo, Nicolás, Mauricio Mastrogiiovanni, Michele Mariotti, Federico M. Issoglio, Darío Estrin, Per Häggglund, Tilman Grune, Michael J. Davies, Silvina Bartesaghi, and Rafael Radi. 2023. "Multiple Oxidative Post-Translational Modifications of Human Glutamine Synthetase Mediate Peroxynitrite-Dependent Enzyme Inactivation and Aggregation." *The Journal of Biological Chemistry* 299(3):102941. doi: 10.1016/j.jbc.2023.102941.
- Carette, Xavier, John Platig, David C. Young, Michaela Helmel, Albert T. Young, Zhe Wang, Lakshmi-Prasad Potluri, Cameron Stuver Moody, Jumei Zeng, and Sladjana Priscic. 2018. "Multisystem Analysis of Mycobacterium Tuberculosis Reveals Kinase-Dependent Remodeling of the Pathogen-Environment Interface." *MBio* 9(2):10–1128.
- Carroll, Paul, Carey A. Pashley, and Tanya Parish. 2008. "Functional Analysis of GlnE, an Essential Adenylyl Transferase in Mycobacterium Tuberculosis." *Journal of Bacteriology* 190(14):4894–4902.
- Cashmore, T. J., S. Klatt, Y. Yamaro-Botte, R. Brammananth, A. K. Rainczuk, M. J. McConville, P. K. Crellin, and R. L. Coppel. 2017. "Identification of a Membrane Protein Required for Lipomannan Maturation and Lipoarabinomannan Synthesis in Corynebacterineae." *J Biol Chem* 292(12):4976–86. doi: 10.1074/jbc.M116.772202.
- Chakraborty, P., and A. Kumar. 2019. "The Extracellular Matrix of Mycobacterial Biofilms: Could We Shorten the Treatment of Mycobacterial Infections?" *Microb Cell* 6(2):105–22. doi: 10.15698/mic2019.02.667.
- Chung, Eun Seon, William C. Johnson, and Bree B. Aldridge. 2022. "Types and Functions of Heterogeneity in Mycobacteria." *Nature Reviews Microbiology* 20(9):529–41. doi: 10.1038/s41579-022-00721-0.
- Cole, STea, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, SV Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, and CE Barry Iii. 1998. "Deciphering the Biology of Mycobacterium Tuberculosis from the Complete Genome Sequence." *Nature* 396(6707):190–190.
- Cole, Stewart T., K. Eiglmeier, J. Parkhill, KD James, NR Thomson, PR Wheeler, N. Honore, T. Garnier, C. Churcher, and D. Harris. 2001. "Massive Gene Decay in the Leprosy Bacillus." *Nature* 409(6823):1007–11.
- Cowley, Siobhan, Mary Ko, Neora Pick, Rayken Chow, Katrina J. Downing, Bhavna G. Gordhan, Joanna C. Betts, Valerie Mizrahi, Debbie A. Smith, Richard W. Stokes, and Yossef Av-Gay. 2004. "The Mycobacterium Tuberculosis Protein Serine/Threonine Kinase PknG Is Linked to Cellular Glutamate/Glutamine Levels and Is Important for Growth in Vivo." *Molecular Microbiology* 52(6):1691–1702. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04085.x.

van Crevel, Reinout, Tom H. M. Ottenhoff, and Jos W. M. van der Meer. 2002. "Innate Immunity to Mycobacterium Tuberculosis." *Clinical Microbiology Reviews* 15(2):294–309. doi: 10.1128/CMR.15.2.294-309.2002.

Daniel, Thomas M. 2006. "The History of Tuberculosis." *Respiratory Medicine* 100(11):1862–70. doi: 10.1016/j.rmed.2006.08.006.

Datta, Pratik, Arunava Dasgupta, Anil Kumar Singh, Partha Mukherjee, Manikuntala Kundu, and Joyoti Basu. 2006. "Interaction between FtsW and Penicillin-Binding Protein 3 (PBP3) Directs PBP3 to Mid-Cell, Controls Cell Septation and Mediates the Formation of a Trimeric Complex Involving FtsZ, FtsW and PBP3 in Mycobacteria." *Molecular Microbiology* 62(6):1655–73. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05491.x.

Dephoure, Noah, Kathleen L. Gould, Steven P. Gygi, and Douglas R. Kellogg. 2013. "Mapping and Analysis of Phosphorylation Sites: A Quick Guide for Cell Biologists." *Molecular Biology of the Cell* 24(5):535–42. doi: 10.1091/mbc.E12-09-0677.

Domínguez-Escobar, Julia, Arnaud Chastanet, Alvaro H. Crevenna, Vincent Fromion, Roland Wedlich-Söldner, and Rut Carballido-López. 2011. "Processive Movement of MreB-Associated Cell Wall Biosynthetic Complexes in Bacteria." *Science (New York, N.Y.)* 333(6039):225–28. doi: 10.1126/science.1203466.

Donovan, C., and M. Bramkamp. 2014. "Cell Division in Corynebacterineae." *Front Microbiol* 5:132. doi: 10.3389/fmicb.2014.00132.

Durán, R., A. Villarino, M. Bellinzoni, A. Wehenkel, P. Fernandez, B. Boitel, S. T. Cole, P. M. Alzari, and C. Cerveñansky. 2005. "Conserved Autophosphorylation Pattern in Activation Loops and Juxtamembrane Regions of Mycobacterium Tuberculosis Ser/Thr Protein Kinases." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333(3):858–67. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.173.

England, Patrick, Annemarie Wehenkel, Sonia Martins, Sylviane Hoos, Gwénaëlle André-Leroux, Andrea Villarino, and Pedro M. Alzari. 2009. "The FHA-Containing Protein GarA Acts as a Phosphorylation-Dependent Molecular Switch in Mycobacterial Signaling." *FEBS Letters* 583(2):301–7. doi: 10.1016/j.febslet.2008.12.036.

Eraso, Jesus M., and William Margolin. 2011. "Bacterial Cell Wall: Thinking Globally, Actin Locally." *Current Biology* 21(16):R628–30. doi: 10.1016/j.cub.2011.06.056.

Fay, Allison, Nadine Czudnochowski, Jeremy M. Rock, Jeffrey R. Johnson, Nevan J. Krogan, Oren Rosenberg, and Michael S. Glickman. 2019. "Two Accessory Proteins Govern MmpL3 Mycolic Acid Transport in Mycobacteria." *mBio* 10(3):e00850-19. doi: 10.1128/mBio.00850-19.

Fernandez, Pablo, Brigitte Saint-Joanis, Nathalie Barilone, Mary Jackson, Brigitte Gicquel, Stewart T. Cole, and Pedro M. Alzari. 2006. "The Ser/Thr Protein Kinase PknB Is Essential for Sustaining Mycobacterial Growth." *Journal of Bacteriology* 188(22):7778–84. doi: 10.1128/jb.00963-06.

Forrellad, Marina Andrea, Michael McNeil, María Paz Santangelo, Federico Carlos Blanco, Elizabeth García, Laura Inés Klepp, Jason Huff, Michael Niederweis, Mary Jackson, and Fabiana Bigi. 2014. "Role of the Mce1 Transporter in the Lipid Homeostasis of Mycobacterium Tuberculosis." *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 94(2):170–77. doi: 10.1016/j.tube.2013.12.005.

Gagneux, Sebastien. 2012. "Host–Pathogen Coevolution in Human Tuberculosis." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367(1590):850–59. doi: 10.1098/rstb.2011.0316.

Garner, Ethan C., Remi Bernard, Wenqin Wang, Xiaowei Zhuang, David Z. Rudner, and Tim Mitchison. 2011. "Coupled, Circumferential Motions of the Cell Wall Synthesis Machinery and MreB Filaments in *B. Subtilis*." *Science (New York, N.Y.)* 333(6039):222–25. doi: 10.1126/science.1203285.

Gawronski, Jeffrey D., and David R. Benson. 2004. "Microtiter Assay for Glutamine Synthetase Biosynthetic Activity Using Inorganic Phosphate Detection." *Analytical Biochemistry* 327(1):114–18. doi: 10.1016/j.ab.2003.12.024.

Gee, C. L., K. G. Papavinasasundaram, S. R. Blair, C. E. Baer, A. M. Falick, D. S. King, J. E. Griffin, H. Venghatakrishnan, A. Zukauskas, J. R. Wei, R. K. Dhiman, D. C. Crick, E. J. Rubin, C. M. Sassetti, and T. Alber. 2012. "A Phosphorylated Pseudokinase Complex Controls Cell Wall Synthesis in *Mycobacteria*." *Sci Signal* 5(208):ra7. doi: 10.1126/scisignal.2002525.

Gil, M., A. Lima, B. Rivera, J. Rossello, E. Urdaniz, A. Cascioferro, F. Carrion, A. Wehenkel, M. Bellinzoni, C. Batthyany, O. Pritsch, A. Denicola, M. N. Alvarez, P. C. Carvalho, M. N. Lisa, R. Brosch, M. Piuri, P. M. Alzari, and R. Duran. 2019. "New Substrates and Interactors of the *Mycobacterial* Serine/Threonine Protein Kinase PknG Identified by a Tailored Interactomic Approach." *J Proteomics* 192:321–33. doi: 10.1016/j.jprot.2018.09.013.

Ginda, Katarzyna, Martyna Bezulska, Małgorzata Ziółkiewicz, Jarosław Dziadek, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska, and Dagmara Jakimowicz. 2013. "ParA of *Mycobacterium Smegmatis* Co-ordinates Chromosome Segregation with the Cell Cycle and Interacts with the Polar Growth Determinant DivIVA." *Molecular Microbiology* 87(5):998–1012.

Gupta, K. R., C. M. Gwin, K. C. Rahlwes, K. J. Biegas, C. Wang, J. H. Park, J. Liu, B. M. Swarts, Y. S. Morita, and E. H. Rego. 2022. "An Essential Periplasmic Protein Coordinates Lipid Trafficking and Is Required for Asymmetric Polar Growth in *Mycobacteria*." *Elife* 11. doi: 10.7554/eLife.80395.

Gurcha, S. S., A. R. Baulard, L. Kremer, C. Locht, D. B. Moody, W. Muhlecker, C. E. Costello, D. C. Crick, P. J. Brennan, and G. S. Besra. 2002. "Ppm1, a Novel Polyprenol Monophosphomannose Synthase from *Mycobacterium Tuberculosis*." *Biochem J* 365(Pt 2):441–50. doi: 10.1042/BJ20020107.

Gutierrez, M. Cristina, Sylvain Brisse, Roland Brosch, Michel Fabre, Bahia Omaïs, Magali Marmiesse, Philip Supply, and Veronique Vincent. 2005. "Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium Tuberculosis*." *PLOS Pathogens* 1(1):e5. doi: 10.1371/journal.ppat.0010005.

Hagelueken, Gregor, Lutz Wiehlmann, Thorsten M. Adams, Harald Kolmar, Dirk W. Heinz, Burkhard Tümmler, and Wolf-Dieter Schubert. 2007. "Crystal Structure of the Electron Transfer Complex Rubredoxin Rubredoxin Reductase of *Pseudomonas Aeruginosa*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(30):12276–81. doi: 10.1073/pnas.0702919104.

Hannebelle, Mélanie T. M., Joëlle X. Y. Ven, Chiara Toniolo, Haig A. Eskandarian, Gaëlle Vuaridel-Thurre, John D. McKinney, and Georg E. Fantner. 2020. "A Biphasic Growth Model for Cell Pole

Elongation in Mycobacteria." *Nature Communications* 11(1):452. doi: 10.1038/s41467-019-14088-z.

Harper, Catriona, Don Hayward, Ian Wiid, and Paul van Helden. 2008. "Regulation of Nitrogen Metabolism in Mycobacterium Tuberculosis: A Comparison with Mechanisms in Corynebacterium Glutamicum and Streptomyces Coelicolor." *IUBMB Life* 60(10):643–50. doi: 10.1002/iub.100.

Harth, G., D. L. Clemens, and M. A. Horwitz. 1994. "Glutamine Synthetase of Mycobacterium Tuberculosis: Extracellular Release and Characterization of Its Enzymatic Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(20):9342–46. doi: 10.1073/pnas.91.20.9342.

Harth, G., and M. A. Horwitz. 1999. "An Inhibitor of Exported Mycobacterium Tuberculosis Glutamine Synthetase Selectively Blocks the Growth of Pathogenic Mycobacteria in Axenic Culture and in Human Monocytes: Extracellular Proteins as Potential Novel Drug Targets." *The Journal of Experimental Medicine* 189(9):1425–36. doi: 10.1084/jem.189.9.1425.

Harth, Günter, and Marcus A. Horwitz. 1997. "Expression and Efficient Export of Enzymatically Active Mycobacterium Tuberculosis Glutamine Synthetase in Mycobacterium Smegmatis and Evidence That the Information for Export Is Contained within the Protein *." *Journal of Biological Chemistry* 272(36):22728–35. doi: 10.1074/jbc.272.36.22728.

Harth, Günter, Saša Masleša-Galić, Michael V. Tullius, and Marcus A. Horwitz. 2005. "All Four Mycobacterium Tuberculosis glnA Genes Encode Glutamine Synthetase Activities but Only GlnA1 Is Abundantly Expressed and Essential for Bacterial Homeostasis." *Molecular Microbiology* 58(4):1157–72. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04899.x.

Harth, Günter, Paul C. Zamecnik, Jin-Yan Tang, David Tabatadze, and Marcus A. Horwitz. 2000. "Treatment of Mycobacterium Tuberculosis with Antisense Oligonucleotides to Glutamine Synthetase mRNA Inhibits Glutamine Synthetase Activity, Formation of the Poly-l-Glutamate/Glutamine Cell Wall Structure, and Bacterial Replication." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(1):418–23.

Hett, Erik C., Michael C. Chao, and Eric J. Rubin. 2010. "Interaction and Modulation of Two Antagonistic Cell Wall Enzymes of Mycobacteria." *PLoS Pathogens* 6(7):e1001020.

Houben, Edith N. G., Anne Walburger, Giorgio Ferrari, Liem Nguyen, Charles J. Thompson, Christian Miess, Guido Vogel, Bernd Mueller, and Jean Pieters. 2009. "Differential Expression of a Virulence Factor in Pathogenic and Non-Pathogenic Mycobacteria." *Molecular Microbiology* 72(1):41–52. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06612.x.

Jani, Charul, Hyungjin Eoh, Jae Jin Lee, Khozima Hamasha, Moodakare Bheema Sahana, Jeong-Sun Han, Seeta Nyayapathy, Jung-Yeon Lee, Joo-Won Suh, Sang Hee Lee, Steve J. Rehse, Dean C. Crick, and Choong-Min Kang. 2010. "Regulation of Polar Peptidoglycan Biosynthesis by Wag31 Phosphorylation in Mycobacteria." *BMC Microbiology* 10(1):327. doi: 10.1186/1471-2180-10-327.

Jankute, Monika, Jonathan A. G. Cox, James Harrison, and Gurdyal S. Besra. 2015. "Assembly of the Mycobacterial Cell Wall." *Annual Review of Microbiology* 69:405–23. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104121.

Jarlier, Vincent, and Hiroshi Nikaido. 1994. "Mycobacterial Cell Wall: Structure and Role in Natural Resistance to Antibiotics." *FEMS Microbiology Letters* 123(1–2):11–18. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07194.x.

Jenkins, Victoria A., Brian D. Robertson, and Kerstin J. Williams. 2012. "Aspartate D48 Is Essential for the GlnR-Mediated Transcriptional Response to Nitrogen Limitation in *Mycobacterium Smegmatis*." *FEMS Microbiology Letters* 330(1):38–45.

Jones, L. J., R. Carballido-López, and J. Errington. 2001. "Control of Cell Shape in Bacteria: Helical, Actin-like Filaments in *Bacillus Subtilis*." *Cell* 104(6):913–22. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00287-2.

Joyce, Graham, Kerstin J. Williams, Matthew Robb, Elke Noens, Barbara Tizzano, Vahid Shahrezaei, and Brian D. Robertson. 2012. "Cell Division Site Placement and Asymmetric Growth in *Mycobacteria*" edited by A. Driks. *PLoS ONE* 7(9):e44582. doi: 10.1371/journal.pone.0044582.

Kang, C. M., S. Nyayapathy, J. Y. Lee, J. W. Suh, and R. N. Husson. 2008. "Wag31, a Homologue of the Cell Division Protein DivIVA, Regulates Growth, Morphology and Polar Cell Wall Synthesis in *Mycobacteria*." *Microbiology* 154(Pt 3):725–35. doi: 10.1099/mic.0.2007/014076-0.

Kang, Choong-Min, Derek W. Abbott, Sang Tae Park, Christopher C. Dascher, Lewis C. Cantley, and Robert N. Husson. 2005. "The *Mycobacterium Tuberculosis* Serine/Threonine Kinases PknA and PknB: Substrate Identification and Regulation of Cell Shape." *Genes & Development* 19(14):1692–1704. doi: 10.1101/gad.1311105.

Kieser, Karen J., Cara C. Boutte, Jemila C. Kester, Christina E. Baer, Amy K. Barczak, Xavier Meniche, Michael C. Chao, E. Hesper Rego, Christopher M. Sassetti, Sarah M. Fortune, and Eric J. Rubin. 2015. "Phosphorylation of the Peptidoglycan Synthase PonA1 Governs the Rate of Polar Elongation in *Mycobacteria*" edited by M. A. Behr. *PLOS Pathogens* 11(6):e1005010. doi: 10.1371/journal.ppat.1005010.

Kieser, Karen J., and Eric J. Rubin. 2014. "How Sisters Grow Apart: *Mycobacterial* Growth and Division." *Nature Reviews Microbiology* 12(8):550–62. doi: 10.1038/nrmicro3299.

Konomi, Nami, Eve Lebwohl, Ken Mowbray, Ian Tattersall, and David Zhang. 2002. "Detection of *Mycobacterial* DNA in Andean Mummies." *Journal of Clinical Microbiology* 40(12):4738–40.

Kuru, Erkin, Srinivas Tekkam, Edward Hall, Yves V. Brun, and Michael S. Van Nieuwenhze. 2015. "Synthesis of Fluorescent D-Amino Acids and Their Use for Probing Peptidoglycan Synthesis and Bacterial Growth in Situ." *Nature Protocols* 10(1):33–52.

Kusebauch, Ulrike, Corrie Ortega, Anja Ollodart, Richard S. Rogers, David R. Sherman, Robert L. Moritz, and Christoph Grundner. 2014. "*Mycobacterium Tuberculosis* Supports Protein Tyrosine Phosphorylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(25):9265–70. doi: 10.1073/pnas.1323894111.

Laneelle, M. A., J. Nigou, and M. Daffe. 2015. "Lipid and Lipoarabinomannan Isolation and Characterization." *Methods Mol Biol* 1285:77–103. doi: 10.1007/978-1-4939-2450-9_5.

Lee, Jae-Hyun, Haeri Jeong, Younhee Kim, and Heung-Shick Lee. 2020. "*Corynebacterium Glutamicum whiA* Plays Roles in Cell Division, Cell Envelope Formation, and General Cell Physiology." *Antonie van Leeuwenhoek* 113:629–41.

- Lisa, M. N., A. Sagues, N. Barilone, M. Baumgart, M. Gil, M. Graña, R. Durán, R. M. Biondi, M. Bellinzoni, M. Bott, and P. M. Alzari. 2021. "A Tetratricopeptide Repeat Scaffold Couples Signal Detection to OdhI Phosphorylation in Metabolic Control by the Protein Kinase PknG." *mBio* 12(5). doi: 10.1128/mBio.01717-21.
- Liu, Jun, Clifton E. Barry, Gurdyal S. Besra, and Hiroshi Nikaido. 1996. "Mycolic Acid Structure Determines the Fluidity of the Mycobacterial Cell Wall*." *Journal of Biological Chemistry* 271(47):29545–51. doi: 10.1074/jbc.271.47.29545.
- Lougheed, K. E., M. H. Bennett, and H. D. Williams. 2014. "An in Vivo Crosslinking System for Identifying Mycobacterial Protein-Protein Interactions." *J Microbiol Methods* 105:67–71. doi: 10.1016/j.mimet.2014.07.012.
- Malacrida, L., D. M. Jameson, and E. Gratton. 2017. "A Multidimensional Phasor Approach Reveals LAURDAN Photophysics in NIH-3T3 Cell Membranes." *Sci Rep* 7(1):9215. doi: 10.1038/s41598-017-08564-z.
- Malacrida, Leonel, and Enrico Gratton. 2018. "LAURDAN Fluorescence and Phasor Plots Reveal the Effects of a H₂O₂ Bolus in NIH-3T3 Fibroblast Membranes Dynamics and Hydration." *Free Radical Biology and Medicine* 128:144–56. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.004.
- Mann, Matthias, Shao En Ong, Mads Grønborg, Hanno Steen, Ole N. Jensen, and Akhilesh Pandey. 2002. "Analysis of Protein Phosphorylation Using Mass Spectrometry: Deciphering the Phosphoproteome." *Trends in Biotechnology* 20(6):261–68. doi: 10.1016/s0167-7799(02)01944-3.
- Martinez, Mariano, Julianne Petit, Alejandro Leyva, Adrià Sagues, Daniela Megrian, Azalia Rodriguez, Quentin Gaday, Mathilde Ben Assaya, Maria Magdalena Portela, Ahmed Haouz, Adrien Ducret, Christophe Grangeasse, Pedro M. Alzari, Rosario Durán, and Anne Marie Wehenkel. 2023. "Eukaryotic-like Gephyrin and Cognate Membrane Receptor Coordinate Corynebacterial Cell Division and Polar Elongation." *Nature Microbiology* 8(10):1896–1910. doi: 10.1038/s41564-023-01473-0.
- Mazumder, Sonal, Joseph O. Falkinham, Andrea M. Dietrich, and Ishwar K. Puri. 2010. "Role of Hydrophobicity in Bacterial Adherence to Carbon Nanostructures and Biofilm Formation." *Biofouling* 26(3):333–39. doi: 10.1080/08927010903531491.
- Mehta, Ranjana, Josh T. Pearson, Sumit Mahajan, Abhinav Nath, Mark J. Hickey, David R. Sherman, and William M. Atkins. 2004. "Adenylation and Catalytic Properties of Mycobacterium Tuberculosis Glutamine Synthetase Expressed in Escherichia Coli versus Mycobacteria." *The Journal of Biological Chemistry* 279(21):22477–82. doi: 10.1074/jbc.M401652200.
- Meniche, Xavier, Renee Otten, M. Sloan Siegrist, Christina E. Baer, Kenan C. Murphy, Carolyn R. Bertozzi, and Christopher M. Sassetti. 2014. "Subpolar Addition of New Cell Wall Is Directed by DivIVA in Mycobacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(31):E3243–51.
- Mir, Mushtaq, Sladjana Prsic, Choong Min Kang, Shichun Lun, Haidan Guo, Jeffrey P. Murry, Eric J. Rubin, and Robert N. Husson. 2014. "Mycobacterial Gene *cuvA* Is Required for Optimal Nutrient Utilization and Virulence." *Infection and Immunity* 82(10). doi: 10.1128/IAI.02207-14.
- Mishra, Archita, and Avadhesha Surolia. 2018. "Mycobacterium Tuberculosis: Surviving and Indulging in an Unwelcoming Host." *IUBMB Life* 70(9):917–25. doi: 10.1002/iub.1882.

Molle, Virginie, and Laurent Kremer. 2010. "Division and Cell Envelope Regulation by Ser/Thr Phosphorylation: Mycobacterium Shows the Way." *Molecular Microbiology* 75(5):1064–77. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07041.x.

Mukherjee, Partha, Kamakshi Sureka, Pratik Datta, Tofajjen Hossain, Subhasis Barik, Kali P. Das, Manikuntala Kundu, and Joyoti Basu. 2009. "Novel Role of Wag31 in Protection of Mycobacteria under Oxidative Stress." *Molecular Microbiology* 73(1):103–19. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06750.x.

Nguyen, Liem, Nicole Scherr, John Gatfield, Anne Walburger, Jean Pieters, and Charles J. Thompson. 2007. "Antigen 84, an Effector of Pleiomorphism in Mycobacterium Smegmatis." *Journal of Bacteriology* 189(21):7896–7910. doi: 10.1128/JB.00726-07.

Nott, Timothy J., Geoff Kelly, Lasse Stach, Jiejun Li, Sarah Westcott, Dony Patel, Debbie M. Hunt, Steven Howell, Roger S. Buxton, Helen M. O'Hare, and Stephen J. Smerdon. 2009. "An Intramolecular Switch Regulates Phospho-independent FHA Domain Interactions in Mycobacterium Tuberculosis." *Science Signaling* 2(63):ra12–ra12. doi: 10.1126/scisignal.2000212.

O'Hare, H. M., R. Durán, C. Cerveñansky, M. Bellinzoni, A. M. Wehenkel, O. Pritsch, G. Obal, J. Baumgartner, J. Vialaret, K. Johnsson, and P. M. Alzari. 2008. "Regulation of Glutamate Metabolism by Protein Kinases in Mycobacteria." *Molecular Microbiology* 70(6). doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06489.x.

Palomino, JC, Leao S, Ritacco V. 2007. "Tuberculosis 2007 | Chapter 1: History." Retrieved January 13, 2025 (<https://web.archive.org/web/20090909150440/http://www.tuberculosis-textbook.com/tb/history.htm>).

Palomino, Juan Carlos, and Anandi Martin. 2014. "Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium Tuberculosis." *Antibiotics* 3(3):317–40. doi: 10.3390/antibiotics3030317.

Pickford, Hayleah, Emily Alcock, Albel Singh, Gabriella Kelemen, and Apoorva Bhatt. 2020. "A Mycobacterial DivIVA Domain-Containing Protein Involved in Cell Length and Septation." *Microbiology* 166(9):817–25. doi: 10.1099/mic.0.000952.

Plocinski, P., N. Arora, K. Sarva, E. Blaszczyk, H. Qin, N. Das, R. Plocinska, M. Ziolkiewicz, J. Dziadek, M. Kiran, P. Gorla, T. A. Cross, M. Madiraju, and M. Rajagopalan. 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., L. Martinez, K. Sarva, R. Plocinska, M. Madiraju, and M. Rajagopalan. 2013. "Mycobacterium Tuberculosis CwsA Overproduction Modulates Cell Division and Cell Wall Synthesis." *Tuberculosis* 93:S21–27. doi: 10.1016/S1472-9792(13)70006-4.

Rana, Amrita K., Albel Singh, Sudagar S. Gurucha, Liam R. Cox, Apoorva Bhatt, and Gurdial S. Besra. 2012. "Ppm1-Encoded Polyphosphorylated Monophosphomannose Synthase Activity Is Essential for Lipoglycan Synthesis and Survival in Mycobacteria" edited by A. K. Tyagi. *PLoS ONE* 7(10):e48211. doi: 10.1371/journal.pone.0048211.

- Rosenberg, M. 2006. "Microbial Adhesion to Hydrocarbons: Twenty-Five Years of Doing MATH." *FEMS Microbiol Lett* 262(2):129–34. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x.
- Rosenberg, M., D. Gutnick, and E. Rosenberg. 1980. "Adherence of Bacteria to Hydrocarbons: A Simple Method for Measuring Cell-Surface Hydrophobicity." *FEMS Microbiology Letters* 9(1):29–33. doi: 10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x.
- Rossello, J., A. Lima, M. Gil, J. Rodriguez Duarte, A. Correa, P. C. Carvalho, A. Kierbel, and R. Duran. 2017. "The EAL-Domain Protein FcsR Regulates Flagella, Chemotaxis and Type III Secretion System in *Pseudomonas Aeruginosa* by a Phosphodiesterase Independent Mechanism." *Sci Rep* 7(1):10281. doi: 10.1038/s41598-017-09926-3.
- Roumestand, C., J. Leiba, N. Galoppe, E. Margeat, A. Padilla, Y. Bessin, P. Barthe, V. Molle, and M. Cohen-Gonsaud. 2011. "Structural Insight into the *Mycobacterium Tuberculosis* Rv0020c Protein and Its Interaction with the PknB Kinase." *Structure* 19(10):1525–34. doi: 10.1016/j.str.2011.07.011.
- Salo, W. L., A. C. Aufderheide, J. Buikstra, and T. A. Holcomb. 1994. "Identification of *Mycobacterium Tuberculosis* DNA in a Pre-Columbian Peruvian Mummy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(6):2091–94. doi: 10.1073/pnas.91.6.2091.
- Santi, Isabella, Neeraj Dhar, Djenet Bousbaine, Yuichi Wakamoto, and John D. McKinney. 2013. "Single-Cell Dynamics of the Chromosome Replication and Cell Division Cycles in *Mycobacteria*." *Nature Communications* 4(1):2470.
- Schatz, Albert, Elizabeth Bugle, and Selman A. Waksman. 1944. "Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*†." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 55(1):66–69. doi: 10.3181/00379727-55-14461.
- Scherr, Nicole, Srinivas Honnappa, Gabriele Kunz, Philipp Mueller, Rajesh Jayachandran, Fritz Winkler, Jean Pieters, and Michel O. Steinmetz. 2007. "Structural Basis for the Specific Inhibition of Protein Kinase G, a Virulence Factor of *Mycobacterium Tuberculosis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(29):12151–56. doi: 10.1073/pnas.0702842104.
- Schindelin, Johannes, Curtis T. Rueden, Mark C. Hiner, and Kevin W. Eliceiri. 2015. "The ImageJ Ecosystem: An Open Platform for Biomedical Image Analysis." *Molecular Reproduction and Development* 82(7–8):518–29. doi: 10.1002/mrd.22489.
- Schultz, Christian, Axel Niebisch, Astrid Schwaiger, Ulrike Viets, Sabine Metzger, Marc Bramkamp, and Michael Bott. 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." *Molecular Microbiology* 74(3):724–41. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06897.x.
- Shi, Handuo, Benjamin P. Bratton, Zemer Gitai, and Kerwyn Casey Huang. 2018. "How to Build a Bacterial Cell: MreB as the Foreman of *E. Coli* Construction." *Cell* 172(6):1294–1305. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.050.
- Shih, Yu-Ling, and Lawrence Rothfield. 2006. "The Bacterial Cytoskeleton." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(3):729–54. doi: 10.1128/mmbr.00017-06.

Sieger, Boris, and Marc Bramkamp. 2015. "Interaction Sites of DivIVA and RodA from *Corynebacterium Glutamicum*." *Frontiers in Microbiology* 5:122723.

Silber, Nadine, Cruz L. Matos de Opitz, Christian Mayer, and Peter Sass. 2020. "Cell Division Protein FtsZ: From Structure and Mechanism to Antibiotic Target." *Future Microbiology* 15(9):801–31. doi: 10.2217/fmb-2019-0348.

Sotomayor, Hugo, Javier Burgos, and Magnolia Arango. 2004. "Demostración de Tuberculosis En Una Momia Prehispánica Colombiana Por La Ribotipificación Del ADN de *Mycobacterium Tuberculosis*." *Biomédica* 24:18–26.

Sreevatsan, Srinand, Xi Pan, Kathryn E. Stockbauer, Nancy D. Connell, Barry N. Kreiswirth, Thomas S. Whittam, and James M. Musser. 1997. "Restricted Structural Gene Polymorphism in the *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Indicates Evolutionarily Recent Global Dissemination." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(18):9869–74.

Studier, F. William. 2005. "Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures." *Protein Expression and Purification* 41(1):207–34. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.

Thakur, Meghna, and Pradip K. Chakraborti. 2006. "GTPase Activity of *Mycobacterial* FtsZ Is Impaired Due to Its Transphosphorylation by the Eukaryotic-Type Ser/Thr Kinase, PknA." *Journal of Biological Chemistry* 281(52):40107–13. doi: 10.1074/jbc.M607216200.

Tiwari, Divya, Rajnish Kumar Singh, Kasturi Goswami, Sunil Kumar Verma, Balaji Prakash, and Vinay Kumar Nandicoori. 2009. "Key Residues in *Mycobacterium Tuberculosis* Protein Kinase G Play a Role in Regulating Kinase Activity and Survival in the Host." *The Journal of Biological Chemistry* 284(40):27467–79. doi: 10.1074/jbc.M109.036095.

Tovar, Javier. 2014. "Un sanatorio antituberculoso en 1943." *EFE Salud*. Retrieved January 20, 2025 (<https://efesalud.com/un-sanatorio-antituberculoso-en-1943/>).

Tripathi, Deeksha, Harish Chandra, and Rakesh Bhatnagar. 2013. "Poly-L-Glutamate/Glutamine Synthesis in the Cell Wall of *Mycobacterium Bovis* Is Regulated in Response to Nitrogen Availability." *BMC Microbiology* 13:226. doi: 10.1186/1471-2180-13-226.

Tullius, Michael V., Günter Harth, and Marcus A. Horwitz. 2003. "Glutamine Synthetase GlnA1 Is Essential for Growth of *Mycobacterium Tuberculosis* in Human THP-1 Macrophages and Guinea Pigs." *Infection and Immunity* 71(7):3927–36. doi: 10.1128/IAI.71.7.3927-3936.2003.

Turapov, O., F. Forti, B. Kadhim, D. Ghisotti, J. Sassine, A. Straatman-Iwanowska, A. R. Bottrill, P. J. Moynihan, R. Wallis, P. Barthe, M. Cohen-Gonsaud, P. Ajuh, W. Vollmer, and G. V. Mukamolova. 2018. "Two Faces of CwlM, an Essential PknB Substrate, in *Mycobacterium Tuberculosis*." *Cell Rep* 25(1):57–67 e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.004.

Ventura, Marcello, Barbara Rieck, Francesca Boldrin, Giulia Degiacomi, Marco Bellinzoni, Nathalie Barilone, Faisal Alzaidi, Pedro M. Alzari, Riccardo Manganelli, and Helen M. O'Hare. 2013. "GarA Is an Essential Regulator of Metabolism in *Ycobacterium Tuberculosis*." *Molecular Microbiology* 90(2):356–66. doi: 10.1111/mmi.12368.

Vicente, Miguel, and Ana Isabel Rico. 2006. "The Order of the Ring: Assembly of *Escherichia Coli* Cell Division Components." *Molecular Microbiology* 61(1):5–8. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05233.x.

- Villarino, A., R. Duran, A. Wehenkel, P. Fernandez, P. England, P. Brodin, S. T. Cole, U. Zimny-Arndt, P. R. Jungblut, C. Cerveñansky, and P. M. Alzari. 2005a. "Proteomic Identification of M. Tuberculosis Protein Kinase Substrates: PknB Recruits GarA, a FHA Domain-Containing Protein, through Activation Loop-Mediated Interactions." *Journal of Molecular Biology* 350(5):953–63. doi: 10.1016/j.jmb.2005.05.049.
- Villarino, A., R. Duran, A. Wehenkel, P. Fernandez, P. England, P. Brodin, S. T. Cole, U. Zimny-Arndt, P. R. Jungblut, C. Cerveñansky, and P. M. Alzari. 2005b. "Proteomic Identification of M. Tuberculosis Protein Kinase Substrates: PknB Recruits GarA, a FHA Domain-Containing Protein, through Activation Loop-Mediated Interactions." *Journal of Molecular Biology* 350(5). doi: 10.1016/j.jmb.2005.05.049.
- Viswanathan, G., S. Yadav, S. V. Joshi, and T. R. Raghunand. 2017. "Insights into the Function of FhaA, a Cell Division-Associated Protein in Mycobacteria." *FEMS Microbiol Lett* 364(2). doi: 10.1093/femsle/fnw294.
- Walburger, Anne, Anil Koul, Giorgio Ferrari, Liem Nguyen, Cristina Prescianotto-Baschong, Kris Huygen, Bert Klebl, Charles Thompson, Gerald Bacher, and Jean Pieters. 2004. "Protein Kinase G from Pathogenic Mycobacteria Promotes Survival within Macrophages." *Science (New York, N.Y.)* 304(5678):1800–1804. doi: 10.1126/science.1099384.
- Wehenkel, A., M. Bellinzoni, M. Grana, R. Duran, A. Villarino, P. Fernandez, G. Andre-Leroux, P. England, H. Takiff, C. Cervenansky, S. T. Cole, and P. M. Alzari. 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.
- Wolff, Kerstin A., Andres H. de la Peña, Hoa T. Nguyen, Thanh H. Pham, L. Mario Amzel, Sandra B. Gabelli, and Liem Nguyen. 2015. "A Redox Regulatory System Critical for Mycobacterial Survival in Macrophages and Biofilm Development." *PLoS Pathogens* 11(4):e1004839. doi: 10.1371/journal.ppat.1004839.
- Xu, Yufan, Shiwei Ma, Zixin Huang, Longlong Wang, Sayed Haidar Abbas Raza, and Zhe Wang. 2023. "Nitrogen Metabolism in Mycobacteria: The Key Genes and Targeted Antimicrobials." *Frontiers in Microbiology* 14. doi: 10.3389/fmicb.2023.1149041.
- Zimmerman, M. R. 1979. "Pulmonary and Osseous Tuberculosis in an Egyptian Mummy." *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 55(6):604–8.
- Zink, Albert, Frank Maixner, Heidi Yoko Jäger, Ildikó Szikossy, György Pálfi, and Ildikó Pap. 2023. "Tuberculosis in Mummies – New Findings, Perspectives and Limitations." *Tuberculosis* 143:102371. doi: 10.1016/j.tube.2023.102371.

Agradecimientos

A mis orientadores, Rosario, Leonel y Pedro por guiarme en este camino. Especialmente a Rosario por estos 12 años de paciencia infinita, dedicación y por siempre estar dispuesta a escucharme, muchas veces estando de acuerdo y otras tantas a pesar de no. Me excuso públicamente por las noticias nefastas y sin anestesia que le he dado por Whatsapp, y por algún que otro dolor de cabeza (que le he dado y le seguiré dando).

A Arlinet por haberme introducido en el mundo de las bacterias y la microscopía y por haberme enseñado que “lo importante es el paper, si hay historia que contar, la tesis viene sola”. A Alejandro, por haber apoyado sistemáticamente mi carrera, por las charlas de pasillo y por estar siempre dispuesto a escucharme y darme su opinión, tanto en el ámbito académico como en lo personal. A Adriana por su ojo crítico y sus palabras siempre positivas, y muy especialmente, por haberse dado cuenta ese viernes, que el peptidoglicano estaba deslocalizado. Sin esa observación, este trabajo no sería el mismo. Gracias a los tres por haber accedido a corregir esta tesis.

A Carlos B., por obligarme a sonreír cuando llegaba al laboratorio por las mañanas y por haberme permitido enseñarle que el curry es una mezcla de condimentos.

A Mamá y a María, por el apoyo, paciencia y comprensión en tiempos difíciles. Y especialmente a Mamá por las tortillas de papa.

A Jimmy, por su compañía incondicional, su obstinación por saber lo que pasa en la pantalla de mi computadora y por recordarme que ya es hora de ir a dormir y también que es hora de levantarse.

A todos mis compañeros y amigos del instituto que de alguna manera contribuyeron a la culminación de esta tesis, les estoy profundamente agradecida.

ANEXO

- **Tablas suplementarias**
- **Video suplementario**
- **Artículos publicados**

Tabla S1: Proteínas enriquecidas en el interactoma de FhaA (tasa de cambio >2)

Identificador Uniprot	Tasa de cambio	p	Descripción	Localización subcelular
A0QPE7	8,05	3,86E-05	3-oxoacyl-acyl-carrier protein reductase FabG4	-
A0R201	7,83	9,09E-03	ATP synthase gamma chain GN=atpG	CM-Peripheral M
A0R588	6,70	1,59E-02	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH GN=ftsH	CM-multipass MP
A0QVL2	5,88	3,14E-04	Probable malate:quinone oxidoreductase GN=mqo	-
A0QV18	5,14	6,30E-03	Uncharacterized protein GN=MSMEG_2416	IDM at poles and patches in membrane
A0R1Z9	5,12	4,62E-05	ATP synthase epsilon chain GN=atpC	CM-Peripheral M
A0R051	5,08	1,46E-02	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit GN=MSMEG_4262	CM-multipass MP
A0QPE8	4,67	2,24E-02	3-ketoacyl-CoA thiolase GN=fadA2	-
A0QP27	4,51	1,59E-02	Drug exporters of the RND superfamily-like protein GN=mmpl3	CM-Peripheral M/cell tip and septum
A0R696	3,72	1,22E-02	Glycine/D-amino acid oxidase GN=MSMEG_6471	-
A0R3N8	3,70	1,84E-03	Succinate semialdehyde dehydrogenase GN=MSMEG_5538	-
A0QX24	3,66	2,17E-04	ATPase, MoxR family protein GN=moxR	-
A0QVM4	3,59	2,58E-03	Transcription termination/antitermination protein NusA GN=nusA	cytoplasm
A0R203	3,44	4,05E-03	ATP synthase subunit b-delta GN=atpFH	CM-single pass MP
A0QQJ4	3,20	9,91E-04	F420-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase GN=fgd	-
A0QR91	3,17	5,75E-04	Cyclohexanone monooxygenase GN=MSMEG_1030	-
Q9AFI5	3,08	2,70E-03	Single-stranded DNA-binding protein GN=ssb	septum
A0QQI4	2,99	1,09E-03	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2 GN=purT	-

A0QQB0	2,96	1,17E-03	Iron-sulfur cluster-binding protein GN=MSMEG_0690	IMP
A0QNJ7	2,81	6,81E-03	Conserved hypothetical proline and alanine rich protein GN=MSMEG_0067	-
A0QSL0	2,79	1,30E-02	Thioredoxin reductase GN=MSMEG_1516	-
A0QWV9	2,75	2,08E-02	Putative sporulation transcription regulator WhiA GN=whiA	-
A0QYW6	2,72	7,80E-04	Universal stress protein family protein, putative GN=MSMEG_3811	-
A0QVU2	2,69	8,20E-03	35 kDa protein GN=MSMEG_2695	-
A0R200	2,63	1,59E-04	ATP synthase subunit beta GN=atpD	CM-Peripheral M
A0R202	2,49	5,95E-04	ATP synthase subunit alpha GN=atpA	CM-Peripheral M
A0R4J1	2,29	4,00E-03	Phosphoribosylamine--glycine ligase GN=purD	-
A0R006	2,27	3,24E-04	Cell wall synthesis protein Wag31 GN=wag31	-
A0QQ61	2,11	1,94E-02	ABC transporter ATP-binding protein GN=MSMEG_0639	-
A0QR89	2,08	9,25E-04	Geranylgeranyl reductase GN=MSMEG_1028	-
A0R012	2,06	1,33E-02	Cell division protein FtsZ GN=ftsZ	-

#PatternLab's TFold

#Parameters used:

#F-stringency :0.04,

q-value:0.05

#Normalization used: Total

Signal

Tabla S2: Análisis de interacciones mediante STRING

Reporte sobre el estado de la red:

number of nodes:	56
number of edges:	94
average node degree:	3,36
avg. local clustering coefficient:	0,47
expected number of edges:	46
PPI enrichment p-value:	2,29E-10

La red está significativamente enriquecida en interacciones

Reporte de enriquecimiento

# genes en referencia	# genes	Categoría	Descripción	FDR	p
8	5	COMPARTMENTS	Proton-transporting ATP synthase complex	1,3E-05	3,94E-08
12	5	COMPARTMENTS	Cell pole	3,0E-05	1,85E-07
7	3	COMPARTMENTS	Cell tip	3,4E-03	6,17E-05
8	3	COMPARTMENTS	Cell septum	4,0E-03	8,43E-05
1049	19	COMPARTMENTS	Membrane	2,5E-02	6,10E-04
71	8	GO Biological Process	Ribonucleotide biosynthetic process	6,9E-05	2,16E-07
56	7	GO Biological Process	Purine ribonucleotide biosynthetic process	1,4E-04	6,95E-07

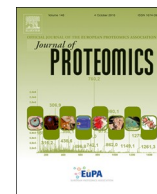
35	6	GO Biological Process	Regulation of developmental process	1,4E-04	8,74E-07
34	5	GO Biological Process	Regulation of cell shape	1,3E-03	1,50E-05
38	5	GO Biological Process	Cell cycle	1,7E-03	2,44E-05
194	9	GO Biological Process	Nucleobase-containing compound biosynthetic process	2,2E-03	3,65E-05
44	5	GO Biological Process	Cell division	2,7E-03	4,66E-05
206	9	GO Biological Process	Carbohydrate derivative biosynthetic process	3,2E-03	5,73E-05
322	10	GO Biological Process	Aromatic compound biosynthetic process	1,4E-02	3,30E-04
353	10	GO Biological Process	Heterocycle biosynthetic process	2,7E-02	6,70E-04

Tabla S3: Niveles de FhaA y Wag31 en las cepas control y *Msmeg_fhaA*

Conteo de espectros							
Locus	control R1	control R2	control R3	<i>Msmeg_fhaA</i> R1	<i>Msmeg_fhaA</i> R2	<i>Msmeg_fhaA</i> R3	Descripcion
FhaA	-	-	-	371	348	373	Fha A <i>M.tuberculosis</i>
AOR006	42	39	20	51	58	34	Cell wall synthesis protein Wag31 OS=Mycobacterium smegmatis

Video suplementario

https://drive.google.com/file/d/1lc3-BnlfUzGHKuLhHU80DHjDP38wdfjZ/view?usp=drive_link



New substrates and interactors of the mycobacterial Serine/Threonine protein kinase PknG identified by a tailored interactomic approach

Magdalena Gil^{a,i,1}, Analía Lima^{a,1}, Bernardina Rivera^a, Jessica Rossello^a, Estefanía Urdániz^b, Alessandro Cascioferro^c, Federico Carrión^d, Annemarie Wehenkel^e, Marco Bellinzoni^e, Carlos Batthyány^a, Otto Pritsch^d, Ana Denicola^f, María N. Alvarez^g, Paulo C. Carvalho^h, María-Natalia Lisa^{e,j}, Roland Brosch^c, Mariana Piuri^b, Pedro M. Alzari^e, Rosario Durán^{a,*}

^a Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas Institut Pasteur de Montevideo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Matajojo 2020, Montevideo 11400, Uruguay

^b Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

^c Integrated Mycobacterial Pathogenomics Unit, Institut Pasteur, Paris, France

^d Institut Pasteur de Montevideo, Unidad de Biofísica de Proteínas, Uruguay

^e Unité de Microbiologie Structurale, Institut Pasteur, CNRS URA 2185, Paris, France

^f Laboratorio de Fisiología Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

^g Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, CEINBIO, Universidad de la República, Uruguay

^h Laboratory for Proteomics and Protein Engineering, Carlos Chagas Institute, Paraná, Brazil

ⁱ Unit of Dynamics of Host-Pathogen Interactions, Institut Pasteur, Paris, France

^j Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET-UNR), Ocampo y Esmeralda, S2002LRK, Rosario, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

PknG
Serine/Threonine protein kinase
glutamine synthetase
FhaA
Affinity purification-mass spectrometry
Mycobacterium tuberculosis

ABSTRACT

PknG from *Mycobacterium tuberculosis* is a multidomain Serine/Threonine protein kinase that regulates bacterial metabolism as well as the pathogen's ability to survive inside the host by still uncertain mechanisms. To uncover PknG interactome we developed an affinity purification-mass spectrometry strategy to stepwise recover PknG substrates and interactors; and to identify those involving PknG autophosphorylated docking sites. We report a confident list of 7 new putative substrates and 66 direct or indirect partners indicating that PknG regulates many physiological processes, such as nitrogen and energy metabolism, cell wall synthesis and protein translation. GarA and the 50S ribosomal protein L13, two previously reported substrates of PknG, were recovered in our interactome. Comparative proteome analyses of wild type and *pknG* null mutant *M. tuberculosis* strains provided evidence that two kinase interactors, the FHA-domain containing protein GarA and the enzyme glutamine synthetase, are indeed endogenous substrates of PknG, stressing the role of this kinase in the regulation of nitrogen metabolism. Interestingly, a second FHA protein was identified as a PknG substrate. Our results show that PknG phosphorylates specific residues in both glutamine synthetase and FhaA *in vitro*, and suggest that these proteins are phosphorylated by PknG in living mycobacteria.

1. Introduction

Mycobacterium tuberculosis, the etiological agent of tuberculosis, is a major health problem and the main cause of death due to a single infectious agent. According to the World Health Organization, this pathogen has caused 10.4 million new cases and 1.7 million deaths worldwide during 2016 [1]. One crucial feature of *M. tuberculosis*

pathogenesis is its ability to respond to environmental signals switching from dormant to replicating bacilli in different disease stages [2,3]. In particular, signal transduction pathways involving protein phosphorylation play key roles in the adaptive response of *M. tuberculosis* [4,5].

Mass spectrometry-based phosphoproteomic approaches allowed the identification of more than 500 Ser- and Thr-phosphorylated residues in *M. tuberculosis*, and showed that phosphorylation patterns in

Abbreviations: AP-MS, affinity purification-mass spectrometry; DIA, Differential In gel Analysis; FHA, forkhead associated domain; GS, glutamine synthetase; STD, internal standard; STPK, Serine/Threonine protein kinase; TPR, tetratricopeptide repeats; WT, wild type

* Corresponding author.

E-mail address: duan@pasteur.edu.uy (R. Durán).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.013>

Received 25 April 2018; Received in revised form 27 July 2018; Accepted 25 September 2018

Available online 27 September 2018

1874-3919/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

mycobacteria changed dramatically in response to environmental stimuli [5–7]. However, the identification of the specific enzyme responsible for every phosphorylation event and the characterization of the function of each phosphoprotein still lags behind [8,9].

Genomic analysis of *M. tuberculosis* revealed the presence of 11 Serine/Threonine protein kinases (STPKs) [10]. Nine of them are receptor-like proteins with an intracellular kinase domain and an extracellular sensor domain, whereas the two other members of the family (PknG and PknK) are soluble proteins. These mycobacterial STPKs have been related to the regulation of several processes, including transcription, cell division and host-pathogen interactions, and eight of them are expressed during infection [11–14]. Among them, PknG became of special interest as it was found to play dual roles in mycobacterial metabolism and pathogenicity through mechanisms still not completely understood. On one hand, disruption of *pknG* gene reduced *M. tuberculosis* viability *in vitro* and in infection models, and caused retarded mortality in highly susceptible infected mice [12,15]. Furthermore, a *M. bovis* BCG *pknG* null mutant strain was found to be unable to block phagosome maturation in infected macrophages, and it has been proposed that PknG secretion and interference with the host cell signalling could be the underlying mechanism of this effect [16]. Very recently, other reports also support a role for PknG in facilitating bacterial growth in conditions mimicking host environment, like hypoxia or acidic environments [17,18]. In addition, the deletion of *pknG* caused a multidrug sensitive phenotype in contraposition to the intrinsic antibiotic resistance of pathogenic mycobacteria [19].

Other functions have been reported for PknG in bacterial metabolism. We have shown that PknG participates in the control of glutamate metabolism *via* the phosphorylation of the endogenous regulator GarA [20]. In addition, it was shown that PknG can regulate the activity of the Nudix hydrolase RenU through the phosphorylation of the ribosomal protein L13 [21]. Besides these better characterized substrates, very recent phosphoproteomics and protein microarray analysis have expanded the list of putative PknG substrates and interactors [22–24], and few candidates were further selected to test its interaction with, or phosphorylation by PknG. These studies suggest that RmlA and MurC activities are also regulated by PknG mediated phosphorylation [22,24].

PknG presents a unique modular domain organization. Flanking the conserved catalytic kinase domain, PknG has a N-terminal rubredoxin-like domain and a C-terminal domain composed of tetratricopeptide repeats (TPR). The rubredoxin domain of PknG has been the only protein motif found to regulate the intrinsic kinase activity [25,26], while the TPR domain can lead to PknG dimerization without evident effects on the kinase activity [26,27]. Besides, in its N-terminal end PknG has a possibly unstructured extension with up to four autophosphorylation sites that act as essential anchoring points for the recruitment of the forkhead-associated (FHA) domain-containing regulator GarA [20]. FHA domains specifically recognize phosphorylated Thr residues and play important roles in phosphorylation dependent signal transduction [28]. Thus, PknG phosphorylates GarA within a conserved N-terminal motif, triggering the self-recognition of the phosphorylated residue by the FHA domain in the C-terminus of the molecule [20,29,30]. This interaction serves as a switch to activate/inhibit GarA control of downstream metabolic enzymes that use α -ketoglutarate as substrate [20,31].

The central role of PknG in mycobacterial physiology and virulence is well documented, but the molecular mechanisms underlying these effects, as well as the protein partners involved, are still poorly understood. Even when the list of putative substrates and interactors is rapidly expanding, there is very little overlap between these high-throughput studies and only few PknG substrates have been validated as physiologically relevant. This evidences that the identification of *bona-fide* kinase substrates and the processes they regulate still represents a challenge from a methodological point of view and requires the use of multiple experimental approaches.

With the aim of contributing to a better understanding of the biological processes regulated by PknG, we developed a tailored interactomic approach. We combined the use of different constructions of PknG with specific sequential elution steps to identify PknG mediated protein complexes and, in particular, to discriminate those interactions relying on PknG's autophosphorylated docking sites. First, phosphorylation conditions were used to elute PknG substrates that, similar to the model substrate GarA, are released after phosphorylation. Second, a phosphatase treatment was employed to disrupt interactions mediated by phosphoresidues, including PknG autophosphorylated sites in the case of the whole length construction. A third and final elution step was performed to recover the remaining interacting partners. Using this experimental approach, we recovered 66 direct or indirect PknG partners, including the two previously reported substrates GarA and the 50S ribosomal protein L13. Further, two other proteins identified in the interactome of PknG, the enzyme glutamine synthetase (GS) and the protein FhaA, were validated as PknG substrates *in vitro* and evidence that both proteins are endogenous substrates of this kinase is provided. Altogether, our results suggest that PknG regulates a wide range of cellular processes including protein translation, nitrogen assimilation and cell wall biosynthesis.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of mycobacterial lysates

M. tuberculosis $\Delta pknG$ was kindly provided by Dr. J. Av-Gay [12]. Wild type *M. tuberculosis* H37Rv (WT) and a *pknG* null mutant strain ($\Delta pknG$) were grown in Middlebrook 7H9 supplemented with 0.05% Tween® 80 containing ADC supplement (BD Biosciences) until early-logarithmic phase. Cells were washed and then resuspended in minimum medium supplemented with 10 mM asparagine and cultured for 4–5 additional days. *Mycobacterium smegmatis* MC²155 was grown in Sauton's medium supplemented with 0.05% Tween® 80 until logarithmic phase. Mycobacterial cells were harvested and resuspended in PBS (*M. tuberculosis*) or 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% glycerol, 1 mM EDTA, pH 7.4 (protein interaction buffer for *M. smegmatis*) plus Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche). An equal amount of acid-washed glass beads ($\leq 106 \mu\text{m}$, Sigma) was added to the cell pellet and lysis was achieved by vortexing at top speed for 10 min. Cell debris and beads were removed by centrifugation and protein quantification in the supernatant was performed by densitometry analysis in gel. Protein extracts of each strain were prepared from three independent biological replicates.

2.2. Affinity purification and sequential elution of PknG interactors

Full-length PknG and PknG Δ_{73} were produced as described before [20] and immobilized on NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) following the supplier's instructions. In mock experiments, a control resin prepared by blocking active groups with ethanolamine was used.

PknG kinase activity was confirmed by using autophosphorylation and GarA phosphorylation assays as previously described [20,25]. Briefly, for autophosphorylation assay, immobilized kinase was incubated with 1 mM MnCl₂ in 50 mM HEPES, pH 7.4, for 30 min at 37 °C with or without (control) 500 μM ATP. Proteins immobilized in the resins were further digested overnight with trypsin (sequence grade, Promega) and the peptides recovered were analyzed by MALDI-TOF MS (4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer, Abi Sciex) using linear mode and *m/z* range from 2000 to 6000. Phosphorylation of the recombinant substrate was performed by incubation of immobilized PknG with GarA (final concentration 70 μM) under the same conditions used for autophosphorylation assay, with or without ATP. GarA phosphorylation status was verified by whole molecular mass measurements using a MALDI-TOF mass spectrometer (4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer, Abi Sciex) operated in linear mode.

Immobilized PknG, PknG Δ_{73} or control resin pre-equilibrated in the interaction buffer were incubated with 800 μ g of *M. smegmatis* protein extract (three biological replicates) supplemented with 2 mM EDTA, overnight at 4 °C, with gentle agitation. The matrix was packed into PierceTM Micro-Spin Columns (Thermo Scientific) and the retained proteins were eluted using the following protocol: (a) for the elution of interactors under phosphorylation conditions (E1), the PknG, PknG Δ_{73} and control matrices were incubated with 1 mM MnCl₂ and 500 μ M ATP in 50 mM HEPES, pH 7.0, for 30 min at 37 °C and the eluted proteins were recovered; (b) for the elution of proteins under dephosphorylation conditions (E2), the resins were further incubated with 0.18 U/ μ L of calf intestine alkaline phosphatase (Roche) for 40 min at 37 °C and the eluted proteins were recuperated; (c) for the elution of proteins under unspecific conditions (E3), the matrices containing the remaining interactors were incubated for 10 min at 25 °C with 70% ACN, 0.1% formic acid and the eluted proteins were collected. The whole experiment was run in triplicates, using independent biological samples, and each eluate was analyzed by nano-LC MS/MS.

2.3. Production of recombinant FhaA

Plasmid pLAM12-fhaA, for *Strep-tag*[®] II-FhaA overexpression in mycobacteria, was constructed by PCR amplification of Rv0020c (*fhaA*) from genomic DNA of *M. tuberculosis* H37Rv using the oligonucleotides AAATTCATATGTGGAGCCACCCGAGTTTCGAAAAAGCGCTGGTAGC CAGAAAAGGCTGGTTC (FhaA-Fw) and ATATTGAATTCCTCAGTGCATG CGGACGATGATC-3' (FhaA-Rv), and cloning the insert between the sites NdeI and EcoRI (underlined) in the extrachromosomally-replicating parent vector pLAM12 [32], under the control of the *M. smegmatis* acetamidase promoter. FhaA-Fw contains a 5' extension coding for the STAG II sequence (bold). Plasmid pLAM12-fhaA was used to transform electrocompetent *M. smegmatis* MC²155 cells. Transformants were grown in Middlebrook 7H9 broth supplemented with ADC, 0.05% Tween[®] 80 and kanamycin, and the expression of *Strep-tag*[®] II-FhaA was induced by the addition of 0.2% acetamide during exponential growth. *Strep-tag*[®] II-FhaA (herein after named FhaA) was purified using Strep-Tactin[®] Sepharose[®] (IBA) and eluted in a competitive manner with D-desthiobiotin.

2.4. Production of recombinant GS

pCRT7::Rv2220 plasmid was kindly provided by Dr. S. Mowbray and protein production was performed as previously reported [33]. Briefly, *Escherichia coli* BL21 pLysS were transformed with plasmid pCRT7::Rv2220 and cells were grown in autoinduction medium for 4 h at 37 °C and later overnight at 20 °C. GS was first purified by metal-affinity chromatography on a His-Trap FF crude column equilibrated in 50 mM HEPES pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glycerol and 5 mM imidazol, using a linear imidazole gradient from 5 to 500 mM. Size exclusion chromatography was performed on fractions containing GS, using a Sephacryl S400 16/60 column (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM HEPES pH 7.7, 150 mM NaCl, 3% glycerol and 1 mM MgCl₂. Oligomeric state of GS was determined using either Dynamic Light Scattering or native gels (NativePAGETM 3-12% Bis-Tris Protein Gels, Thermo). Native Mark Unstained Molecular Weight Marker (Thermo) was used as standard.

2.5. Mapping FhaA or GS phosphorylation sites

To assay FhaA as a substrate of PknG *in vitro*, a cell lysate of *M. smegmatis* MC²155 overexpressing FhaA was initially loaded onto a Strep-Tactin[®] Sepharose[®] column (IBA). Immobilized FhaA was later dephosphorylated with 0.07 U/ μ L calf intestine alkaline phosphatase (Roche) for 40 min at 37 °C. Dephosphorylated FhaA was then eluted and further incubated with 1 mM MnCl₂, 250 μ M ATP and 10 nM PknG, for 30 min at 37 °C. As a control, we performed the same experiment in

the absence of PknG. Additionally, to identify the sites of FhaA phosphorylated *in vivo*, FhaA was purified from *M. smegmatis* cells transformed with plasmid pLAM12-fhaA and induced with acetamide.

To evaluate GS as a substrate of PknG *in vitro*, recombinant GS was incubated with 1 mM MnCl₂, 250 μ M ATP and PknG (molar ratio PknG:GS 1:150), for 30 min at 37 °C.

Protein samples were digested overnight with trypsin and analysed by nano-LC MS/MS using an ion trap instrument (LTQ Velos, Thermo) for the identification of phosphorylation sites.

2.6. Surface plasmon resonance analysis

For surface plasmon resonance analysis, FhaA was diluted in 10 mM sodium acetate pH 4.5 at a concentration of 5 μ g/mL and immobilized on a CM5 sensorchip by standard amine coupling. A BIACORE 3000 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) was used, achieving a final density of 25 RU. Phosphorylated PknG and PknG Δ_{73} were diluted in 10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20 to a final concentration of 30 nM and injected during 3 min at a flow rate of 80 μ L/min over the immobilized and a reference surfaces. Regeneration was achieved by extensively washing with running buffer. All injections were done at 25 °C and double referenced by subtracting the reference cell signal and a buffer injection.

2.7. Differential gel electrophoresis (DIGE)

Comparative proteome analyses between wild type *M. tuberculosis* and Δ pknG strains were performed on three biological replicates, using the Ettan DIGE System (GE Healthcare) and following the manufacturer's instructions. Samples were purified using the 2D Clean-up kit (GE Healthcare) and protein pellets were solubilized in 30 mM Tris pH 8.5, 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS.

Equal amounts (25 μ g) of samples WT and Δ pknG were mixed to set up an internal standard (STD) for multiplex matching of DIGE images, spot normalization and calculation of spots abundance changes. Then, the STD and the protein samples WT and Δ pknG (50 μ g each) were differentially labelled with the N-hydroxysuccinimidyl ester derivatives of the cyanine dyes Cy2, Cy3, and Cy5 following the manufacturer's instructions for minimal labelling (GE Healthcare, Munich, Germany). The differentially labelled WT and Δ pknG samples together with the STD were mixed and rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.5% IPG Buffer 4-7 (GE Healthcare)) was added. This mixture was later used to rehydrate IPG strips (13 cm pH 4-7) overnight. Isoelectric focusing was performed in an IPGphor Unit (Pharmacia Biotech) applying the following voltage profile: constant phase of 500 V for 1 h, linear increase to 1000 V in 1 h, followed by another linear increase to 8000 V in 2 h 30 min, and a final constant phase of 8000 V in 35 min, reaching a total of 17.5 kWh. Prior to running the second dimension, IPG-strips were reduced for 15 min in equilibration buffer (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue) supplemented with DTT (10 mg/mL) and subsequently alkylated for 15 min with iodoacetamide (25 mg/mL). The separation in the second-dimension was performed on 12.5% SDS-PAGE, at 20 °C, in a SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit (GE Healthcare). Gels were scanned with a Typhoon FLA 9500 laser scanner (GE Healthcare), at a resolution of 100 μ m, using laser wavelengths and filters recommended for each dye.

Images were analyzed using the DeCyderTM 2D software (v7.2) (GE Healthcare). The module for Differential In-gel Analysis (DIA) was used for spots co-detection, spot quantification by normalization and calculation of the ratio between different samples in the same gel. Biological Variation Analysis software module was used to perform inter-gel matching and statistical analyses. An unpaired Student's t-test was employed to determine if the standardized spot volume abundances from the triplicate samples showed significant changes between the two conditions. Spots displaying a pI shift profile consistent with the

presence of post-translational modification such as phosphorylation (spots in trains with increased abundance in WT strain), significant volume abundances differences ($p \leq 0.05$) and a fold change of at least 25% were filtered and selected for further analyses.

To confirm the phosphorylation status of the differential spots, we compared wild type *M. tuberculosis* protein extracts pre-labelled with CyDyes with and without treatment with alkaline phosphatase (Cy3 and Cy2 respectively), using DIA analysis (DeCyder™ 2D software). The same strategy was used to compare Δ pknG protein extracts with and without previous incubation with recombinant PknG under phosphorylation conditions (Cy5 and Cy2 respectively).

2.8. Sample preparation for MS analysis

Protein mixtures obtained from affinity purification (AP) experiments were reduced and alkylated with iodoacetamide prior to treatment with trypsin. Peptide quantification was performed at 280 nm using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) prior to its analysis by nano-LC MS/MS (LTQ Velos, Thermo).

For identification of differential spots from DIGE experiments, the master gel was silver stained [34] and selected spots were manually picked from this gel and processed for protein identification using MALDI-TOF MS. Briefly, spots were *in-gel* digested with trypsin and the resultant peptides were extracted using aqueous 60% ACN/0.1% trifluoroacetic acid, and concentrated by vacuum drying. Samples were desalted using C18 micro-columns (C₁₈ OMIX pipette tips, Agilent) and eluted directly onto the sample plate for MALDI-MS with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution in aqueous 60% ACN/0.1% trifluoroacetic acid. Additionally, some spots were analyzed by nano-LC MS/MS, in this case elution was performed in 70% ACN/0.1% formic acid.

2.9. Protein identification by MALDI-TOF/TOF MS

Tryptic peptides obtained from the spots of the silver stained master gel were analysed using a 4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer (Abi Sciex, Framingham, MA) equipped with 355 nm Nd:YAG laser. Spectra were acquired in reflector mode using the following parameters: detector voltage: 1.75 kV; laser ranging from 50 and 70% of maximum intensity; 160 shots per subspectra and 25 subspectra acquired. MS/MS analyses of selected peptides were performed for all the analyzed spots in DIGE experiments. For MS/MS spectra acquisition source 1 and source 2 voltages were 8 kV and 15 kV, respectively.

Proteins were identified by database searching of measured m/z values using the MASCOT search engine (Matrix Science <http://www.matrixscience.com>) in the sequence Query mode, using the database from NCBI (20160821) and restricting the taxonomy to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. The following search parameters were set: monoisotopic mass tolerance, 0.03 Da; fragment mass tolerance, 0.5 Da; methionine oxidation and phosphorylation of Ser, Thr and Tyr as variable modification, cysteine carbamidomethylation as fixed modification and one missed tryptic cleavage allowed. Significant protein scores ($p < 0.05$), at least three peptides per protein and at least one fragmented peptide with ion significant score ($p < 0.05$) per protein were used as criteria for positive identification.

2.10. LC MS/MS data acquisition

Samples from AP experiments, selected DIGE spots and phosphorylated proteins were analyzed by nano-LC MS/MS. Each sample was injected into a nano-HPLC system (EASY-nLC 1000, Thermo Scientific) fitted with a reverse-phase column (EASY-Spray column, 50 cm $\times$ 75 μ m ID, PepMap RSLC C18, 2 μ m, Thermo Scientific). For AP experiments, peptides were separated on a linear gradient of solvent B (ACN 0.1% formic acid (v/v)) from 5% to 55% in 75 min. In the case of DIGE and DIA spots, as well as analysis of phosphorylation status of

recombinant proteins, the gradient was modified as follow: linear gradient of solvent B from 5% to 55% in 60 min. In both cases, the flow rate was set at 250 nL/min at 45 °C.

Peptide analysis was carried out in a LTQ Velos nano-ESI linear ion trap instrument (Thermo Scientific) set in a data-dependent acquisition mode using a dynamic exclusion list. NSI-source parameters were set as follows: spray voltage (kV): 2.3 and 260 °C capillary temperature. Mass analysis was performed with Xcalibur 2.1 in two steps: (1) acquisition of full MS scan in the positive ion mode with m/z between 400 and 1200 Da, (2) CID fragmentation of the ten most intense ions with the following parameters; normalized collision energy: 35, activation Q: 0.25; activation time: 15 ms.

2.11. Proteomic data analysis

A target-decoy database including sequences from *M. smegmatis* strain ATCC 700084/MC²155, *M. tuberculosis* strain ATCC 25618/H37Rv downloaded from Uniprot consortium in November 2014, and 127 most common mass spectrometry contaminants was generated using PatternLab for Proteomics (version 3.2.0.3) [35,36], giving rise a database with 10,712 entries. For analyses of AP samples and protein identification of selected spots from DIGE gel, the Comet search engine was set as follows: tryptic peptides; oxidation of methionine and phosphorylation of Ser, Thr or Tyr as variable modifications and carbamidomethylation as fixed modification; and 700 ppm of tolerance from the measured precursor m/z . XCorr and Z-Score were used as the primary and secondary search engine scores, respectively. Peptide spectrum matches were filtered using the Search Engine Processor (SEPro) using the following parameters; acceptable FDR: 1% at the protein level; a minimum of two peptides per protein. All reported proteins have at least one unique peptide. Comparisons between proteins present in each elution of PknG, PknG Δ 73 and mock experiments was performed using PatternLab's Approximately Area Proportional Venn Diagram module, and verification of statistical validity of the proteins was performed according to the Bayesian model integrated into PatternLab for proteomics [36,37]. Briefly, the model considered quantitative data and number of appearances in different biological replicates to assign p-values and ultimately shortlist proteins that are likely to be real interactors.

For phosphosite identification of FhaA and GS recombinant proteins, Proteome Discoverer software package (v.1.3.0.339, Thermo) with Sequest as search engine was used. Database was compiled from *M. tuberculosis* strain ATCC 25618/H37Rv (April 2015) and *M. smegmatis* strain ATCC 700084/MC²155 (November 2014) Uniprot protein sequences. The precursor mass tolerance and fragment mass tolerance were set as 1 Da and 1.5 Da respectively, oxidation of methionine and phosphorylation of Ser, Thr or Tyr were set as variable modifications. Peptide validator node was used to perform a decoy database search, and the target FDR (strict) was set to 0.01. Only high-confident peptides with strict target false discovery rate were considered. To localize phosphosites in validated sequences phosphoRS node was used. In addition, we considered positive phosphosite identification when more than one spectrum for the phosphopeptide was obtained. Manual inspection of the MS/MS spectra was performed to corroborate peptide and phosphorylation site assignments.

2.12. Bioinformatic analyses

The list of *M. smegmatis* identified proteins was converted to *M. tuberculosis* orthologs and classified using TubercuList (*M. tuberculosis* H37Rv database, March 2013 release 27 [38]). If a protein ortholog was absent in TubercuList, a blastp sequence and similarity search was performed using *M. smegmatis* sequence as query and *M. tuberculosis* complex (taxid: 77643) as database and a statistical significance threshold of 10 (default value) [39]. Protein-protein interactions analyses were performed with STRING database (v 10.0) (<http://string-db>).

org/), using the entire set of putative PknG's interactors (MSMEG identifiers) as an input gene list, and the following parameters: “known interactions” (from curated databases and experimentally determined) and a minimum interaction score of 0.7 (high confidence) [40]. A statistical overrepresentation test of GO biological processes (release 20160715) was performed using the Panther Server (<http://pantherdb.org>) version 11.1. The release date of GO ontology dataset was 2017-01-26. *Mycobacterium tuberculosis* database as reference list and the TubercuList gene identifiers were used [41].

2.13. Data availability

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD005950 [42].

3. Results

3.1. An affinity chromatography-sequential elution strategy to find new PknG protein interactors

To identify PknG protein partners we developed an affinity chromatography-sequential elution strategy to stepwise recover PknG interactors with different binding modes and to specifically discriminate those recruited through PknG autophosphorylated docking sites. PknG was initially immobilized on NHS-Activated Sepharose and incubated with ATP/Mn²⁺ to allow autophosphorylation, which was later verified by MALDI-TOF MS analysis of tryptic digestion mixtures. As shown in Supplementary Fig. 1A, after the autophosphorylation reaction we observed an intense signal corresponding to the diphosphorylated ion of sequence 10-60 (*m/z* 5556.3), in agreement with previous results [20]. We also verified that the immobilized kinase behaved as an active enzyme towards the substrate GarA (Supplementary Fig. 1B). In parallel, we immobilized an active deletion mutant of PknG lacking the phosphorylatable sequence 1-73 (PknG_{Δ73}) that participates in the recruitment of the FHA-containing substrate GarA [20]. Thus, immobilized PknG, PknG_{Δ73} and control resins were used to fish out interacting proteins from total *M. smegmatis* protein extracts. First, elution was performed under phosphorylation conditions (ATP/Mn²⁺) to recover substrates released after its phosphorylation by the immobilized kinase (E1). A subsequent elution step was performed under dephosphorylation conditions, to specifically disrupt interactions relying on phosphoresidues (E2), including kinase autophosphorylated sites in the case of the whole length PknG. Finally, the remaining interacting partners were recovered in a third elution step (E3). For each elution step, positive interactors were identified by comparison with mock experiments, using quantitative data and number of appearances in different biological replicates to assign p-values (filtering options, *p* < 0.05) using Patternlab for Proteomics software.

3.2. Identification of new PknG substrates and protein interactors

Eight proteins were identified in at least two of three biological replicates of E1 when using full-length PknG as bait, whereas six of them were also recovered with PknG_{Δ73} (Table 1 and Table S1). Interestingly, we could not identify proteins in any of the three replicates of mock resin. Therefore, the kinase N-terminal segment was critical for the recruitment of two putative phosphorylatable interactors. As expected, one of these proteins is the regulator GarA, validating our experimental approach. The other protein in this group was the enzyme glutamine synthetase 1 (GS, MSMEG_4290). While GarA contains an FHA domain that specifically recognizes pThr residues in PknG, no phospho-recognition domain has been predicted for GS, and its possible interaction through the N-terminal extension of PknG deserves further investigation. No protein was identified exclusively in the interactome of PknG_{Δ73} under the same conditions. However, six proteins were

Table 1

Proteins identified in E1 and E2 fractions from the AP-MS experiment.

Proteins identified as exclusive interactors of full length PknG in E1		
UniProt identifier	Description	Gene name
A0QYG2	Glycogen accumulation regulator GarA	MSMEG_3647
A0R079	Glutamine synthetase	MSMEG_4290
Proteins identified as common interactors of PknG and PknG _{Δ73} in E1		
UniProt identifier	Description	Gene name
A0QQC8	Chaperone protein DnaK	MSMEG_0709
A0R5M3	Alcohol dehydrogenase, iron containing	MSMEG_6242
A0QQU5	60 kDa chaperonin 1	MSMEG_0880
A0R2I1	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding protein	MSMEG_5122
A0R597	Inorganic pyrophosphatase	MSMEG_6114
A0QTE1	Acetyl-/propionyl-coenzyme A carboxylase alpha chain	MSMEG_1807
Proteins identified as exclusive interactors of full-length PknG in E2		
UniProt identifier	Description	Gene name
A0QNG7	FHA domain protein	MSMEG_0035

systematically recovered using both full-length PknG and PknG_{Δ73}, namely chaperone protein DnaK, alcohol dehydrogenase, 60 kDa chaperonin 1, 4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding protein, inorganic pyrophosphatase and acetyl-/propionyl-coenzyme A carboxylase alpha chain. Interestingly, six out of the eight proteins recovered in E1 have been previously reported as phosphorylated proteins (Table S2).

Under dephosphorylation conditions (E2), the FHA protein FhaA (MSMEG_0035) was the only protein systematically recovered when using full-length PknG as bait, but not PknG_{Δ73} or the mock resin (Table 1 and Table S3). The presence of a pThr recognition domain in FhaA possibly explains its specific interaction with the N-terminal segment of the kinase. Additionally, 45 proteins were statistically significantly identified as interactors in E2 when compared to mock experiments using both baits, including PknG itself (Table S3). Among these proteins we recovered the previously reported substrate of PknG, the 50S ribosomal protein L13 [21], highlighting the usefulness of our interactomic approach to identify *bona-fide* kinase substrates. GS was also detected in all replicates of E2 elution with very high numbers of spectra assigned to its sequence, strongly supporting that this protein is indeed a PknG interactor. The fact that GS was recovered using both PknG constructs suggests that, besides the N-terminal segment of PknG, the kinase core and/or the TPR domain also play a role in its direct or indirect binding. Notably, 23 out of 46 proteins recovered in E2 are ribosomal proteins, including 7 known interactors of the ribosomal protein L13 (RplR, RplF, RplX, RplV, RplC, RplB and RplA), reflecting the recovery of physiologically relevant protein complexes (<https://string-db.org/>).

In the third elution step (E3) we employed astringent conditions to recover the remaining interactors of PknG. Using the statistical model of Venn Diagram analysis for comparison with mock experiments, 24 proteins were identified in this fraction using whole length PknG and 22 of them were also recovered using PknG_{Δ73}, evidencing a confident list of partners (Table S4).

Overall, we identify 66 proteins in the PknG interactome (Table S5). Bioinformatics analysis showed that our set of putative PknG partners presented a significant enrichment of previously reported protein-protein interactions (PPI enrichment *p*-value < 1.0e-16). The biological processes that were statistically enriched in the PknG interactome were: ATP synthesis coupled proton transport; proton transmembrane

transport; translation and ribosome biogenesis (Table S6). Moreover, the differential analysis of the interactome of PknG and PknG $\Delta 73$ indicates that GarA and FhaA are recruited exclusively by full-length PknG, pointing to a specific interaction with pThr residues of the kinase N-terminal extension.

3.3. Comparative analysis of the proteomes of wild type *M. tuberculosis* and a PknG-null mutant

To evaluate if the newly identified interactors could represent physiological substrates of PknG, we compared the proteomes of wild type *M. tuberculosis* and a *pknG* deletion mutant ($\Delta pknG$) by difference in gel electrophoresis (DIGE). This approach allows an estimation of the relative abundance of proteoforms with different isoelectric points (pI), representing therefore a valuable tool for the analysis of kinase substrates. Image analysis led to the detection of around 2100 spots in each gel. Spots exhibiting normalized abundance fold changes greater than 25% and p-values lower than 0.05 (Student's t-test) were considered as differential spots. Not surprisingly, the differential spots that presented the largest overall fold changes could be assigned by LC-MS/MS analysis to GarA (Fig. 1A and B). Four spots corresponding to GarA proteoforms with different apparent pI values (spots 1 to 4) presented decreased normalized abundance in the $\Delta pknG$ strain, with fold changes ranging from 1.52 to 4.38 (Fig. 1B and Table S7). At the same time, the more basic GarA spot (spot 5 in Fig. 1) was overrepresented in $\Delta pknG$ strain, with an increased normalized abundance of 2.30 (Fig. 1B and Table S7). The pattern of phosphorylated proteoforms of GarA was previously reported [30], and our results are consistent with diminished levels of GarA phosphorylation in the $\Delta pknG$ strain. In fact, Thr₂₁, the specific residue modified by PknG, was unequivocally detected as phosphorylated in the most acidic proteoform of GarA overrepresented in wild type *M. tuberculosis* (Table S7). This finding confirms previous reports indicating that GarA is a physiological substrate of PknG [15,20] and demonstrates the utility of the DIGE approach to identify protein substrates of this kinase.

The analysis by DIGE allowed the identification of an additional area with a differential pattern of spots between wild type *M. tuberculosis* and the $\Delta pknG$ mutant strain, possibly reflecting differences in protein phosphorylation. Interestingly, these spots were identified as GS (Rv2220) (spots 6 to 13 in Fig. 1B and Table S7). However, we failed to detect phosphopeptides in these very faint spots by MS, possibly due to a combination of the low amount of available protein and the analytical difficulties associated with the ionization and fragmentation of the

phosphorylated peptides. To evaluate if phosphorylation by PknG could be responsible for these differential spots, we performed two complementary experiments. First, we treated protein extracts from wild type *M. tuberculosis* with alkaline phosphatase and analyzed changes in the relative abundance of spots by differential in gel analysis (DIA). Then, the same approach was used to compare protein extracts from the *M. tuberculosis* $\Delta pknG$ mutant strain before and after incubation with PknG. Spots 6–8 were not completely resolved in this DIA gel, therefore they were analyzed as a single spot. Interestingly, the relative intensity of GS acidic spots, that were differential between strains, decreased after the treatment with phosphatase (fold change of 6.5 for spot 6–8 and fold change of 5.3 for GS spot 9) (Fig. 2). Additionally, the relative intensity of GS spot 9, underrepresented in $\Delta pknG$ strain, increased upon incubation with PknG (fold change of 2.16), while spot 6–8 didn't show difference in its abundance.

However, incubations with PknG did not change the relative abundance of the more basic GS spots (spots 10–13). Overall, these results confirm that GS is modified by phosphorylation *in vivo* and show that the incubation of protein extracts of *M. tuberculosis* $\Delta pknG$ with PknG can partially recapitulate the pattern of GS spots observed in the wild type strain.

3.4. PknG phosphorylates specific residues of GS

The results described above point to GS as a new PknG substrate. To further validate these results, and to identify the involved phosphoresidues, recombinant GS was incubated with PknG under phosphorylation conditions using different enzyme:substrate ratios. Phosphorylated peptides were subsequently identified by tryptic digestion and LC-MS/MS. After incubation with PknG, the N-terminal region of GS was systematically phosphorylated, even with an enzyme:substrate molar ratio as low as 1:150. Two peptides of m/z 833.4 and 1168.2, corresponding to doubly charged ions of phosphorylated sequences 45–59 and 60–79 respectively, were detected. Thr₇₇ were unequivocally identified as the phosphorylated residue within sequence 60–79 by phosphoRS analysis (pRS probability 100%) (Fig. 3B and Table S8). In addition, manual inspection of the spectra indicated the presence of several y ions (y_5^+ , $y_5^+ - H_3PO_4$, y_7^+ , $y_7^+ - H_3PO_4$, y_8^+ , $y_8^+ - H_3PO_4$) that supports the phosphosite assignment. In the case of sequence 45–59, Ser₅₇ was identified as the most probably phosphorylated residue by phosphoRS (pRS probability S₅₇: 98.9%; Ser₅₆: 0.2%), and this was confirmed by the presence of a signal corresponding to y_3^+ ion in MS/MS spectra (Fig. 3A and Table S8). While Thr₇₇ is exposed to

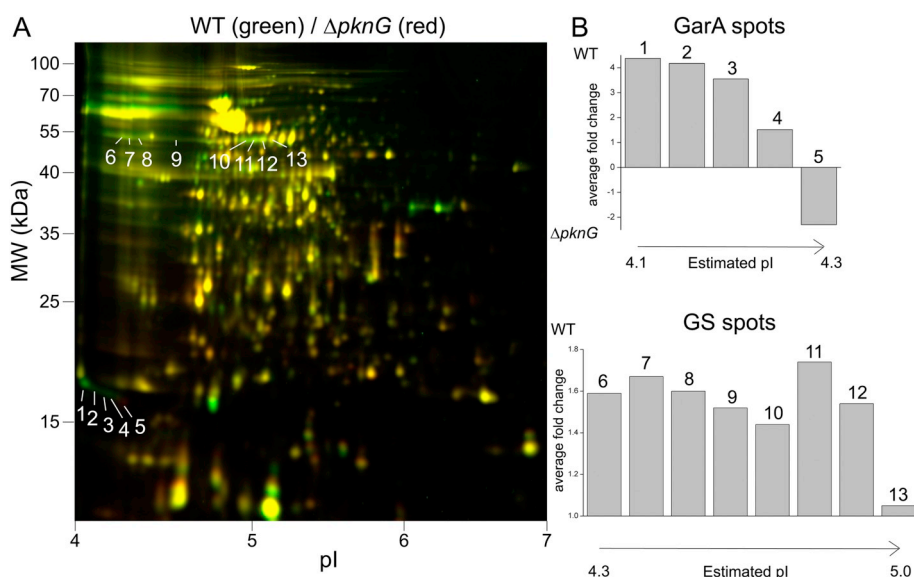


Fig. 1. Analysis of the differential proteoform-patterns present in wild type *M. tuberculosis* and a PknG null mutant by DIGE.

A. Representative DIGE in pseudocolours. Protein spots overrepresented in WT and $\Delta pknG$ strains are shown in green and red, respectively. Differential spots with patterns consistent with changes in protein phosphorylation are labelled. Protein spots in these areas were assigned to glutamine synthetase (GS,) and GarA. Average standardized abundance fold changes and protein identification details for each spot are shown in Table S7. B. Bar graphs showing the average standardized abundance fold changes of GarA spots (spots 1–5, upper panel) and GS spots (spots 6–13, lower panel). The estimated pI range of each group of spots is indicated below each graph. Fold changes for spots 1–12 have p < 0.05 values.

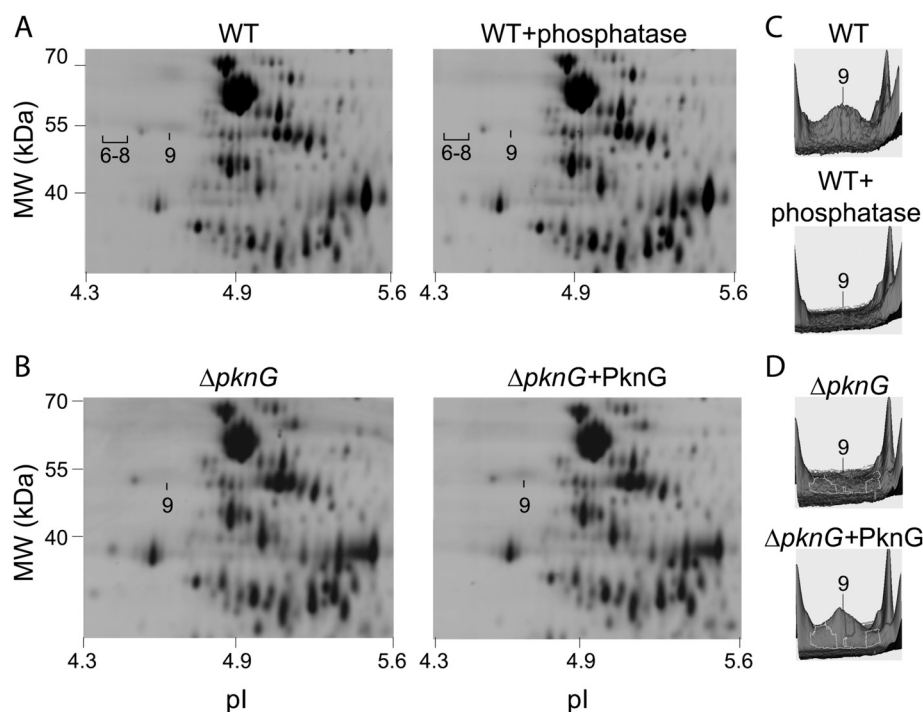


Fig. 2. Confirmation of GS phosphorylation status. **A.** DIA analysis of wild type *M. tuberculosis* protein extracts with or without treatment with protein phosphatase. **B.** DIA analysis of *M. tuberculosis* $\Delta pknG$ protein extracts with or without pre-incubation with PknG under phosphorylation conditions. Spots labels refers to spots in DIGE gel in Fig. 1, all identified as GS by MS; spots 6-8 were not completely resolved in this DIA gel, therefore, they were analyzed as a single spot. Spots 6-8 $\log_{10}$ volume ratio (WT/WT+phosphatase) = 1.65, Mascot protein score: 267; spot 9 $\log_{10}$ volume ratio (WT/WT+phosphatase) = 1.53, Mascot protein score: 149; spot 9 volume ratio ($\Delta pknG/\Delta pknG$ +PknG) = 1.32, Mascot protein score: 111. Volume ratios are expressed as $10 \cdot \log_{10}$ (spot volume condition 1/spot volume condition 2). **C-D.** 3D view of the GS spot 9 showing the spot volume differences between each pair of conditions.

the solvent and relatively distant from the active site, Ser₅₇ is located in close proximity to an oligomerization interface and points to the active site of an adjacent monomer in the dodecameric structure of GS (Fig. 4). Thus, it is tempting to speculate that phosphorylation of Ser₅₇ could interfere with substrate binding and/or GS oligomerization. Additionally, a third phosphopeptide (residues 404-429) was systematically identified in phosphorylation assays (triply charged ion of m/z 933.1), and although unambiguous phosphosite identification is not possible from the spectra obtained, Thr₄₂₁ is the most probably phosphorylated residue within this sequence (pRS site probability 90.5%) (Fig. 3C and Table S8). Further support of Thr₄₂₁ phosphorylation by PknG is provided by the detection of sequence 404-429 with two modifications: phosphorylation (Thr₄₂₁) and AMPylation (Tyr₄₀₆). In this case, the presence in the MS/MS spectrum of the fragment ions y_{10}^{+} , $y_{10}^{+} \cdot H_3PO_4$; and a small signal corresponding to $y_9^{+} \cdot H_3PO_4$ point to Thr₄₂₁ and not Thr₄₂₀ as the phosphorylated residue (Fig. 3D and Table S8). Interestingly, Thr₄₂₁ is close in the primary and the tertiary structure of the protein to the conserved residue Tyr₄₀₆, whose AMPylation is a well-known mechanism for the modulation of bacterial GS activity [43,44]. The fact that the phosphorylation of this sequence can occur alone or in combination with the AMPylation of Tyr₄₀₆ suggests that both residues could have related regulatory roles.

3.5. FhaA as a new substrate of *M. tuberculosis* PknG

M. tuberculosis encodes several FHA-containing proteins and all of them have been identified as substrates of multiple STPKs *in vitro* [30,45–48]. With our interactomic approach we systematically recovered one of these proteins, FhaA, as the only PknG interactor recovered under dephosphorylation conditions when using the full-length kinase but not PknG Δ_{73} , suggesting that the interaction between FhaA and PknG strongly relies on the N-terminal pThr residues of PknG. A recent work reported the interaction of FhaA with several mycobacterial kinases, but failed to detect an interaction with PknG [24]. We employed surface plasmon resonance to determine whether FhaA is able to establish a direct interaction with PknG. Phosphorylated PknG formed a stable complex with immobilized FhaA whereas truncated PknG Δ_{73} lacking all phosphosites did not (Supplementary Fig. 2). Overall, our results show that PknG and FhaA can interact in the

absence of additional factors and that the phosphorylated N-terminal extension of PknG is essential for this binding.

Then, we decided to assess FhaA phosphorylation by PknG *in vitro*. While no phosphopeptides were identified in LC-MS/MS analysis of recombinant phosphatase-treated FhaA, two FhaA phosphopeptides were confidently identified after incubation of the protein with PknG, and the phosphorylated residues were unequivocally localized. A peptide of m/z 472.3 (corresponding to the triply charged ion of phosphorylated sequence 14-25) and a peptide of m/z 816.2 (corresponding to the doubly charged ion of phosphorylated sequence 108-120) were systematically detected in the phosphorylation assays. These two sequences mapped to the N-terminal domain of FhaA and MS/MS spectra allowed the unequivocal identification of Thr₁₈ and Thr₁₁₆ (pRs scores of 79 and 110 respectively; 100% pRS probability in both cases) as the phosphorylated residues (Fig. 5A and B, respectively; and Table S8). Manual inspection of these spectra allowed the detection of numerous signals that support the specific modification of these residues (Fig. 5A and B).

To determine if these sites were also phosphorylated in living mycobacteria, recombinant *M. tuberculosis* FhaA produced in *M. smegmatis* was digested and analyzed by nano-LC MS/MS. Three FhaA phosphopeptides were found, two of them matching those previously identified in the *in vitro* phosphorylation assay (Thr₁₈ in sequence 14-25 and Thr₁₁₆ in sequence 108-120) (Fig. 6A and B, respectively; and Table S8). An additional phosphopeptide was detected corresponding to sequence 368-378, with Thr₃₇₇ identified as the phosphorylation site (Fig. 6C and Table S8). Previous studies reported that the kinase PknB is able to phosphorylate the FhaA residue Thr₁₁₆ *in vitro* and several phosphoproteomics reports showed that this residue is also phosphorylated *in vivo* [49,50]. Even when it is difficult to exclude the possibility of physiologically non-relevant modifications due to protein overexpression, our results suggest that PknG might also contribute to the phosphorylation of Thr₁₁₆ and is likely responsible for the specific phosphorylation of Thr₁₈ in living mycobacteria.

4. Discussion

In this work we develop an AP-MS protocol for the identification of specific substrates and interactors of the mycobacterial protein kinase

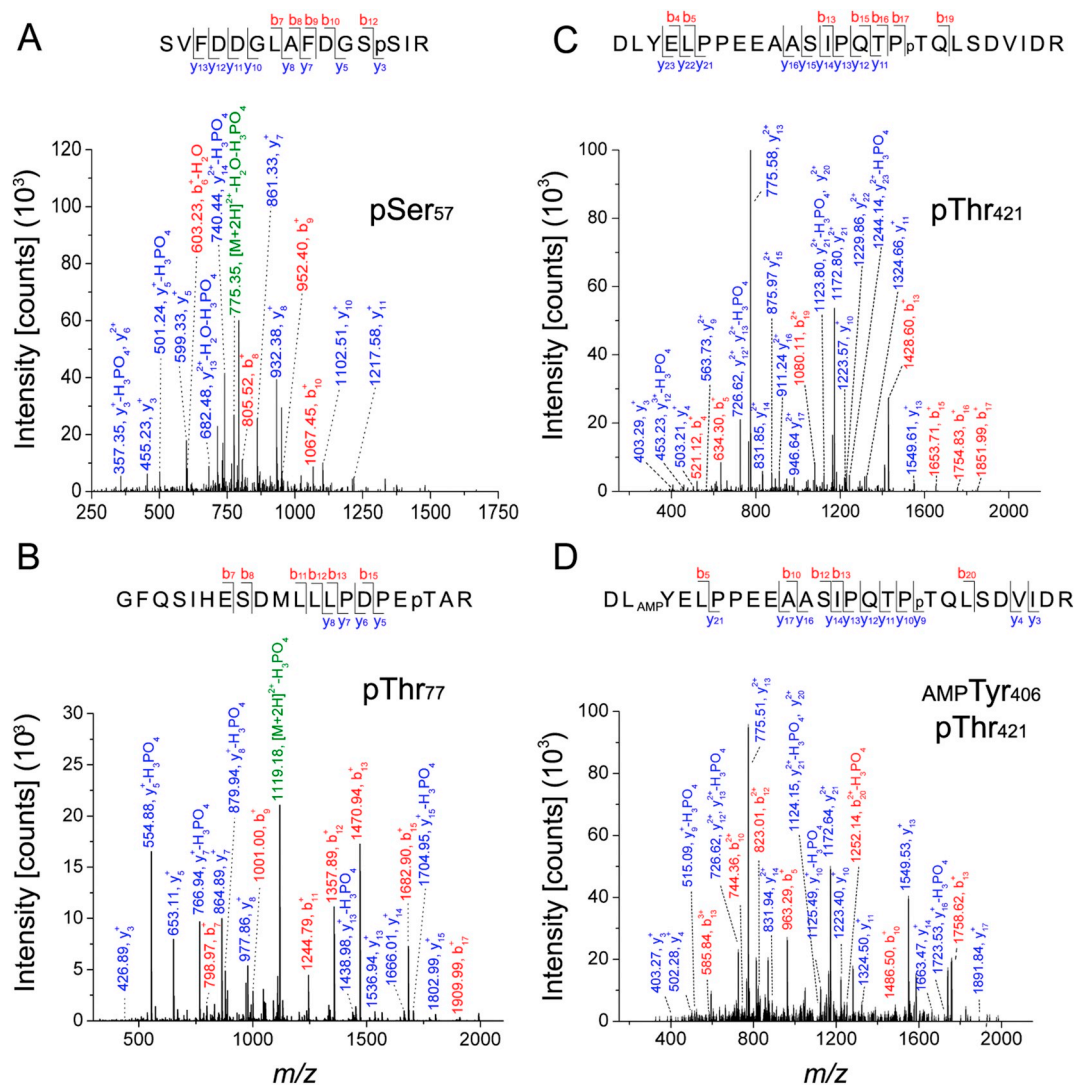


Fig. 3. Identification of GS phosphorylation sites. In each case, C-terminal (blue) and N-terminal (red) fragment ions assigned to the sequence are indicated. Ions presenting the neutral loss characteristic of phosphorylation are indicated. A. Representative MS/MS spectrum of the doubly charged peptide SVFDDGLAFDGS pS₅₇IR (m/z observed 833.4; Xcorr value: 4.81). PhosphoRS indicates that Ser₅₇ is the phosphorylated residue within the sequence (pRS score of 114; pRS site probability S₅₇: 99.8%; Ser₅₆: 0.2%). The presence of y_3^+ fragment ion points to S₅₇ and not S₅₆ as the phosphoresidue. B. Representative MS/MS spectrum of doubly charged ion of sequence GFQSIHESDMLLLPDPE pT₇₇AR (m/z observed 1168.2; Xcorr: 4.34). PhosphoRS indicates that Thr₇₇ is the phosphorylated residue within the sequence (pRS score of 100; pRS probability T₇₇: 100%). The presence of many y ion fragments from y_3^+ to y_8^+ , either containing the +80 modification and/or the phosphate neutral loss corroborates the assignment of Thr₇₇ and not S₆₇ or S₆₃ as the phosphoresidue. C. Representative MS/MS spectrum of triply charged ion of sequence DLYELPPEEAASIPQTP pT₄₂₁QLSDVIDR (m/z observed: 993.1; Xcorr: 4.06) and pRS score 58. PhosphoRS indicates that the most probably modified residue is Thr₄₂₁ (pRS probability 90.5%). However the site is difficult to identify by manual inspection. D. MS/MS spectrum of the triply charged ion of sequence DLAMPYELPPEEAASIPQTP pT₄₂₁QLSDVIDR (m/z observed 1102.9; Xcorr 5.05) showing that both the AMPylation of Tyr₄₀₆ [43] residue and the phosphorylation of a residue within this sequence, most probably Thr₄₂₁, can take place in the same peptide (pRS site probability for Thr₄₂₁: 92.8%). The presence of the fragment ions y_{10}^+ , $y_{10}^+ - H_3PO_4$, and a small signal corresponding to $y_9^+ - H_3PO_4$ point to Thr₄₂₁ and not Thr₄₂₀ as the phosphorylated residue. Additional information regarding each phosphosite identification is depicted in Supplementary Table S8.

PknG by combining sequential elution steps and the use of different PknG constructions as baits. The proposed strategy presents several advantages that allowed us to report a confident list of PknG's interactors. On one hand the use of specific elution conditions (E1 and E2) allowed us to fractionate PknG interactome, facilitating the detection of less abundant proteins and at the same time decreasing the number of unspecific proteins eluted. On the other hand, the use PknG constructions with and without the autophosphorylated sites allowed us to discern which interactions rely on this docking site. Altogether, we report 66 proteins that participate in PknG-mediated protein complexes in mycobacteria. One striking feature of the interactome of PknG is the presence of a high number of ribosomal proteins and proteins related to translation. It is interesting to note that many of the identified PknG

interactors are predicted to be part of the RelA regulon, which mediates the stringent response under nutrient limitation conditions [51] (Table S5). The presence of a large number of ribosomal proteins among PknG interactors might reflect the recovery of multiprotein complexes, possibly due to the simultaneous interaction of PknG with several specific proteins partners. Pristic *et al.* suggested that translation was regulated by Serine/Threonine protein kinase(s), as they identified phosphorylation sites in several ribosomal and ribosome-associated proteins in *M. tuberculosis* [5]. The occurrence of phosphorylated ribosomal proteins was further confirmed by phosphoproteomic analysis in related mycobacteria [6,52]. However, the impact of these modifications on protein biosynthesis is still not fully understood. Ribosomal proteins are among the most common contaminants in interactomes, but they are

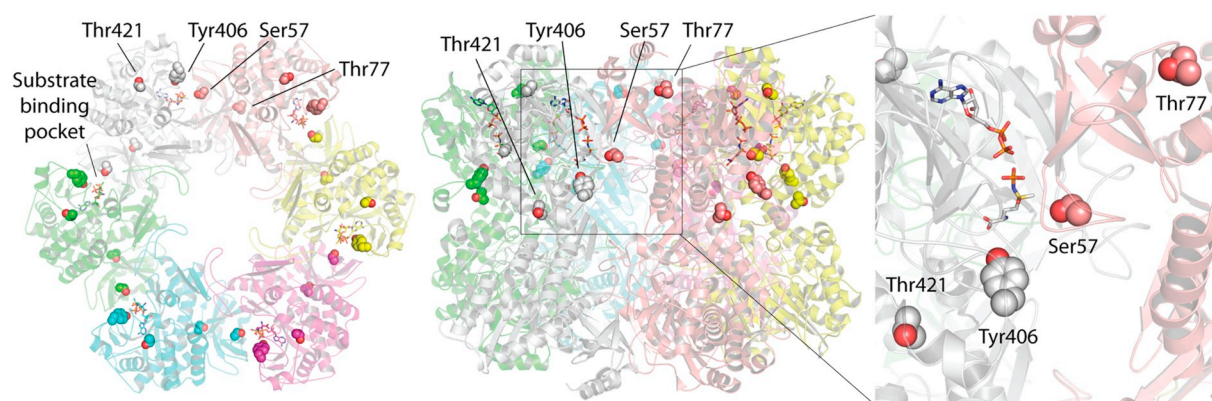


Fig. 4. Location of phosphorylatable residues on GS structure. Crystal structure of the GS dodecameric form (PDB code 2BVC [33]) highlighting the three phosphorylatable sites (Ser₅₇, Thr₇₇ and Thr₄₂₁) identified in this work and residue Tyr₄₀₆, found AMPylated in previous work [43]. Protomers are shown in cartoon representation in different colours, highlighted protein residues are shown in spheres and molecules in the substrate-binding pocket are shown in sticks. Right: view of the interfacial plane between the two GS 6-mer rings perpendicular to the protein 6-fold axis; center: lateral view of the GS dodecamer; left: amplification of the lateral view of the GS dodecamer.

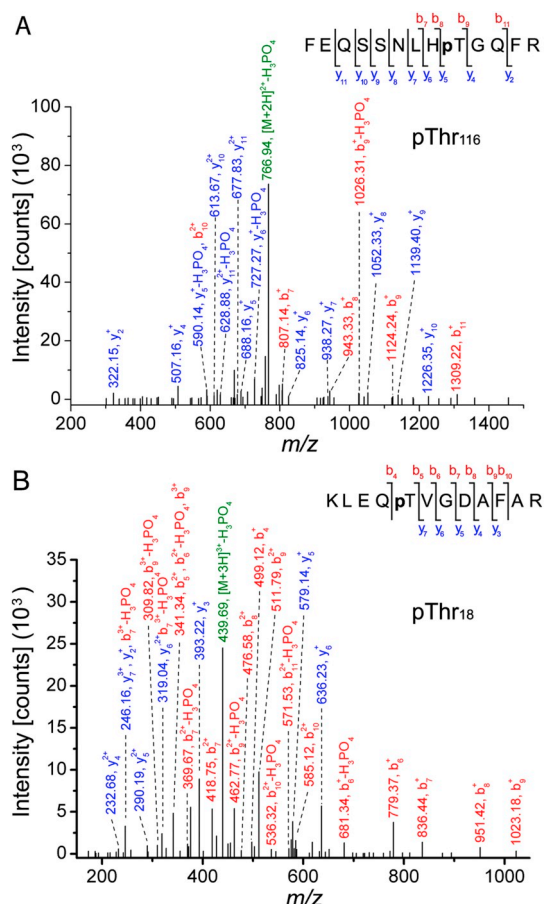


Fig. 5. Identification of *in vitro* phosphorylation sites of FhaA. *Strep*-tag[®] II-FhaA was purified from *M. smegmatis*, dephosphorylated with alkaline phosphatase, submitted to phosphorylation experiments using PknG as kinase and digested previous to MS analysis. y- (blue) and b- (red) ions assigned to the sequence are indicated. Ions presenting the neutral loss characteristic of phosphorylation are shown. A. Representative MS/MS spectrum of doubly charged ion of sequence FEQSSNLHP₁₁₆GQFR (observed *m/z* 816.2, Xcorr 3.90). pRS score of 110 and pRS probability 100% for T₁₁₆ allowed the unequivocal identification of the phosphorylation site. The presence of several y ions in the spectrum confirms this assignment (y₅⁺; y₆⁺; y₆⁺-H₃PO₄; y₇⁺; y₈⁺). B. Representative MS/MS spectrum of triply charged ion of sequence KLEQPT₁₈VGDAFAR (*m/z* 472.3, Xcorr value of 4.31). pRS score of 79 and pRS probability 100% for T₁₈ allowed to unequivocally identify the phosphoresidue, which is confirmed by the presence of b ions from b₅ to b₁₁.

also part of physiologically relevant macromolecular complexes [53]. However, the analysis of proteins interacting with a mock resin, using three biological replicates, indicates that these proteins are not un-specific interactors. Thus, based on the employed experimental approach, the high enrichment of proteins related to translation and the available data reporting ribosomal proteins as kinases substrates (including PknG), we predict that ribosomal proteins are genuine partners of PknG. This conclusion is also supported by a recent report that identified protein translation as one of the main processes regulated by PknG [23]. Nakedi *et al.* used a label free phosphoproteomic approach to identify proteins that were differentially phosphorylated in wild type *M. bovis* BCG and a PknG knockout mutant strain, and their list of 22 candidate PknG substrates include two ribosomal proteins (the 50S ribosomal protein L2 and the 30S ribosomal protein S16), both of which were also identified in the present work (Table S5). Overall, we recovered 6 out of the 22 PknG substrates reported by Nakedi *et al.*, namely DnaK, RNA polymerase-binding protein RbpA, the 50S ribosomal protein L2, the 30S ribosomal protein S16, the ATP synthase beta subunit and the protein FhaA, thus strengthen the idea that these proteins represent physiological substrates/interactors of the kinase. Protein microarrays have also been used to identify PknG direct interactors [22,24]. Deng *et al.* reported 59 protein interactors of PknG, while Wu *et al.* reported 122 interactors among which 31 were exclusive of PknG while the remaining 91 were also interactors of at least one more protein kinase. Using the same microarray and an optimized protocol the authors increased from 59 to 122 the number of interactors found, but only 21 hits were common to the lists in both papers. This strategy seeks a different objective than ours; in one case direct interactors are identified while in the other protein complexes that include direct and indirect interactors are analyzed. However, there is strikingly little overlap between the lists of interactors found by protein microarrays and those obtained by using other approaches. In particular, none of the interactors reported by Wu *et al.* was identified in our interactomic approach, while only one was identified by Nakedi *et al.* (uncharacterized protein A0A0H3M4P0). Very interestingly, the strategy designed here allowed us to recover the only two previously well-characterized substrates of PknG: GarA and the 50 ribosomal protein L13, pointing to a confident list of biologically relevant interactors. None of the other reports on substrates or direct interactors of PknG succeeded in the identification of these validated substrates [22–24].

To cluster PknG protein partners we used a sequential elution scheme. In a first step using phosphorylation conditions, we recovered 8 proteins that represent either putative PknG substrates or components of substrate-mediated complexes. However, we were not able to identify phosphopeptides to support phosphorylation by PknG during

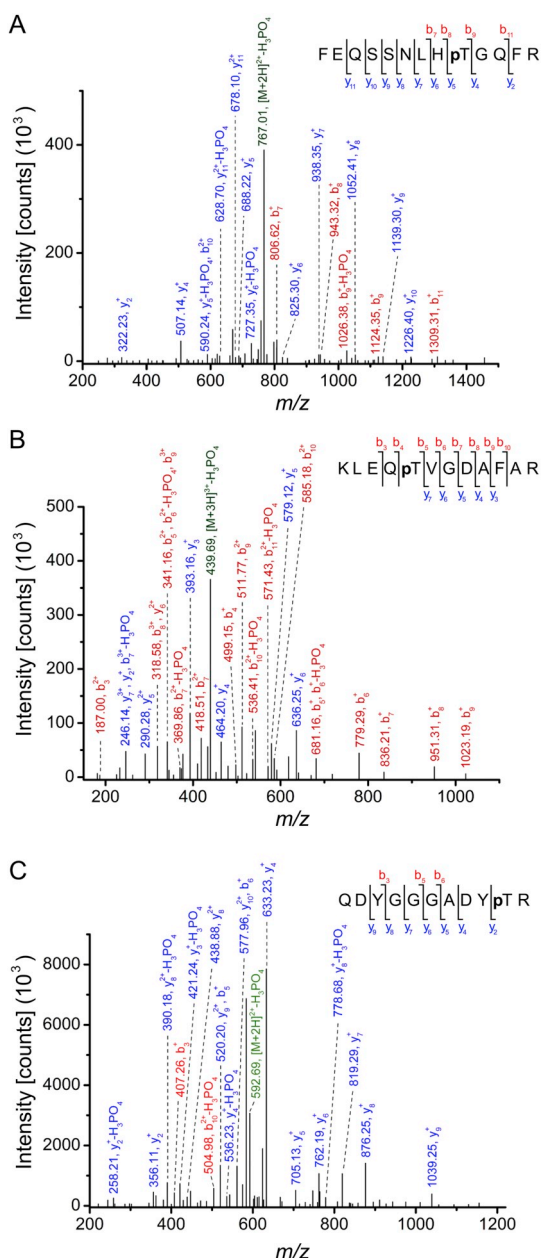


Fig. 6. Identification of FhaA phosphorylation sites *in vivo*. *Strep-tag®* II-FhaA was purified from *M. smegmatis* and digested previous to mass spectrometry analysis. y- (blue) and b- (red) fragment ions assigned to the sequence are indicated. Ions presenting the neutral loss characteristic of phosphorylation are also shown. A. Representative MS/MS spectrum of doubly charged ion of sequence FEQSSNLHpT₁₁₆GQFR (*m/z* observed: 816.1; Xcorr: 4.35). Analysis using PhosphoRS indicates that T₁₁₆ is the phosphorylated residue within the sequence (pRS score of 106; pRS probability T₁₁₆ 100%). Manual inspection of the spectra revealed the presence of fragment ions that allow confirming the phosphorylation of T₁₁₆ and not S₁₁₁ or S₁₁₂: y₅⁺, y₆⁺, y₆⁺ + H₃PO₄; y₇⁺, y₈⁺. B. Representative MS/MS spectrum of triply charged ion of sequence KLEQpT₁₈VGDAFAR (observed *m/z* 472.1; Xcorr value of 4.25). Both phosphoRS and manual inspection of the spectra fully supports the phosphorylation of T₁₈ within the sequence (pRS score of 84; pRS probability 100%). C. Representative MS/MS spectrum of the doubly charged ion of sequence QDYGGGADYpT₃₇₇R (observed *m/z* 641.9; Xcorr value of 3.54). PhosphoRS analysis point to T₃₇₇ as the *in vivo* phosphorylation site (pRS score of 91; pRS probability 99.5% for T₃₇₇). The presence of y₂⁺ and y₂⁺ + H₃PO₄ fragment ions confirms the phosphorylation of the Thr₃₇₇, and not the Tyr₃₇₆ residue.

elution. Several factors preclude phosphopeptide identification in protein mixtures. On one hand, phosphopeptides have lower ionization efficiencies and ionization is frequently suppressed by the presence of non-phosphorylated peptides. Additionally, phosphopeptides generate low quality MS/MS spectra dominated by the neutral loss of the phosphate group, resulting in lower confidence of spectral matching [54,55]. In spite of this, several pieces of evidence support the relevance of this list of putative PknG substrates. First, GarA was systematically identified in all replicates of this fraction. Additionally, 6 out of 8 proteins recovered in E1 (GarA, GS, DnaK, 60kDa chaperonin, inorganic pyrophosphatase, and Acetyl-/propionyl-coenzyme A carboxylase alpha chain) have been previously reported as kinase substrates in phosphoproteomics and/or *in vitro* phosphorylation assays [7,20,30,49,56]. Remarkably, differences in DnaK phosphorylation have been recently reported for a strain lacking PknG [23]. Finally, comparative proteomics between wild type *M. tuberculosis* and a Δ pknG mutant strain using DIGE strongly suggest that two of the proteins recovered in E1, GarA and GS, are indeed differentially phosphorylated in the absence of PknG (Fig. 1).

The enzyme GS catalyzes the condensation of glutamate and ammonium to produce glutamine in the first step of nitrogen assimilation [57,58]. Overall, our results indicate that GS might represent a new substrate of PknG. First, we corroborated that GS is phosphorylated by PknG *in vitro* and we identified three residues as specific phosphorylation sites (Fig. 3). In addition, we provide evidence that GS is indeed phosphorylated in *M. tuberculosis*, and that phosphorylated proteoforms are underrepresented in a PknG null mutant (Fig. 2). Furthermore, the abundance of one of these GS proteoforms increased upon incubation of *M. tuberculosis* Δ pknG protein extracts with PknG, pointing to a direct effect of PknG on GS phosphorylation. Unfortunately, due to the low abundance of GS phosphorylated spots we could not confirm its phosphorylation site *in vivo*. Interestingly, a recent report supports the phosphorylation of GS *in vivo* within its N-terminal sequence, including the specific phosphorylation on Ser₅₇ [59]. Thus, phosphorylation sites were assigned to Ser₅₆ or Ser₅₇ in the case of the sequence ₄₅SVFDDGLAFDGGSSIR₅₉ and to Ser₆₃ or Ser₆₇ in the case of the sequence ₆₀GFQSIHESDMLLPDPETAR₇₉. Moreover, these authors did not find any difference in the phosphorylation status of these peptides when inhibiting PknA and PknB, indicating that other kinase(s) must be responsible for these phosphorylation events. GS plays a key role in bacterial survival inside the host, regulating not only ammonium assimilation but also the synthesis of the poly L-glutamate/glutamine cell wall structure [58,60]. GS synthesis and activity are tightly regulated at different levels and, in particular, the reversible AMPylation of the conserved residue Tyr₄₀₆ is a well-established regulatory mechanism [61–63]. Our results open the possibility that protein phosphorylation also participates in the modulation of GS activity; however, more experiments will be required to verify this hypothesis. Notably, GS is involved in the bacterial nitrogen metabolism, similar to three other metabolic enzymes indirectly regulated by PknG. It has been shown previously that the unphosphorylated form of GarA is an allosteric inhibitor of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase, and an activator of glutamate synthase [20,31]. PknG switches off these modulatory activities by phosphorylating GarA at Thr₂₁ [20,31]. Thus, GarA regulates in a very coordinated manner three of the four enzymes responsible for the balance between ammonium assimilation and glutamate oxidative deamination. Strikingly, the fourth enzyme that participates in this process, GS, was identified in the current study as a putative PknG substrate/interactor. In this way, PknG could regulate the four key enzymes for ammonium assimilation in mycobacteria through the concerted action on GarA and GS. Altogether, our results strongly suggest that GS is a new substrate of PknG. However, the specific effect of GS phosphorylation on its activity, oligomerization state and/or modulation by AMPylation remains to be established.

One of the aims of our interactomic approach was to identify PknG

partners specifically interacting with the kinase N-terminal docking site (s). Two proteins consistently recruited only by full-length PknG contained an FHA domain: GarA and FhaA (Table 1). We demonstrated that FhaA is a substrate of PknG *in vitro* (Fig. 5) and that the phosphorylated N-terminus of PknG is required for the interaction (Supplementary Fig. 2). The fact that FhaA was recovered in fraction E2 but not in E1 suggest that, opposite to GarA, the intramolecular recognition of the pThr residues by the FHA domain in FhaA is not a favoured and therefore, phosphorylation does not trigger disruption of the PknG-FhaA complex. FhaA is a two-domain protein with a C-terminal FHA domain and a N-terminal domain of unknown function connected via a long unstructured linker region (300 residues in *M. tuberculosis*) [50]. The *fhaA* gene is encoded by a highly conserved mycobacterial operon involved in the control of cell shape and cell division [64]. A previous study described the recruitment of FhaA by a phosphorylated Thr residue in the pseudokinase MviN and the involvement of this complex in mycobacterial cell wall biosynthesis [64]. Global phosphoproteomic studies in mycobacteria showed that FhaA is phosphorylated *in vivo* both on Thr and on Tyr, however the kinase(s) responsible(s) for each phosphorylation event are still poorly characterized. [49]. Here we identified three phosphorylation sites in *M. tuberculosis* FhaA overproduced in *M. smegmatis* (Thr₁₈, Thr₁₁₆ and Thr₃₇₇) and two of them (Thr₁₁₆ and Thr₃₇₇) have been previously detected *in vivo*. In particular, previous studies reported that the kinase PknB is able to phosphorylate Thr₁₁₆ [65] while it has been proposed that PknG can phosphorylate the conserved Thr₃₇₇ (Thr₃₇₁ in *M. bovis* BCG) [23]. Thus, Thr₁₈ represents a putative new FhaA phosphorylation site. In addition, our results also suggest that PknG might contribute to the phosphorylation of Thr₁₁₆ in FhaA *in vivo*. Indeed, the phosphorylation of the same substrate by different kinases, possibly in response to different stimuli, has already been reported in *M. tuberculosis* [20,30]. We have tried to compare FhaA phosphorylation in wild type *M. tuberculosis* and the Δ pknG mutant strain by DIGE and shotgun approaches; however we failed to obtain reasonable read-outs, possibly due to the low abundance of these proteins in mycobacterial extracts. In spite of this, our results suggest that PknG might play a role in cell wall synthesis through FhaA phosphorylation. Interestingly, Nakedi *et al* recently identified the FhaA orthologue in *M. bovis* as a physiological substrate of PknG [23].

Altogether, we used a reliable AP-MS protocol to study the interactome of PknG and identify new substrates, interactors and processes regulated by this kinase. Our results point to nitrogen and energy metabolism, cell wall biosynthesis and protein translation as processes potentially modulated by PknG.

M. tuberculosis must reprogram its metabolism and gene expression profile in response to external stimuli to survive inside the host. The accumulating evidence indicates that PknG is involved in the regulation of core processes in the bacterial physiology, essential for the adaptation to the host environment. Further studies on the newly reported substrates/interactors are required to test this hypothesis, which warrants interesting insights about new drug targets to fight tuberculosis.

5. Conclusion

PknG is a Serine/Threonine protein kinase recognized as a key player in mycobacterial physiology and pathogenesis. The complete set of substrates and interactors that participate in signal transduction together with PknG needs to be identified to understand the role of the kinase at the molecular level.

Using a tailored approach to study the interactome of PknG, we have identified two new substrates: the enzyme glutamine synthetase and the protein FhaA. Our results show that PknG phosphorylates *in vitro* specific residues in both glutamine synthetase and FhaA, and we provide evidence that these proteins are likely phosphorylated by PknG in living mycobacteria. Our work complements previous reports on PknG substrates and interactors, and reinforces a central role of PknG in the control of the bacterial nitrogen metabolism. In addition, we

provide evidence that PknG might regulate other processes in mycobacterial physiology, including protein translation and cell wall synthesis.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.013>.

Acknowledgments

This work was funded by grants from the Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay (ANII) [FCE_3_2013_1_100358 and FCE_1_2014_1_104045] and FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund, COF 03/11). MG, JR and BR were supported by a fellowship from ANII [POS_NAC_2012_1_8824, POS_NAC_2015_1_109755, POS_FCE_2015_1_1005186] and AC was supported by Agence Nationale pour la Recherche (France) [grant 09 BLAN 0400 01]. We thank M. Portela for her excellent technical support. We also thank Dr. Av-Gay and Dr. S. Mowbray for kindly providing *M. tuberculosis* Δ pknG strain and Rv2220 plasmid respectively.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- [1] World Health Organization, Annual TB Report, http://www.searo.who.int/tb/documents/annual_tb_report_2017/en/, (2017).
- [2] M. Gengenbacher, S.H.E. Kaufmann, *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy, FEMS Microbiol. Rev. 36 (2012) 514–532, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x>.
- [3] D.G. Russell, P.-J. Cardona, M.-J. Kim, S. Allain, F. Altare, Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma, Nat. Immunol. 10 (2009) 943–948, <https://doi.org/10.1038/ni.1781>.
- [4] C. Ortega, R. Liao, L.N. Anderson, T. Rustad, A.R. Ollodart, A.T. Wright, D.R. Sherman, C. Grundner, *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr protein kinase B mediates an oxygen-dependent replication switch, PLoS Biol. 12 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001746>.
- [5] S. Priscic, S. Dankwa, D. Schwartz, M.F. Chou, J.W. Locasale, C.-M. Kang, G. Bemis, G.M. Church, H. Steen, R.N. Husson, Extensive phosphorylation with overlapping specificity by *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (2010) 7521–7526, <https://doi.org/10.1073/pnas.0913482107>.
- [6] S. Fortuin, G.G. Tomazella, N. Nagaraj, S.L. Sampson, N.C. Gey van Pittius, N.C. Soares, H.G. Wiker, G.A. de Souza, R.M. Warren, Phosphoproteomics analysis of a clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolate: Expanding the mycobacterial phosphoproteome catalog, Front. Microbiol. 6 (2015) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00006>.
- [7] U. Kusebauch, C. Ortega, A. Ollodart, R.S. Rogers, D.R. Sherman, R.L. Moritz, C. Grundner, *Mycobacterium tuberculosis* supports protein tyrosine phosphorylation, Proc. Natl. Acad. Sci. 111 (2014) 9265–9270, <https://doi.org/10.1073/pnas.1323894111>.
- [8] S. Priscic, R.N. Husson, *Mycobacterium tuberculosis* Serine/Threonine protein kinases, Microbiol. Spectr 2 (2014), <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0006-2013>.
- [9] D.R. Sherman, C. Grundner, Agents of change - concepts in *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr/Tyr phosphosignalling, Mol. Microbiol. 94 (2014) 231–241, <https://doi.org/10.1111/mmi.12747>.
- [10] S.T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eigler, S. Gas, C.E. Barry, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.-A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, B.G. Barrell, Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, Nature 393 (1998) 537–544, <https://doi.org/10.1038/31159>.
- [11] Y. Av-Gay, M. Everett, The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*, Trends Microbiol. 8 (2000) 238–244.
- [12] S. Cowley, M. Ko, N. Pick, R. Chow, K.J. Downing, B.G. Gordhan, J.C. Betts, V. Mizrahi, D. Smith, R.W. Stokes, Y. Av-Gay, The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo, Mol. Microbiol. 52 (2004) 1691–1702, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04085.x>.
- [13] N.A. Kruh, J. Trout, A. Izzo, J. Prenni, K.M. Dobos, Portrait of a pathogen: the *Mycobacterium tuberculosis* proteome in vivo, PLoS One. 5 (2010) e13938, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013938>.
- [14] A. Wehenkel, M. Bellinzoni, M. Graña, R. Duran, A. Villarino, P. Fernandez, G. Ander-Leroux, P. England, H. Takiff, C. Cerveñansky, S.T. Cole, P.M. Alzari,

- Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential, *Biochim. Biophys. Acta* 1784 (2008) 193–202, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.08.006>.
- [15] B. Rieck, G. Degiacomi, M. Zimmermann, A. Cascioferro, F. Boldrin, N.R. Lazar-Adler, A.R. Botttrill, F. le Chevalier, W. Frigui, M. Bellinzoni, M.N. Lisa, P.M. Alzari, L. Nguyen, R. Brosch, U. Sauer, R. Manganelli, H.M. O'Hare, PknG Senses Amino Acid Availability to Control Metabolism and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, (2017), <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006399>.
- [16] J. Walburger, A. Koul, L. Nguyen, C. Crescianotto-Baschong, K. Huygen, B. Klebl, C. Thompson, C. Bacher, Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages, *Science* 80 (2004) 1800–1804, <https://doi.org/10.1126/science.1099384>.
- [17] M.Z. Khan, A. Bhaskar, S. Upadhyay, P. Kumari, R.S. Rajmani, P. Jain, A. Singh, D. Kumar, N.S. Bhavesh, V.K. Nandicoori, Protein kinase G confers survival advantage to *Mycobacterium tuberculosis* during latency-like conditions, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 16093–16108, <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.797563>.
- [18] R. Paroha, R. Chourasia, R. Mondal, S.K. Chaurasiya, PknG supports mycobacterial adaptation in acidic environment, *Mol. Cell. Biochem.* (2017) 1–12, <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3211-x>.
- [19] K.A. Wolff, H.T. Nguyen, R.H. Cartabuke, A. Singh, S. Ogowang, L. Nguyen, Protein kinase G is required for intrinsic antibiotic resistance in mycobacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 3515–3519.
- [20] H.M. O'Hare, R. Durán, C. Cerveñansky, M. Bellinzoni, A.M. Wehenkel, O. Pritsch, G. Obal, J. Baumgartner, J. Vialaret, K. Johnsson, P.M. Alzari, Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria, *Mol. Microbiol.* 70 (2008) 1408–1423, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06489.x>.
- [21] K.A. Wolff, A.H. de la Peña, H.T. Nguyen, T.H. Pham, L.M. Amzel, S.B. Gabelli, L. Nguyen, A redox regulatory system critical for mycobacterial survival in macrophages and biofilm development, *PLoS Pathog.* 11 (2015) 1–20, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004839>.
- [22] J. Deng, L. Bi, L. Zhou, S. Guo, J. Fleming, H. Jiang, Y. Zhou, J. Gu, Q. Zhong, Z. Wang, Z. Liu, R. Deng, J. Gao, T. Chen, W. Li, J. Wang, X. Wang, H. Li, F. Ge, G. Zhu, H. Zhang, J. Gu, F. Wu, Z. Zhang, D. Wang, H. Hang, Y. Li, L. Cheng, X. He, S. Tao, X. Zhang, *Mycobacterium tuberculosis* proteome microarray for global studies of protein function and immunogenicity, *Cell Rep.* 9 (2014) 2317–2329, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.023>.
- [23] K.C. Nadeki, B. Calder, M. Barnejee, A. Giddey, A.J. Nel, S. Garnett, J.M. Blackburn, N.A. Da Cruz Soares, Identification of novel physiological substrates of *Mycobacterium Bovis* BCG Protein Kinase G (PknG) by label-free quantitative phosphoproteomics, *Mol. Cell. Proteomics* 17 (2018) 1365–1377.
- [24] F.-L. Wu, Y. Liu, H.-W. Jiang, Y. Luan, H. Zhang, X. He, Z.-W. Xu, J.-L. Hou, L.-Y. Ji, Z. Xie, D.M. Czajkowsky, W. Yan, J.-Y. Deng, L.-J. Bi, X.-E. Zhang, S.-C. Tao, The Ser/Thr protein kinase protein-protein interaction Map of *M. tuberculosis*, *Mol. Cell. Proteomics* 16 (2017) 1–42.
- [25] M. Gil, M. Graña, F.J. Schopfer, T. Wagner, A. Denicola, B.A. Freeman, P.M. Alzari, C. Batthyány, R. Durán, M. Gil, M. Graña, F.J. Schopfer, T. Wagner, A. Denicola, B.A. Freeman, P.M. Alzari, C. Batthyány, Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* PknG by non-catalytic rubredoxin domain specific modification: reaction of an electrophilic nitro-fatty acid with the Fe-S center, *Free Radic. Biol. Med.* 65 (2013) 150–161, <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- [26] M.N. Lisa, M. Gil, G. André-Leroux, N. Barilone, R. Durán, R.M. Biondi, P.M. Alzari, Molecular basis of the activity and the regulation of the eukaryotic-like S/T protein kinase PknG from *Mycobacterium tuberculosis*, *Structure*. 23 (2015) 1039–1048, <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.04.001>.
- [27] N. Scherr, S. Honnappa, G. Kunz, P. Mueller, R. Jayachandran, F. Winkler, J. Pieters, M.O. Steinmetz, Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 12151–12156, <https://doi.org/10.1073/pnas.0702842104>.
- [28] D. Durocher, S.P. Jackson, The FHA domain, *FEBS Lett.* 513 (2002) 58–66, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03294-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03294-X).
- [29] P. England, A. Wehenkel, S. Martins, S. Hoos, G. André-Leroux, A. Villarino, P.M. Alzari, The FHA-containing protein GarA acts as a phosphorylation-dependent molecular switch in mycobacterial signaling, *FEBS Lett.* 583 (2009) 301–307, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.036>.
- [30] A. Villarino, R. Duran, A. Wehenkel, P. Fernandez, P. England, P. Brodin, S.T. Cole, U. Zimny-Arndt, P.R. Jungblut, C. Cerveñansky, P.M. Alzari, Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions, *J. Mol. Biol.* 350 (2005) 953–963.
- [31] T.J. Nott, G. Kelly, L. Stach, J. Li, S. Westcott, D. Patel, D.M. Hunt, S. Howell, R.S. Buxton, H.M. O'Hare, S.J. Smerdon, An intramolecular switch regulates phosphoindependent FHA domain interactions in *Mycobacterium tuberculosis*, *Sci. Signal* 2 (2009) 1–9.
- [32] J.C. van Kessel, L.J. Marinelli, G.F. Hatfull, Recombineering mycobacteria and their phages, *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (2008) 851–857, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2014>.
- [33] W.W. Krajewski, T.A. Jones, S.L. Mowbray, Structure of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase in complex with a transition-state mimic provides functional insights, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 10499–10504, <https://doi.org/10.1073/pnas.0502248102>.
- [34] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 68 (1996) 850–858, <https://doi.org/10.1021/ac950914h>.
- [35] P.C. Carvalho, J.S.G. Fischer, T. Xu, J.R. Yates, V.C. Barbosa, PatternLab: From mass spectra to label-free differential shotgun proteomics, *Curr. Protoc. Bioinforma.* (2012) 1–18, <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1319s40>.
- [36] P.C. Carvalho, D.B. Lima, F.V. Leprevost, M.D.M. Santos, J.S.G. Fischer, P.F. Aquino, J.J. Moresco, J.R. Yates, V.C. Barbosa, V.C. Barbosa, Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0, *Nat. Protoc.* 11 (2016) 102–117.
- [37] P.C. Carvalho, J.S.G. Fischer, J. Perales, J.R. Yates, V.C. Barbosa, E. Bareinboim, Analyzing marginal cases in differential shotgun proteomics, *Bioinformatics*. 27 (2011) 275–276, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq632>.
- [38] A. Kapopoulou, J.M. Lew, S.T. Cole, The MycoBrowser portal: A comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes, *Tuberculosis*. 91 (2011) 8–13, <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.09.006>.
- [39] W. Gish, D.J. States, Identification of protein coding regions by database similarity search, *Nat. Genet.* 3 (1993) 266–272, <https://doi.org/10.1038/ng0393-266>.
- [40] D. Szklarczyk, A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, A. Roth, A. Santos, K.P. Tsafou, M. Kuhn, P. Bork, L.J. Jensen, C. Von Mering, STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) D447–D452, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>.
- [41] H. Mi, S. Poudel, A. Muruganujan, J.T. Casagrande, P.D. Thomas, PANTHER version 10: Expanded protein families and functions, and analysis tools, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) D336–D342, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1194>.
- [42] J.A. Vizcaino, A. Csordas, N. Del-Toro, J.A. Dians, J. Griss, I. Lavidas, G. Mayer, Y. Perez-Riverol, F. Reisinger, T. Terment, Q.W. Xu, R. Wang, H. Hermjakob, 2016 update of the PRIDE database and its related tools, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) D447–D456, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1145>.
- [43] R. Mehta, J.T. Pearson, S. Mahajan, A. Nath, M.J. Hickey, D.R. Sherman, W.M. Atkins, Adenylation and catalytic properties of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase expressed in *Escherichia coli* versus mycobacteria, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 22477–22482, <https://doi.org/10.1074/jbc.M401652200>.
- [44] B.M. Shapiro, H.S. Kingdon, E.R. Stadtman, Regulation of glutamine synthetase. VII. Adenylyl glutamine synthetase: a new form of the enzyme with altered regulatory and kinetic properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 58 (1967) 642–649.
- [45] C. Grundner, L.M. Gay, T. Alber, *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknB, PknD, PknE, and PknF phosphorylate multiple FHA domains, *Protein Sci.* 14 (2005) 1918–1921, <https://doi.org/10.1110/ps.05143405>.
- [46] M. Gupta, A. Sajid, G. Arora, V. Tandon, Y. Singh, Forkhead-associated domain-containing protein Rv0019c and polyketide-associated protein PapA5, from substrates of serine/threonine protein kinase PknB to interacting proteins of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 34723–34734, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058834>.
- [47] V. Molle, D. Soulat, J.M. Jault, C. Grangeasse, A.J. Cozzone, J.F. Prost, Two FHA domains on an ABC transporter, Rv1747, mediate its phosphorylation by PknF, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*, *FEMS Microbiol. Lett.* 234 (2004) 215–223, <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.03.033>.
- [48] K. Sharma, M. Gupta, A. Krupa, N. Srinivasan, Y. Singh, EmbR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis*, *FEBS J.* 273 (2006) 2711–2721, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05289.x>.
- [49] B. Calder, C. Albeldas, J.M. Blackburn, N.C. Soares, Mass spectrometry offers insight into the role of ser/thr/tyr phosphorylation in the mycobacteria, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1–8, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00141>.
- [50] C. Roumestand, J. Leiba, N. Galophe, E. Margeat, A. Padilla, Y. Bessin, P. Barthe, V. Molle, M. Cohen-Gonsaud, Structural insight into the *Mycobacterium tuberculosis* Rv0020c protein and its interaction with the PknB kinase, *Structure*. 19 (2011) 1525–1534, <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.07.011>.
- [51] J.L. Dahl, C.N. Kraus, H.I.M. Boshoff, B. Doan, K. Foley, D. Avarbock, G. Kaplan, V. Mizrahi, H. Rubin, C.E. Barry, The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 10026–10031, <https://doi.org/10.1073/pnas.1631248100>.
- [52] R. Verma, S.M. Pinto, A.H. Patil, J. Advani, P. Subba, M. Kumar, J. Sharma, G. Dey, R. Ravikumar, S. Buggi, P. Satishchandra, K. Sharma, M. Suar, S.P. Tripathy, D.S. Chauhan, H. Gowda, A. Pandey, S. Gandotra, T.S.K. Prasad, Quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis of H37Ra and H37Rv strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Proteome Res.* 16 (2017) 1632–1645, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00983>.
- [53] J.S. Rees, N. Lowe, I.M. Armean, J. Roote, G. Johnson, E. Drummond, H. Spriggs, E. Ryder, S. Russell, D.S. Johnston, K.S. Lilley, In vivo analysis of proteomes and interactomes using parallel affinity capture (IPAC) coupled to mass spectrometry, *Mol. Cell. Proteomics*. 10 (2011), <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.002386>.
- [54] N. Dephoure, K.L. Gould, S.P. Gygi, D.R. Kellogg, Mapping and analysis of phosphorylation sites: a quick guide for cell biologists, *Mol. Biol. Cell.* 24 (2013) 535–542, <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-09-0677>.
- [55] M. Mann, S. Ong, M. Gr, H. Steen, O.N. Jensen, A. Pandey, Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome, *Trends Biotechnol.* 20 (2002) 261–268, [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)01944-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)01944-3).
- [56] M.J. Canova, R. Veyron-Churlet, I. Zanella-Cleon, M. Cohen-Gonsaud, A.J. Cozzone, M. Becchi, L. Kremer, V. Molle, The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinase PknL phosphorylates Rv2175c: Mass spectrometric profiling of the activation loop phosphorylation sites and their role in the recruitment of Rv2175c, *Proteomics*. 8 (2008) 521–533, <https://doi.org/10.1002/pmic.200700442>.
- [57] A. Gouzy, Y. Poquet, O. Neyrolles, Nitrogen metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and virulence, *Nat. Rev. Microbiol.* 12 (2014) 729–737, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3349>.
- [58] M.V. Tullius, G. Harth, M.A. Horwitz, Glutamine synthetase GlnA1 is essential for

- growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human THP-1 macrophages and Guinea Pigs glutamine synthetase GlnA1 is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human THP-1 macrophages and Guinea Pigs, *Infect. Immun.* 71 (2003) 3927–3936.
- [59] X. Carette, J. Platig, D.C. Young, M. Helmelt, A.T. Young, Z. Wang, L.-P. Potluri, C.S. Moody, J. Zeng, S. Priscic, J.N. Paulson, J. Muntel, A.V.R. Madduri, J. Velarde, J.A. Mayfield, C. Locher, T. Wang, J. Quackenbush, K.Y. Rhee, D.B. Moody, H. Steen, R.N. Hussion, Multisystem analysis of *Mycobacterium tuberculosis* reveals kinase-dependent remodeling of the pathogen-environment interface, *MBio* 9 (2018) e02333.
- [60] G. Harth, M. Horwitz, An inhibitor of exported *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase selectively blocks the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes: extracellular proteins as potential novel drug targets, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 1425–1436.
- [61] P. Carroll, C.A. Pashley, T. Parish, Functional analysis of GlnE, an essential adenyl transferase in *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Bacteriol.* 190 (2008) 4894–4902, <https://doi.org/10.1128/JB.00166-08>.
- [62] J.A. Leigh, J.A. Dodsworth, Nitrogen regulation in bacteria and archaea, *Annu. Rev. Microbiol.* 61 (2007) 349–377, <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093409>.
- [63] E.R. Stadtman, The story of glutamine synthetase regulation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 44357–44364, <https://doi.org/10.1074/jbc.R100055200>.
- [64] C.C.L. Gee, K.G.K. Papavinasasundaram, S.R. Blair, C.E. Baer, A.M. Falick, D.S. King, J.E. Griffin, H. Venghatakrishnan, A. Zukauskas, J.-R. Wei, R.K. Dhiman, D.C. Crick, E.J. Rubin, C.M. Sassetti, T. Alber, A phosphorylated pseudokinase complex controls cell wall synthesis in mycobacteria, *Sci. Signal.* 5 (2012) 1–24, <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002525>.
- [65] C. Roumestand, J. Leiba, N. Galophe, E. Margeat, A. Padilla, Y. Bessin, P. Barthe, V. Molle, M. Cohen-Gonsaud, Structural insight into the *Mycobacterium tuberculosis* Rv0020c protein and its interaction with the PknB kinase, *Structure.* 19 (2011) 1525–1534, <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.07.011>.

FhaA plays a key role in mycobacterial polar elongation and asymmetric growth

Jessica Rossello,^{1,2} Bernardina Rivera,¹ Maximiliano Anzibar Fialho,² Ingrid Augusto,³ Magdalena Gil,¹ Marina Andrea Forrellad,⁴ Fabiana Bigi,⁴ Azalia Rodríguez Taño,^{1,5} Estefanía Urdániz,⁶ Mariana Piuri,⁶ Kildare Miranda,³ Anne Marie Wehenkel,⁷ Pedro M. Alzari,⁸ Leonel Malacrida,^{2,9} Rosario Durán¹

AUTHOR AFFILIATIONS See affiliation list on p. 19.

ABSTRACT Mycobacteria, including pathogens like *Mycobacterium tuberculosis*, exhibit unique growth patterns and cell envelope structures that challenge our understanding of bacterial physiology. This study sheds light on FhaA, a conserved protein in *Mycobacteriales*, revealing its pivotal role in coordinating cell envelope biogenesis and asymmetric growth. The elucidation of the FhaA interactome in living mycobacterial cells reveals its participation in the protein network orchestrating cell envelope biogenesis and cell elongation/division. By manipulating FhaA levels, we uncovered its influence on cell morphology, cell envelope organization, and the localization of peptidoglycan biosynthesis machinery. Notably, *fhaA* deletion disrupted the characteristic asymmetric growth of mycobacteria, highlighting its importance in maintaining this distinctive feature. Our findings position FhaA as a key regulator in a complex protein network, orchestrating the asymmetric distribution and activity of cell envelope biosynthetic machinery. This work not only advances our understanding of mycobacterial growth mechanisms but also identifies FhaA as a potential target for future studies on cell envelope biogenesis and bacterial growth regulation. These insights into the fundamental biology of mycobacteria may pave the way for novel approaches to combat mycobacterial infections addressing the ongoing challenge of diseases like tuberculosis in global health.

IMPORTANCE *Mycobacterium tuberculosis*, the bacterium responsible for tuberculosis, remains a global health concern. Unlike most well-studied model bacilli, mycobacteria possess a distinctive and complex cell envelope, as well as an asymmetric polar growth mode. However, the proteins and mechanisms that drive cell asymmetric elongation in these bacteria are still not well understood. This study sheds light on the role of the protein FhaA in this process. Our findings demonstrate that FhaA localizes at the septum and asymmetrically to the poles, with a preference for the fast-growing pole. Furthermore, we showed that FhaA is essential for population heterogeneity and asymmetric polar elongation and plays a role in the precise subcellular localization of the cell wall biosynthesis machinery. Mycobacterial asymmetric elongation results in a physiologically heterogeneous bacterial population which is important for pathogenicity and response to antibiotics, stressing the relevance of identifying new factors involved in these still poorly characterized processes.

KEYWORDS *Mycobacterium*, cell envelope, cell division, cell asymmetry, proteomics, confocal microscopy, electron microscopy

Mycobacterium tuberculosis, the causative agent of tuberculosis, is among the deadliest human pathogens. According to the World Health Organization,

Editor Edward W. Yu, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio, USA

Address correspondence to Rosario Durán, duan@pasteur.edu.uy.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 20.

Received 22 August 2024

Accepted 13 December 2024

Published 21 January 2025

Copyright © 2025 Rossello et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

tuberculosis ranked as the first cause of death from a single bacterial infectious agent worldwide (1).

One of the peculiarities of this bacillus lies in its cell growth and division modes, which differ significantly from those of well-studied rod-shaped bacteria, such as *Escherichia coli* or *Bacillus subtilis* (2). Mycobacteria need to synthesize a complex cell wall during growth and division. This distinctive structure, composed of peptidoglycan (PG) covalently attached to arabinogalactans esterified with mycolic acids, is relevant for conferring intrinsic antibiotic resistance and plays a major role in host-pathogen interactions and virulence (3, 4). Moreover, unlike model bacilli that incorporate new cell wall material laterally, mycobacteria exhibit an asymmetric polar elongation mode in which the old pole inherited from the mother cell outpaces the newly formed pole in the rate of cell wall synthesis (2, 5). This asymmetric growth pattern contributes to a diversified population in terms of size and antibiotic susceptibility (6). Furthermore, many well-characterized key members of the protein complexes guiding elongation (elongasome) and division (divisome) in *E. coli* and *B. subtilis* are absent among mycobacteria (2, 7). Hence, the molecular mechanisms underlying cell growth and division in these bacteria remain largely unknown. Nevertheless, an increasing number of mycobacterial-specific cell division and elongation protein candidates have started to be identified, including two ForkHead-Associated (FHA) domain-containing proteins, FhaA and FhaB, which specifically recognize phospho-Thr residues (8–10).

FhaA and FhaB are part of a highly conserved operon in *Mycobacteriales*, that also encodes two shape, elongation, division, and sporulation genes (*rodA* and *pbpA*), two Ser/Thr protein kinases (*pknA* and *pknB*), and the unique phosphoserine/threonine protein phosphatase of the genome (11, 12), pointing to its critical role in cell morphology, growth, and its phospho-regulation.

Here, we focused on *M. tuberculosis* FhaA, a still poorly characterized multidomain protein. FhaA presents a C-terminal FHA domain, which specifically recognizes phosphorylated Thr residues, linked by a ~300 amino acid-long unstructured linker to an N-terminal globular domain with no similarity to any known protein (13). Previous reports provide evidence that supports the role of FhaA in the regulation of cell wall biosynthesis through its interaction with two phosphorylated PknB substrates. FhaA was proposed to inhibit the translocation of PG precursors from the cytosol to the periplasm through its interaction with the phosphorylated pseudokinase domain of the Lipid II flippase Mvin (10). It was also shown to interact with phosphorylated CwlM and potentially regulate the biosynthesis of PG precursors (14). In addition, knocking out *fhaA* in *Mycobacterium smegmatis* resulted in a short-cell phenotype (15), while its depletion caused increased accumulation of nascent PG at the poles and septa (10). Some of these previous data are difficult to reconcile, making the roles of FhaA and its molecular mechanisms still unclear.

Here, we explored protein-protein interactions involving mycobacterial FhaA in living cells. Our results showed that FhaA is part of an extensive protein network linking cell envelope biogenesis to cell elongation/division in mycobacteria. Overexpressing FhaA in *M. smegmatis* cells leads to alterations in composition and/or organization of the cell envelope along with mislocalization of the PG biosynthesis machinery, whereas the deletion of the *fhaA* gene results in elongation defects and the loss of asymmetrical insertion of new cell wall material at the poles. Collectively, our findings indicate that FhaA plays a crucial role in polar growth by regulating the precise subcellular localization and asymmetric distribution of the cell envelope biosynthetic machinery organized within the elongasome.

RESULTS

FhaA interactome in living cells

To decipher the FhaA interactome within live mycobacteria, we employed an unbiased methodology encompassing the overexpression of *M. tuberculosis* Strep-tagged FhaA in *M. smegmatis*. The method relied on a combination of chemical crosslinking, affinity

purification, and protein identification through mass spectrometry (MS) (Fig. 1A). Formaldehyde was selected as the crosslinking agent due to its ability to penetrate the highly hydrophobic cell envelope of mycobacteria and covalently link amino acids in close proximity (16). *M. smegmatis* transformed with the empty plasmid was used as control. To define the FhaA interactome, we compared the proteins recovered by affinity purification in control and *Msmeg_fhaA* strains, using in five biological replicates per condition. As shown in Fig. 1B, 25 proteins were exclusively detected in at least four replicates of the purified protein complexes from *Msmeg_fhaA* ($P \leq 0.01$; Table 1). The list includes FhaA itself, Mvin, the flippase previously reported to interact with FhaA (10), and 23 putative direct or indirect FhaA interactors (Table 1; Table S1). In addition, from 736 proteins identified in affinity-purified fractions from both *Msmeg_fhaA* and control strains, 31 were statistically overrepresented in complexes isolated from *Msmeg_fhaA* (fold change ≥ 2 ; F-stringency: 0.04; q -value ≤ 0.05 ; Fig. 1C; Table S2). Altogether, we report a list of 55 proteins that represent putative direct or indirect FhaA interactors (Table 1; Table S1 and S2). Remarkably, the FhaA interactome comprises proteins with known and predicted physical and functional associations, unveiling statistically enriched compartments, which include the cell pole, cell tip, cell septum, and membrane fraction (Table S3). Among the polar interactors (10, 17–20), two of them (MSMEG_0317 and MSMEG_3080) exhibit an asymmetric distribution, specifically targeting the fast-growing pole (Table 1). Furthermore, functional enrichment analysis emphasized various interconnected biological processes, encompassing the regulation

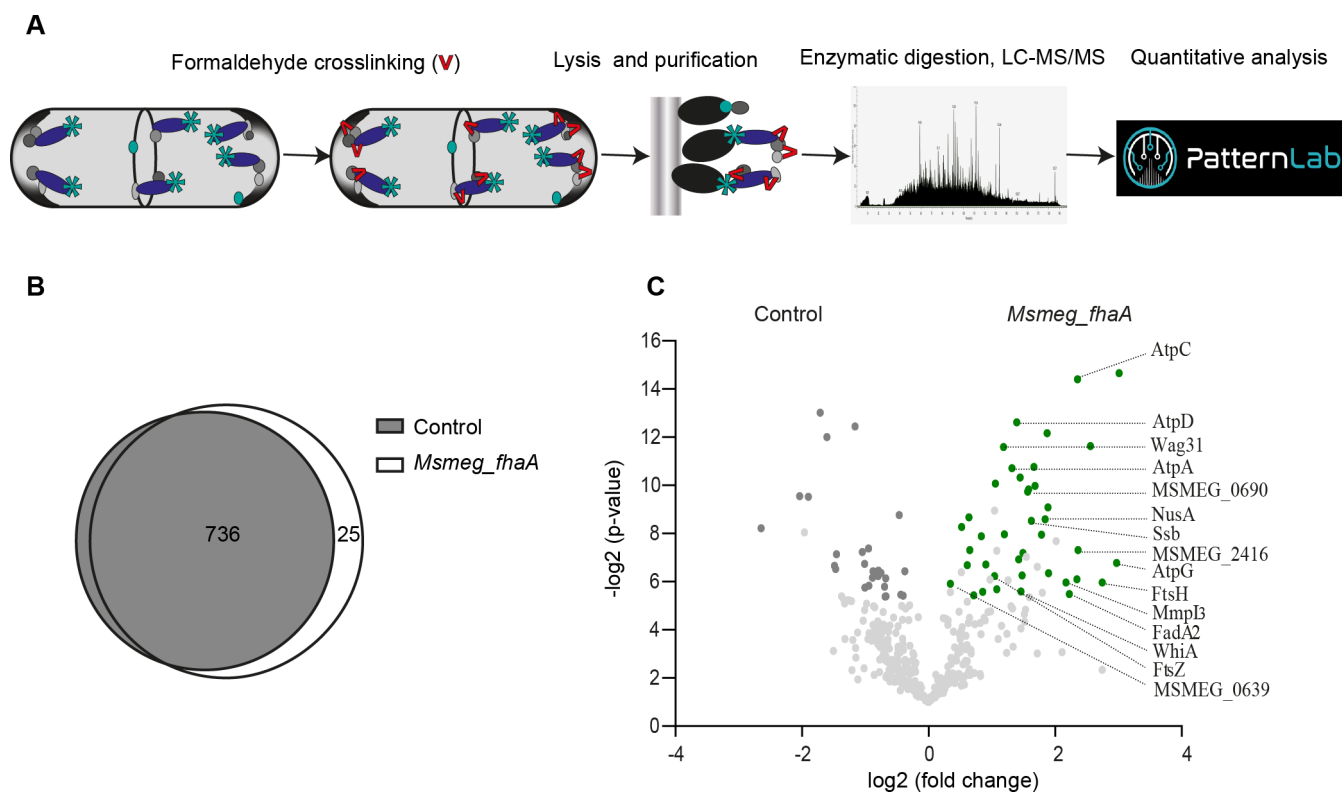


FIG 1 FhaA interactome in the living cell. (A) Scheme of the strategy used to identify FhaA interacting proteins. Cultures of *M. smegmatis* overexpressing *M. tuberculosis* FhaA fused to Streptag were incubated with formaldehyde. FhaA covalently linked to its protein partners was purified using Strep-Tactin columns, and the recovered proteins were digested and identified by nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). (B) Venn diagram showing the number of proteins identified in *Msmeg_fhaA* and control strains after affinity chromatography. Using the probability mode of PatternLab Venn diagram module, 25 proteins were statistically identified as exclusive of FhaA interactome ($P < 0.01$; Table 1; Table S1). (C) Volcano plot showing proteins identified in at least 7 replicates of the 10 replicates analyzed, plotted according to its P -value ($-\log_2 P$) and fold change ($\log_2$ Fold change). Proteins statistically enriched in FhaA complexes (q -value ≤ 0.05) with a fold change greater than 2 are displayed in green, and those related to cell elongation/cell envelope biosynthesis are labeled. Fold changes and P -values for each of the 31 differential proteins are depicted in Table S2.

TABLE 1 FhaA interactome: proteins exclusively detected in FhaA-mediated complexes^a

ID	Ortholog in Mtb	Protein name	Subcellular localization	Proposed function/activity
FhaA	Rv0020c	FhaA	Poles and septum (10)	PG synthesis (10)/cell envelope biogenesis (15)
MSMEG_0317	Rv0227c	Integral membrane protein	Membrane (2 TMH). Septum and poles, mainly old pole (17)	Mycolate precursors translocation/LAM and LM maturation (17, 21)
MSMEG_6284	Rv3720	Cyclopropane fatty-acyl-phospholipid synthase	Cytosol	Lipid Biosynthetic process (22)
MSMEG_5308	Rv1057	Uncharacterized protein	Poles and septum (18)	Mycolate precursor translocation stabilizes the trehalose monomycolate transport complex under stress conditions (18)
MSMEG_6929	Rv3910	Integral membrane protein (MviN)	Membrane (15 TMH). Poles and septum (10)	PG synthesis (10, 22)
MSMEG_0692	Rv0312	Conserved hypothetical proline and threonine-rich protein	Membrane (1 TMH) (23)	ATP binding (22)
MSMEG_5048	Rv1249c	Putative membrane protein	Membrane (2 TMH)–peri-polar region (24)	Unknown
MSMEG_1193	Rv1940	TROVE domain protein	Cytosol	Unknown RNA binding (22)
cswA	Rv0008c	Cell wall synthesis protein CwsA	Membrane (1 TMH). Poles and septum (19)	Cell division, cell wall synthesis, and the maintenance of cell shape (19)
msrB	Rv2674	Methionine-R-sulfoxide reductase	Cytosol	Protein repair/response to oxidative stress (22)
ppm1	Rv2051c	Polyprenol monophosphomannose synthase	Cytosol	Glycosyltransferase/LAM/LM synthesis (22)
MSMEG_5336	Rv1063c	Amidate substrates transporter protein	Membrane (7 TMH)	Transport (22)
MSMEG_3148	Rv1480	Uncharacterized protein	Cytosolic	Transcriptional regulator vWFA_domain (22)
MSMEG_6282	Rv3718c	KanY protein	Cytosolic	Polyketide synthesis (22)
MSMEG_3641	Rv1836c	Uncharacterized protein	Membrane (1 TMH)	Unknown
MSMEG_6757	Rv2989	Glycerol operon regulatory protein	–	Regulation of DNA-templated transcription (22)
MSMEG_3255	Rv2458	DoxX subfamily protein	Membrane (2 TMH)	Unknown
spa	Rv0724	Putative protease IV Sppa	Membrane (22)	Peptidase
MSMEG_3080	Rv1422	Putative gluconeogenesis factor	Cytosol. Poles, mainly old pole (20)	Cell shape/PG synthesis (20)
MSMEG_4753	Rv2521	Antioxidant, AhpC/TSA family protein		Cell redox homeostasis
MSMEG_1011	Rv3057c	Short-chain dehydrogenase	Peri-polar region (24)	
secD	Rv2587c	Protein translocase subunit SecD	Membrane (6 TMH)	Protein transport
MSMEG_0736	Rv0383c	Putative conserved secreted protein	Membrane (1 TMH) (18). Poles (25)	Mmpl3-dependent trehalose monomycolate transport to the cell wall. Cell elongation (18)
MSMEG_5505	Rv0966c	Uncharacterized protein	–	Uncharacterized
MSMEG_4188	Rv2129c	Short-chain dehydrogenase	–	Unknown

^aProteins detected in at least four out of five *Msmeg_fhaA* replicates but absent in all control replicates and statistically validated using the Bayesian model integrated into PatternLab for Proteomics are shown. TMH: transmembrane helix; LAM: lipoarabinomannan; LM: lipomannan. Dashes indicate unknown localization.

of developmental processes, cell shape regulation, as well as cell cycle and division regulation (Table S3). The recovery of previously known interactors, along with proteins that share the same subcellular localization and are involved in the same biological processes as FhaA, points to a reliable and physiologically relevant interactome.

Proteins recovered from FhaA interactome are related to cell division/elongation and cell envelope biogenesis

A detailed analysis of the FhaA interactors sheds light on its possible functions. The most abundant protein in the FhaA interactome, MSMEG_0317, is the integral membrane

protein PgfA (for polar growth factor A) that was recently identified as being crucial for growth from the old pole (17). PgfA also interacts with MmpL3, the trehalose monomycolate (TMM) transporter that plays an important role in mycolic acid trafficking across the membrane and cell envelope composition (17, 18). Interestingly, two additional FhaA interactors participate in the regulation of MmpL3-mediated mycolic acid translocation: MSMEG_5308 and MSMEG_0736, with the latter being renamed as TtfA (for TMM transport factor A) (18). Overall, the interactome includes nine previously reported MmpL3 interactors (18, 26) in addition to MmpL3 itself.

Proteins that participate in the biosynthesis of the different layers of the complex mycobacterial cell wall were also recovered as FhaA direct/indirect interactors. In addition to Mvin (10), the list includes CwsA (for cell wall synthesis protein A) (27), proteins that participate in lipomannan (LM) and lipoarabinomannan (LAM) biosynthesis such as the polyprenyl monophosphomannose synthase Ppm1 (28, 29) and MSMEG_0317 (17, 21), or yet the transcriptional regulator WhiA and the DivIVA domain-containing protein SepIVA (MSMEG_2416), both involved in cell division, cell length, and/or cell envelope biosynthesis (30, 31). Finally, the interactome also includes the scaffolds of the divisome and elongasome machineries (FtsZ and Wag31 respectively). Taken together, these results strongly support the involvement of FhaA in mycobacterial cell envelope biosynthesis during cell growth and division.

FhaA overexpression alters cell envelope composition/structure

The overexpression of FhaA leads to a significant decrease in cell surface hydrophobicity (Fig. 2A), supporting the hypothesis that this protein is involved in cell wall biogenesis. As this is a physicochemical property pivotal for cell-cell and cell-surface adhesion behaviors (32, 33), we investigated the impact of FhaA overexpression on the formation of multicellular structures and observed that the *Msmeg_fhaA* strain has an impaired capability of biofilm formation (Fig. 2B), which is not related to defects in the final biomass reached (Fig. S1A). Furthermore, we confirmed that the strain overexpressing FhaA exhibits altered permeability compared to the control strain. The ethidium bromide uptake assay demonstrated that *Msmeg_fhaA* is more permeable (Fig. S1B), consistent with our previous results.

Transmission electron microscopy (TEM) images confirmed that the strain overexpressing FhaA exhibits an abnormal cell envelope (Fig. 2C; Fig. S2). The images show areas that have an unusually thick cell wall that appear as electron-lucid blobs with aberrant distribution (Fig. S2). Compared to the control, there is an increase in the average thickness of the cell envelope (Fig. 2C and D), with these thickened areas being heterogeneously distributed across the surface. (Fig. S2). Cell wall maps across the cell volume obtained by electron tomography (ET) further confirm the alterations in the *Msmeg_fhaA* cell envelope and highlight the thickness heterogeneity along the cell volume (Fig. 2D).

Further evidence for the effect of FhaA overexpression on cell envelope comes from the analysis of membrane properties of the two strains. We used scanning confocal microscopy to image cells previously treated with 6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene (LAURDAN), an amphiphilic fluorescent dye that penetrates the membrane lipids and whose emission spectra change according to environment molecular composition and polarity (34, 35). This approach was previously used to assess cell envelope remodeling in mycobacteria (36, 37). When water accessibility at the membrane interface increases, LAURDAN exhibits a green-shifted fluorescence, while in more ordered membranes, its emission is blue shifted. We used this property to provide an initial, broad assessment of potential differences in the composition and/or physical structure of the lipidic layers and/or its associated cell wall structures, upon FhaA overexpression.

When plotted on a diagram, phasors corresponding to the control strain tend to cluster at higher angles and closer to the origin of the axes compared to those representing *Msmeg_fhaA* (Fig. 3). In addition, there is a change in the profile on the linear combination obtained at the phasor plot for the two strains. Thus, the misalignment

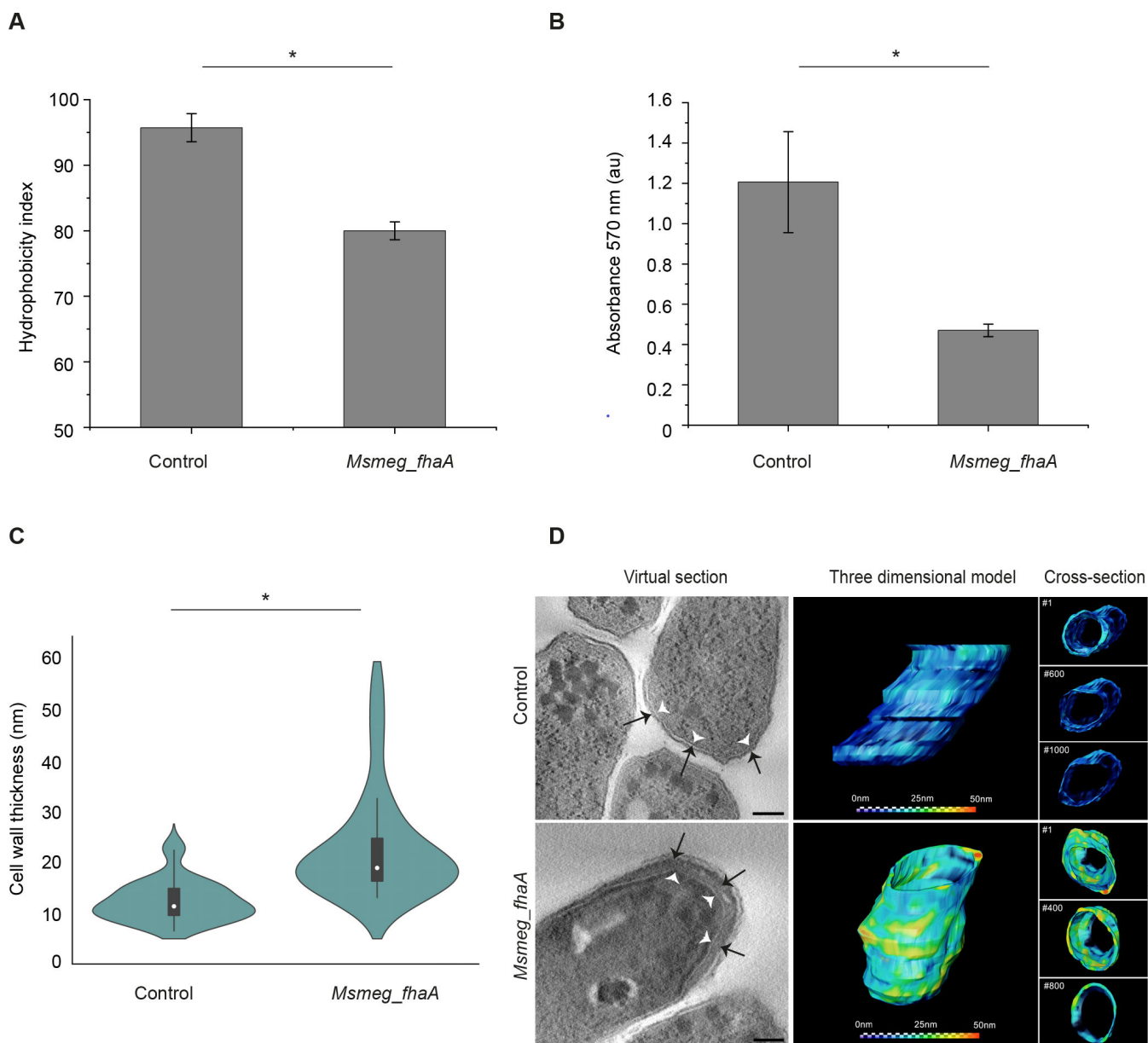


FIG 2 FhaA overexpression alters mycobacteria cell surface and cell envelope composition/structure. (A) Cell surface hydrophobicity test. The figure shows the partitioning of control and *Msmeg_fhaA* strains between phosphate-buffered saline (PBS) and xylene. The graph depicts the hydrophobicity index, defined as the percentage of the initial aqueous layer absorbance retained in the xylene fraction after partitioning. Assays were performed by triplicate mean $\pm$ SD; * indicates a statistically significant difference determined by analysis of variance (ANOVA), $P < 0.05$. (B) Biofilm formation assay. Biofilm formation was evaluated in 96-well plates, by staining biofilms with crystal violet and measuring absorbance at 570 nm. Mean $\pm$ SD; * indicates a statistically significant difference determined by ANOVA, $P < 0.05$. (C) Graphic comparison of the average cell wall thickness measured from transmission electron microscopy (TEM) images (Fig. S2) for each strain. Violin plot illustrates the distribution of wall thickness, supporting the heterogeneity observed in the *Msmeg_fhaA* strain. Kolmogorov-Smirnov was applied; $n = 30$ cells for each group; * = $P < 0.05$. White circles represent median; gray boxes represent 25%–75% percentile; values outside whiskers represent outliers. (D) Thickness map representing variations in cell wall thickness across the cell volume. The color intensity corresponds to the magnitude of thickness, where warmer hues indicate greater thickness (25–50 nm) and cooler hues denote thinner regions (0–25 nm). Left panel: virtual sections from representative control and *Msmeg_fhaA* tomograms (control magnification 25,000 $\times$; *Msmeg_fhaA* magnification 14,500 $\times$). White arrowheads indicate the plasma membrane. Notably, an increase in the middle layer (black arrows) is observed within the cell wall of *Msmeg_fhaA*, contrasting with the consistently thinner layer exhibited in the control. Scale bar: 100 nm. Right panel: three-dimensional model of partial volumes of control and *Msmeg_fhaA* cells. A predominant dark blue phenotype throughout the volume is observed for control strain, while there is a prevalence of warm hues along the majority of the *Msmeg_fhaA* sampled volume, indicating the increase in the wall thicknesses. On the right side, cross-section view of different sequential slices along the Z axis. Numbers indicate where the models were sectioned.

between the two trajectories plus the spectral shift and broadening observed for the strain overexpressing FhaA can be attributed to changes in the molecular environment sensed by LAURDAN (Fig. 3B).

Altogether, our results indicate that FhaA overexpression has important impacts on mycobacterial cell envelope composition and/or structure.

The overexpression of FhaA affects cell morphology

To investigate the effect of FhaA on elongation, we evaluated cell morphology of *Msmeg_fhaA*. Confocal microscopy analysis of bacteria stained with sulforhodamine-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (sulforhodamine-DHPE) revealed that the overexpression of FhaA led to significantly shorter cells, exhibiting an average length of $4.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (average length of control: $7.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$; Fig. 4A). This observation was subsequently corroborated through scanning electron microscopy (SEM), which revealed that *Msmeg_fhaA* cells exhibit abnormal and heterogeneous morphology and dimensions, marked by shorter and wider cells with defects at poles and septum, the places where new cell wall material is incorporated. While in some cases swelling at the septum was observed, the vast majority of the cells presented defects at the poles (Fig. 2D and 4B). The aberrant morphology is distinguished by the thickening and curling of bacterial poles, with swollen and bulged tips that suggest compromised polar cell envelope integrity. Interestingly, these defects were mainly asymmetrical, being observed at one of the cell poles, with fewer cells presenting alterations at both poles (Fig. 4B). Ultrastructural analysis of cell poles by ET showed three cell wall layers as expected, with the middle layer displaying increased thickness in *Msmeg_fhaA* when compared to the control strain (Fig. 2D; Video S1), suggesting an altered synthesis of the layers between the mycomembrane and inner membrane. The virtual section of a cell tomogram from an aberrant *Msmeg_fhaA* pole corroborated the thickening of the cell wall (Fig. 2D and 4D). These observed morphological alterations thus suggest that FhaA overexpression disrupts normal polar cell elongation and cell wall synthesis.

FhaA overexpression leads to the mislocalization of PG biosynthesis

Next, we evaluated the effect of FhaA overexpression on PG synthesis using the fluorescent D-amino acid analog 3-[[[(7-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-yl)carbonyl]amino]-D-alanine hydrochloride (HADA) (38) to label the nascent PG. As expected, new cell wall material in the control strain is specifically inserted at the poles and septum (Fig. 5A). However, in the *Msmeg_fhaA* strain, PG synthesis is not strictly confined to these sites, as HADA is additionally incorporated into discrete foci along the cell surface (Fig. 5A). To quantify the extent of PG synthesis delocalization, we assessed the distance between focal points of HADA incorporation in each bacterium, normalized to the cell length. As expected, we detected two or three local maxima of fluorescence intensity for the control strain (Fig. 5A and C) corresponding to the two poles (non-septate cells) or to the two poles plus the septum (septate cells), respectively (average number of HADA foci per cell: 2.7 ± 0.5). In this case, the interspace between foci of PG synthesis correlates with the pole-septum or pole-pole distances as expected (Fig. 5B and C). For *Msmeg_fhaA*, the average number of foci per cell increases to 4.5 ± 1.7 , and the relative distance between foci is significantly shorter, indicating that the PG biosynthetic machinery is mislocalized (Fig. 5B and C).

The abnormal localization of the cell wall synthesis machinery, leading to bulges and branches, was previously shown for *M. smegmatis* strains overexpressing the elongasome scaffold Wag31 (39). To evaluate if the delocalization of the PG synthesis machinery could be associated with increased levels of Wag 31 in *Msmeg_fhaA*, we performed a comparative analysis by mass spectrometry. The results confirmed the overexpression of FhaA, but Wag31 levels were not statistically different between *Msmeg_fhaA* and control strain (Table S4). This result suggests that the elevated levels of FhaA could be the primary factor driving the delocalization of cell wall biosynthesis machinery.

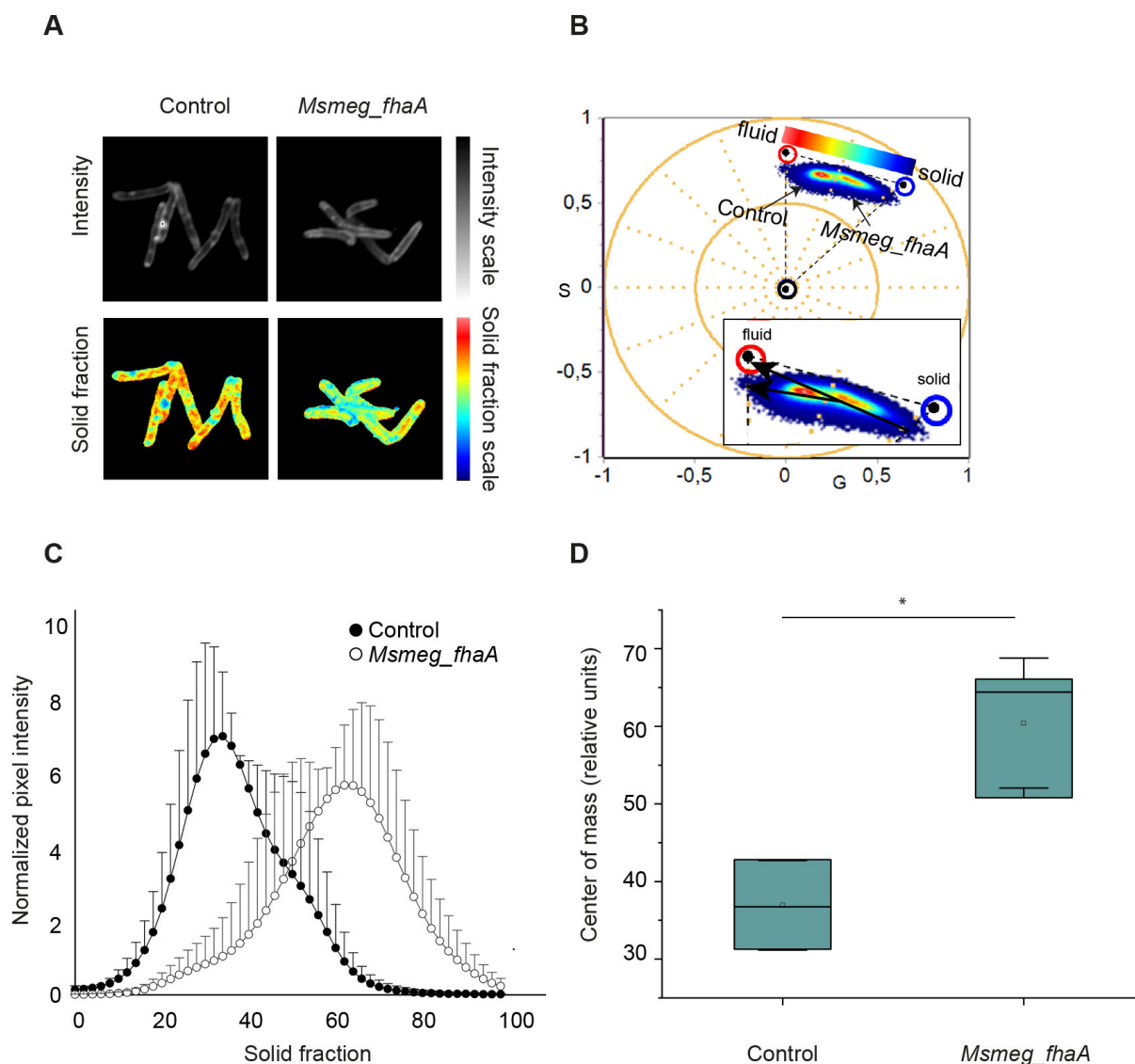


FIG 3 Scanning confocal microscopy using the fluorescent dye LAURDAN. (A) Representative images for intensity and pseudocolor image of LAURDAN from of control and *Msmeg_fhaA* strains. Pseudocolor images were generated by using the color scale indicated on panel B and represent spectral shift from blue to red. (B) Spectral phasor plot of LAURDAN fluorescence emission from control and *Msmeg_fhaA* strains. Emission spectra were Fourier transformed into the G and S (corresponding to the real and imaginary parts of the first harmonic of the Fourier transform) to obtain the spectral phasor plot. Data indicate strong differences in envelope fluidity between strains, as measured by LAURDAN emission. The *Msmeg_fhaA* strain clusters are shifted clockwise (blue-shifted) relative to the control strain and are further from the plot origin (indicating spectral widening). Additionally, the amplified section shows two different trajectories corresponding to each strain, clearly indicating different molecular environments for LAURDAN. (C) Plots illustrating normalized pixel intensity vs solid fraction. Black dots represent the control strain; white dots represent the *Msmeg_fhaA* strain. (D) Box plot representing the values of the center of mass for the curves depicted in panel C.

FhaA is necessary for asymmetric polar elongation

To further investigate the role of FhaA in elongation, we evaluated the cell morphology and HADA incorporation for a strain lacking FhaA (*Msmeg_ΔfhaA*). In accordance with a previous report (15), *Msmeg_ΔfhaA* cells were shorter than the wild-type (WT) strain, and cell length was partially recovered after complementation (Fig. 6A) confirming a role for FhaA in cell elongation.

Fluorescence intensity profiles in dividing WT cells revealed the presence of three maxima at septum and poles (Fig. 6B), with the poles exhibiting a greater intensity and

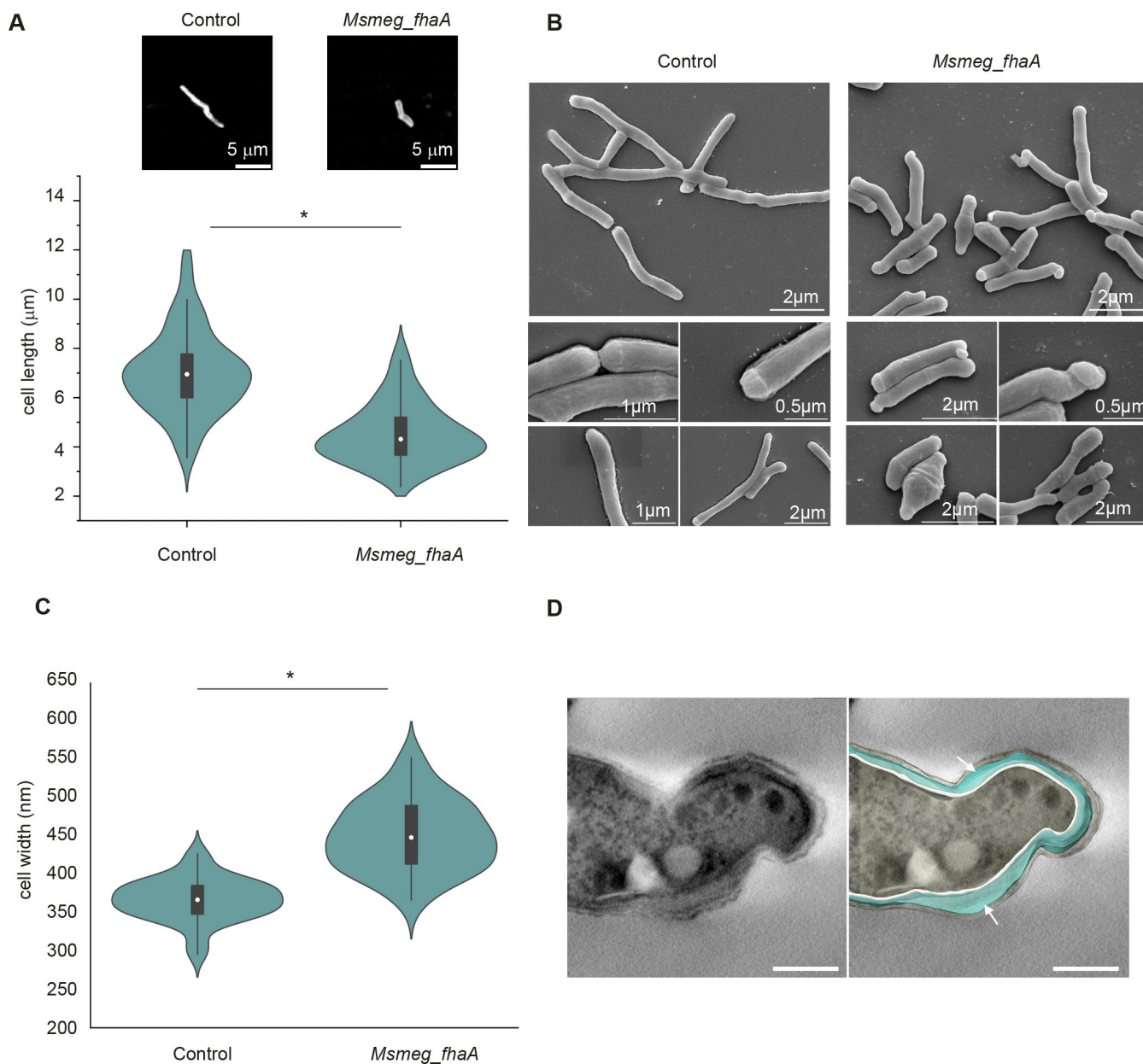


FIG 4 FhaA overexpression alters cell morphology. (A) Violin plot and representative images of sulforhodamine-DHPE stained bacteria illustrating differences in cell length between both strains. Average length is $7.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$ for control strain and $4.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ for *Msmeg_fhaA* strain. * indicates statistically significant difference determined by two samples *t*-test. $P < 0.05$; $n > 100$ cells for each group. White circles represent median; gray boxes represent 25%–75% percentile; values outside whiskers represent outliers. (B) SEM showing morphological differences between strains. Images of *Msmeg_fhaA* strain reveal a heterogeneity in cell shapes, length, and width when compared to control. In addition, most of the *Msmeg_fhaA* cells exhibit one aberrant pole. (C) Violin plot showing that cell width is altered in *Msmeg_fhaA* strain. Measurements of cell width were performed from SEM images. * indicates statistically significant difference determined by one-way ANOVA. $P < 0.05$; $n = 30$ cells for each group. White circles represent median; gray boxes represent 25%–75% percentile; values outside whiskers represent outliers. (D) Left: virtual section of *Msmeg_fhaA* cell tomogram with a “curved” tip. Right: top view of the 3D model, emphasizing the thickening of the cell wall (white arrows), which alters the cell topography near the tip, contributing to the observed curved phenotype. White layer represents the plasma membrane; light blue indicates PG/arabinogalactan; light yellow indicates outer membrane. Scale bar: 200 nm.

asymmetric elongation, as reported previously (6, 40, 41). The faster-growing pole showed HADA signals covering a broader area from the tip, and a smaller slope of fluorescence intensity (Fig. 6A and B). Conversely, the fluorescence signal at the slower-growing pole appears concentrated within a more restricted region, and the slope in the

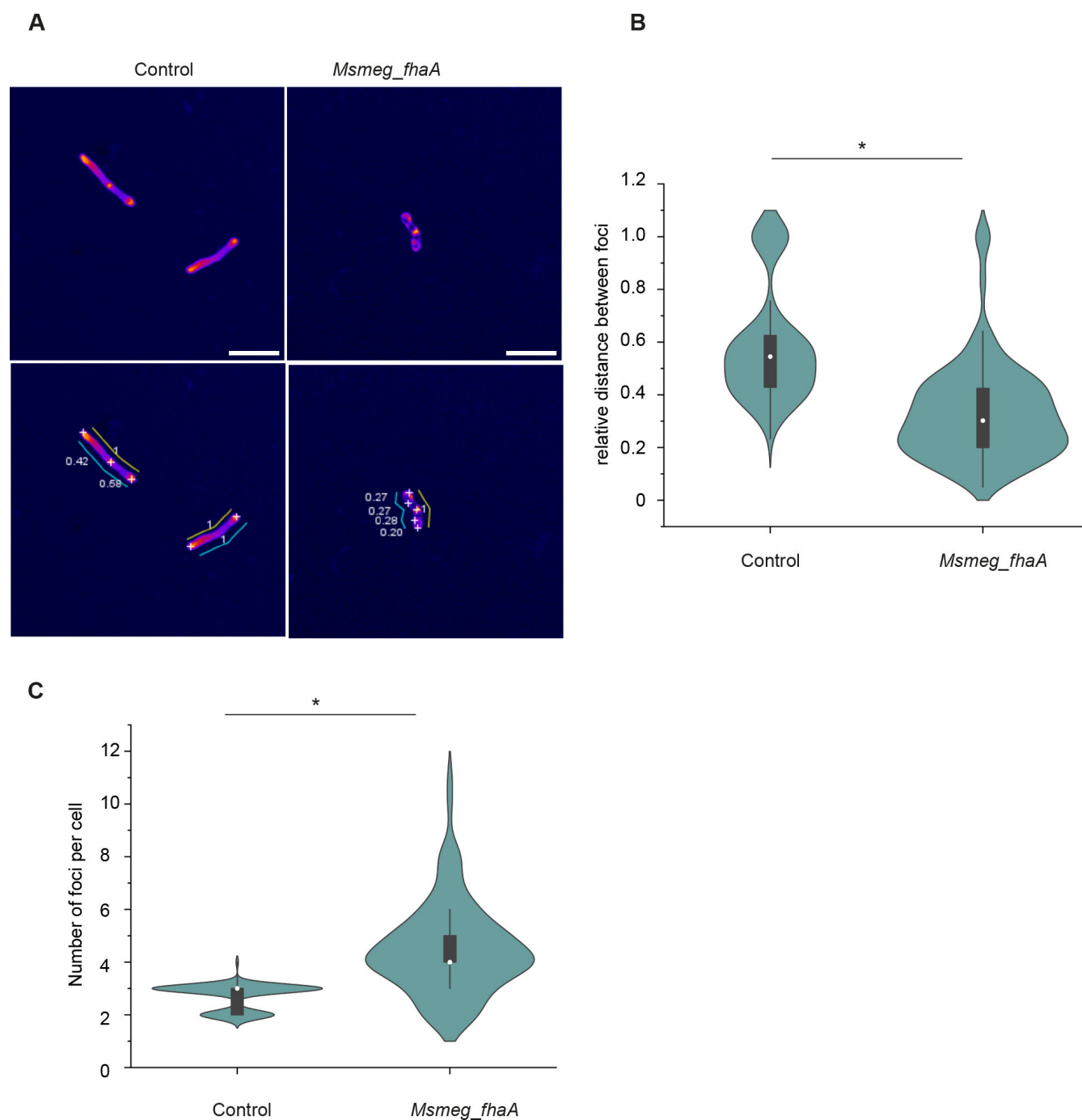


FIG 5 FhaA overexpression leads to mislocalization of the PG synthesis machinery. (A) Representative images of control and *Msmeg_fhaA* strains showing PG synthesis distribution. Fire Look up tables (LUT) was applied to HADA signal to enhance the visibility of regions with higher fluorescence intensity. *Find maxima* tool of Image J was used to detect local intensity maxima for the HADA signal (white crosses), and distances between focuses were measured (cyan sticks). As the cell length is significantly different among both strains, distances between foci were relativized to cell length (yellow sticks). Scale bars: 5 μ m. (B) Violin plot showing the differences in the distribution of distances between foci for control and *Msmeg_fhaA* strain. Distance between foci (poles and septa) for septate control strain oscillates between 50/50 and 70/30 of the total cell length, as expected. * indicates statistically significant difference determined by Kolmogorov-Smirnov, $P < 0.05$; $n > 100$ cells for each group. White circles represent median; gray boxes represent 25%–75% percentile; values outside whiskers represent outliers. (C) Violin plot showing that number of HADA foci per cell is increased in *Msmeg_fhaA* strain. Control cells exhibit two foci (both poles, non-septate bacteria) or three (two poles and septum, septate bacteria). *Msmeg_fhaA* cells exhibit multiple foci, even when non septate. * indicates statistically significant difference determined by Kolmogorov-Smirnov, $P < 0.05$; $n > 100$ cells for each group. White circles represent median; gray boxes represent 25%–75% percentile; values outside whiskers represent outliers.

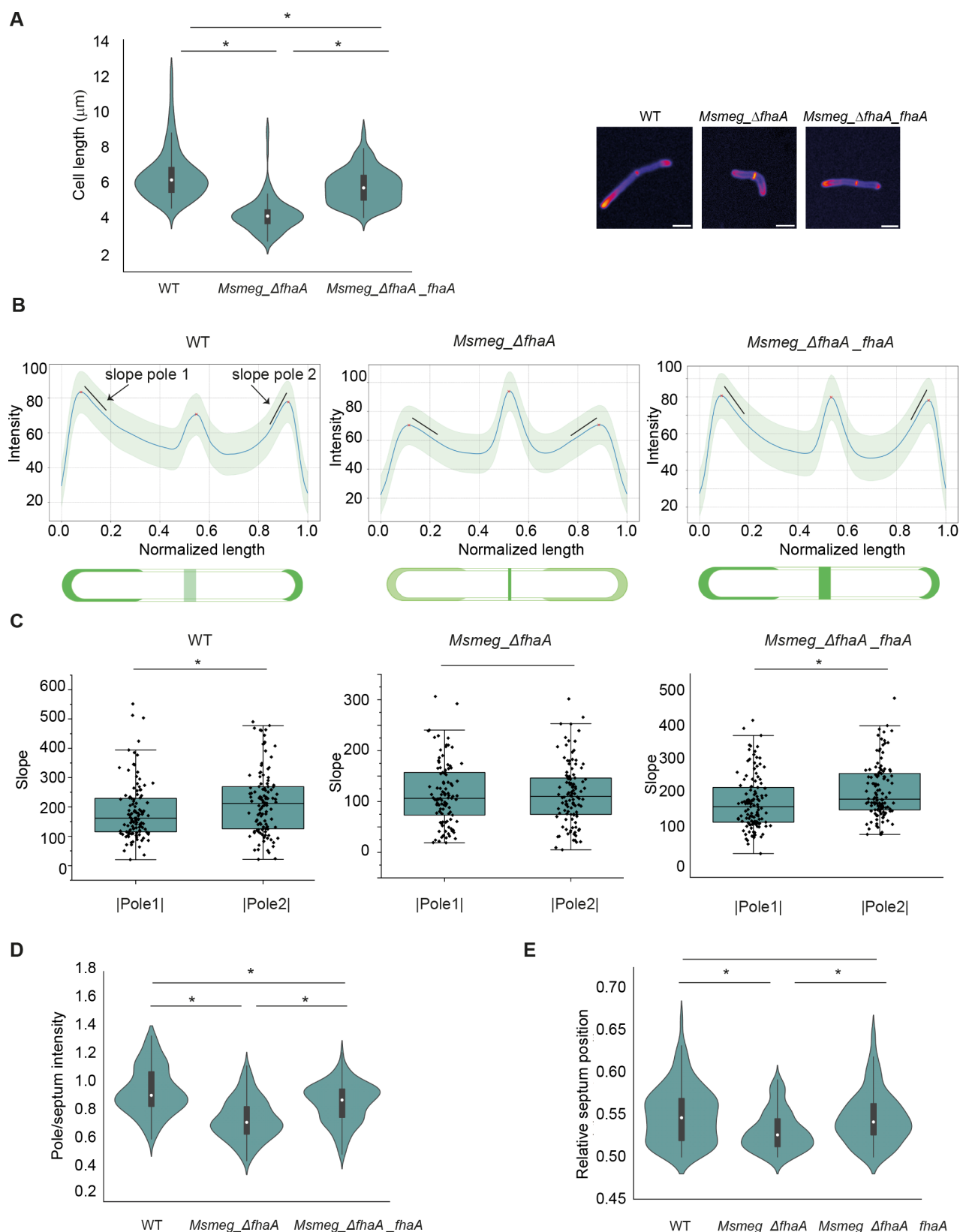


FIG 6 FhaA is necessary for asymmetric polar elongation. (A) Violin plot and representative images showing differences in length between strains. *Msmeg_ΔfhaA* cells are shorter than WT cells, and length is partially recovered after complementation. * indicates statistically significant difference determined by Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$; $n > 100$ cells for each group. White circles represent median; gray boxes represent 25%–75% percentile; values outside whiskers represent (Continued on next page)

Fig 6 (Continued)

outliers. Scale bar 2 μm . (B) Average HADA fluorescence profiles along the cell for >100 septate cells. Blurred zone represents SD. Profiles consist in three peaks corresponding to both poles (named pole 1 and pole 2) and septum. For WT, maximum intensity is located at poles, while for *Msmeg_ΔfhaA* strain, the maximum intensity is located at septum. *Msmeg_ΔfhaA_fhaA* exhibits an intermediate phenotype exhibiting three peaks of comparable intensity. The schemes below represent HADA deposition patterns for each strain. (C) Box plots showing the slope (black lines in fluorescence profiles) at pole 1 and pole 2 for >100 cells allowed to corroborate the asymmetric growth for WT and *Msmeg_ΔfhaA_fhaA*. For *Msmeg_ΔfhaA*, HADA incorporation at both poles was undistinguishable. * indicates statistically significant difference determined by Kolmogorov-Smirnov test, $P < 0.05$; $n > 100$ cells for each group. Box represents 25%–75% percentile and median; values outside whiskers represent outliers. (D) Violin plot illustrating the ratio between intensity at poles (average of both) and intensity at septum. * indicates statistically significant difference determined by one-way ANOVA. $P < 0.05$; $n > 100$ cells for each group. White circles represent median; gray boxes represent 25%–75% percentile; values outside whiskers represent outliers. (E) Violin plot showing the distribution of the relative septum position in WT, *Msmeg_ΔfhaA*, and *Msmeg_ΔfhaA_fhaA* strains. The asymmetrical position of the septum is lost in *Msmeg_ΔfhaA* strain, and it is completely restored after complementation. * indicates statistically significant difference determined by one-way ANOVA. $P < 0.05$; $n > 100$ cells for each group. White circles represent median; gray boxes represent 25%–75% percentile; values outside whiskers represent outliers.

fluorescence intensity profile is higher (Fig. 6A through C), confirming a statistically significant difference in the extent of HADA incorporation for the WT strain (Fig. 6A and C). However, *Msmeg_ΔfhaA* displays a distinct HADA profile characterized by an increased intensity at the septum and significantly lower levels of HADA incorporation at the poles (Fig. 6B). The ratio of pole intensity/septum intensity (with pole intensity as the average of both poles) is significantly different between WT and *Msmeg_ΔfhaA*, and this abnormal distribution of PG synthesis is partially reverted after complementation (Fig. 6D; Fig. S3A). In addition, the polar incorporation of HADA by *Msmeg_ΔfhaA* encompasses a broader area at both poles, when compared with WT. Surprisingly, the deletion of FhaA not only altered the pattern and quantity of HADA incorporation but also resulted in a symmetrical polar incorporation of new cell wall material, as revealed by the average fluorescence profile and the similar slope of fluorescence intensity at each pole in *Msmeg_ΔfhaA* (Fig. 6B and C). Moreover, this slope is smaller than that measured for the fast-growing pole of WT which, together with the observation that *Msmeg_ΔfhaA* cells are shorter, indicates a more diffuse localization of the PG synthesis machinery (Fig. 6B and C; Fig. S3B). It is important to note that the complementation of *Msmeg_ΔfhaA* completely recovers polar cell wall synthesis and asymmetric PG incorporation (Fig. 6B and C; Fig. S3A and B).

As a consequence of the well-documented differences in growth rates between the old and new poles, mycobacteria exhibit an asymmetric position of the septum and considerable variability in cell size among the population. Thus, we assessed septum position and cell length variability in *Msmeg_ΔfhaA*. Consistent with the loss of asymmetric growth, in the *fhaA* deletion strain, the septum is positioned closer to the midcell compared to WT, while the septal position asymmetry is restored after complementation (Fig. 6E). The loss of asymmetric growth in *Msmeg_ΔfhaA* is further confirmed by a more homogeneous population in length, compared to either the WT or the complemented strain (Fig. 6A). Moreover, using an *M. smegmatis* strain overexpressing FhaA fused to the fluorescent protein mScarlet (*Msmeg_mscarlet_fhaA*), we showed that the protein localizes to the poles and septa as anticipated, with a predominant localization at one of the poles. To determine if FhaA preferentially localizes to the old or new pole, we conducted experiments before HADA delocalization occurred but when mScarlet-FhaA the expression was already evident. In this manner, we confidently identified the fast and slow PG incorporating poles. This approach allowed us to demonstrate that FhaA preferentially accumulates at the old, fast-growing pole (Fig. 7).

DISCUSSION

The cellular growth of mycobacteria is distinguished by the incorporation of new cell wall material at the poles in an asymmetric manner, with the old pole inherited from the mother cell growing faster than the new pole formed after the last division. This asymmetry leads to a heterogeneous population in terms of size, growth

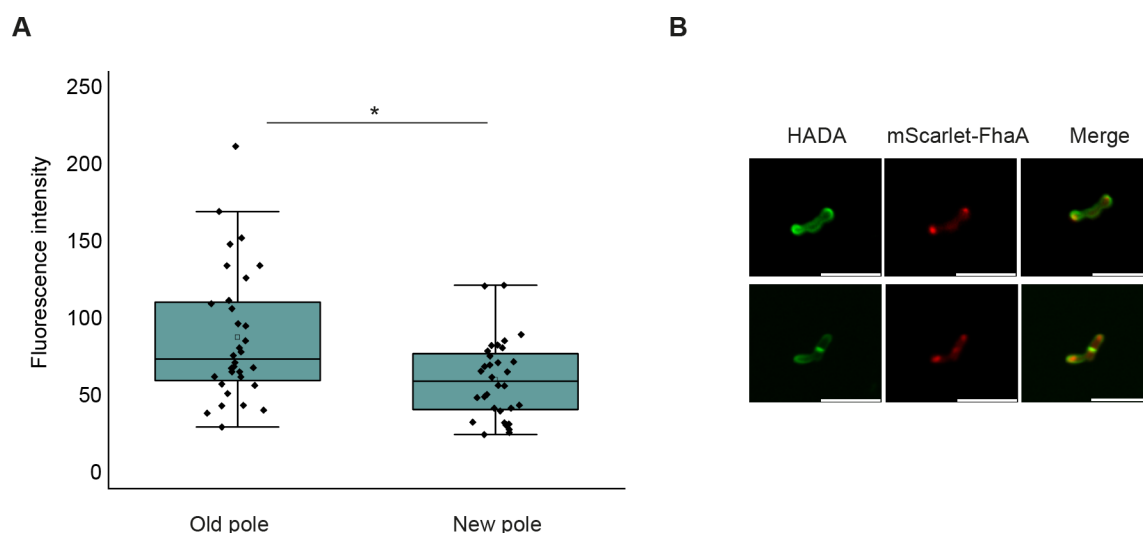


FIG 7 FhaA localizes preferentially at the old pole. (A) Box plot showing differences in the distribution of mScarlet-FhaA fluorescence intensity at both poles. Poles were classified as old and new based on the pattern of HADA fluorescence incorporation. The top asterisk indicates a statistically significant difference determined by two samples *t*-test < 0.05; *n* = 30 cells. White circles represent median; gray boxes represent 25%–75% percentile; values outside whiskers represent outliers. (B) Representative images of an *Msmeg_mscarlet_fhaA* cell showing colocalization of HADA signal and mScarlet-FhaA at poles and septum. mScarlet-FhaA accumulates preferentially at the old pole. Scale bar: 5 μ m.

rate, and antibiotic susceptibility, which is critical for *M. tuberculosis* pathogenesis and the development of antibiotic-resistant strains. Despite its importance, the molecular mechanisms that sustain asymmetric polar growth are still not well understood. Here, we present strong evidence that FhaA is a key elongation factor predominantly localizing to the old pole and crucial for cell envelope integrity and the asymmetry of polar growth.

The FhaA architecture of two modular domains separated by a flexible linker is highly reminiscent of eukaryotic scaffolding proteins (10, 13). This protein organization suggests that FhaA could have a tethering role, bringing together different molecular machineries. Our interactomic analysis shows that FhaA is part of a protein network involved in the biosynthesis of different layers of the complex mycobacterial cell envelope, including proteins associated with PG, LM/LAM, and mycolic acid synthesis and transport. These findings are in line with, and extend, the previous observation that FhaA interacts with the Lipid II flippase Mvin (10). Consistently, the FhaA interactome significantly overlaps with those reported for other well-known components of the *Mycobacteriales* elongasome/divisome, namely MmpL3 and FtsQ (18, 26, 42) (Table S1 and S2), and several of the proteins identified in our work (FhaA itself, MSMEG_0317, MSMEG_5048, atpC, MmpL3, NusA, and WhiA) were shown to interact with mycolates *in vivo* using photoactivatable TMM analogs (43) (Table S1 and S2).

In line with these results, overexpression of FhaA led to alterations in the cell envelope composition and structure. The decreased surface hydrophobicity, along with the impairment in biofilm formation of the *Msmeg_fhaA* strain, points to defective biosynthesis or stability of the mycomembrane and/or the underlying layers of the cell wall. The release of significant amounts of membrane fragments containing mycolic acid esters of trehalose, resulting from impaired mycomembrane stability, has been reported for a *Corynebacterium glutamicum* strain defective in arabinogalactan synthesis (44). Our ET analysis reveals irregular thickening of the cell wall layer between the two membranes in the strain overexpressing FhaA, providing a potential explanation for the observed phenotypes. Finally, our analysis of LAURDAN fluorescence indicates an altered fluidity of the cell envelope lipidic layers. Nevertheless, considering our data as a whole, we are inclined to speculate that the perturbation of the intermediate layers of the cell envelope could be responsible for the change in polarity and water relaxation sensed by LAURDAN. Altogether, our interactome and phenotypic characterization strongly

indicate that FhaA is a part of the molecular machinery responsible for the synthesis of the complex cell envelope of mycobacteria and plays a functional role in this biosynthetic process.

We confirmed that FhaA localizes preferentially to the poles and septum, as previously reported (10). Furthermore, our quantitative analyses revealed an asymmetric distribution between the poles, with a higher concentration of FhaA specifically at the old pole. During growth and division, PG synthesis is orchestrated by two multiprotein complexes: the elongasome responsible for polar elongation and the divisome responsible for cell division and septation. The short cell phenotype of *Msmeg_ΔfhaA* cells, together with a lower HADA incorporation at the poles, clearly indicates that FhaA partakes in polar PG synthesis and normal cell elongation. A previous report showed that FhaA depletion results in an increased accumulation of nascent PG stem peptides at the cell poles and septum and thus propose that FhaA inhibits the late stages of PG biosynthesis via its interaction with Mvin (10). Our results consistently support the role of FhaA in this process, but based on HADA incorporation and morphological characterizations, we hypothesize that FhaA promotes PG synthesis. In addition, the characteristic asymmetric growth pattern of mycobacteria is lost in the absence of FhaA. Collectively, our results establish FhaA as a bona fide functional partner of the elongasome, essential for asymmetric polar elongation. Further supporting this hypothesis, the recruitment to the old pole of the FhaA's top interactor PgfA, which shares the same localization pattern as FhaA, is known to be essential for establishing cellular asymmetry (17). The uneven distribution of key components of the cell elongation machinery, predominantly concentrated at the old pole, has been previously demonstrated and provides a plausible explanation for the differential polar growth rates (5, 45–48). A biphasic growth model has been proposed, in which the new pole undergoes an initial phase of slower growth, during which Wag31 accumulates, followed by a period of rapid growth prior to the next division cycle (41). Another report suggests that the molecular basis for the polar growth of fast and slow poles is fundamentally different (17).

Various pieces of evidence in this work indicate that FhaA affects the precise subcellular localization of new cell wall material insertion. First, overexpression of FhaA leads to the insertion of HADA at multiple focal points along the cell length, as well as at the poles and septa, a phenotype that is not due to increased levels of Wag31 but seems to be directly linked to altered levels of FhaA. In parallel, TEM and ET reveal a heterogeneous cell wall with localized thickening, strongly suggesting that these enlarged areas of the cell wall can be correlated with the extra foci of HADA incorporation and the mislocalization of the elongasome machinery. Consistently, in the strain lacking FhaA, HADA incorporation extends over a broader region at the poles, surpassing even the area observed in the fast-growing pole of the WT strain. As *Msmeg_ΔfhaA* cells are shorter, the extended area of HADA incorporation suggests that the biosynthetic machinery is less positionally constrained at the poles, rather than indicating rapid growth. Taken together, our results indicate that FhaA participates in the regulation of the accurate localization of the elongasome and its biosynthetic activity.

Asymmetric growth is a key trait for mycobacteria adaptation and successful survival strategies, promoting heterogeneous populations with varied responses to environmental challenges and drugs. Thus, uncovering central molecular actors in this essential process deepens our understanding of mycobacterial biology while also identifying promising drug target candidates.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions

The *M. smegmatis* strains overexpressing Strep-tagged FhaA (hereinafter referred to as *Msmeg_fhaA*), mScarlet-FhaA (referred to as *Msmeg_mscarlet_fhaA*), and the control strain were obtained as previously described (49). Briefly, electrocompetent *M. smegmatis*

mc² 155 was transformed with a pLAM12 plasmid containing the coding region of the gene Rv0020c (*fhaA* of *M. tuberculosis*) plus an N-terminal tag (Strep-tag II), or the gene Rv0020c plus the sequence of the red fluorescent protein mScarlet (50) at the N-terminus, both under the control of the *M. smegmatis* acetamidase promoter. As a control, *M. smegmatis* mc² 155 transformed with an empty version of the pLAM12 plasmid was used (control). *M. smegmatis* strains were maintained on Middlebrook 7H10 agar plates (Difco) plus 10% albumine/dextrose/catalase (ADC) (0.2% dextrose, 0.5% bovine serum albumin, and 0.085% NaCl). Liquid cultures were grown in Middlebrook 7H9 (Difco) plus 10% ADC and 0.05% (vol/vol) Tween 80 at 37°C and 220 r.p.m. until reaching an OD₆₀₀ = 0.8. All media were supplemented with kanamycin (50 µg/mL) and ampicillin (100 µg/mL). Expression of Strep-tag II-FhaA was induced by the addition of 0.2% acetamide during the exponential growth phase (OD₆₀₀ = 0.2). For interactomic analyses, five independent cultures of each strain were prepared.

The *M. smegmatis* mc² 6 strain knockout for *fhaA* (*Msmeg_ΔfhaA* in this work), along with the corresponding control strain (*M. smegmatis* mc² 6, WT in this work) and the *fhaA* knockout complemented with MSMEG_0035 (*Msmeg_ΔfhaA_fhaA*), was kindly provided by Dr. Raghunand Tirumalai (15). A table with all the strains of *M. smegmatis* mc² 6 and its derived strain *M. smegmatis* mc² 155 used in this work is presented in Table S5.

Chemical crosslinking in living cells

Chemical crosslinking was performed following the protocol previously used (51, 52). Briefly, after 18 h of induction, cultures were incubated with formaldehyde (final concentration 0.5%) at 37°C and 220 r.p.m. for 20 min, and the excess of formaldehyde was quenched by the addition of 1/10 culture volume of ice-cold glycine (125 mM) in phosphate-buffered saline (PBS) for 20 min.

Affinity purification of protein complexes

Cell cultures were harvested by centrifugation, washed with PBS and re-suspended in 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% glycerol, 1 mM EDTA, pH 7.4, 1× protease inhibitor cocktail (Roche), 1× phosphatase inhibitor (Sigma-Aldrich), and 1.0% Triton X-100 (vol/vol). Lysates were obtained by sonication on ice (25% amplitude, 10 s on, 30 s off; total cycle: 8 min) followed by three cycles of 10 min vortexing in the presence of glass beads (Glass beads, acid-washed ≤ 106 µm, Sigma-Aldrich) with 20 min intervals. After centrifugation, protein concentration of the supernatants was determined by densitometric analysis on SDS-PAGE gels.

FhaA protein complexes were purified using a commercial affinity resin (Strep-Tactin Sepharose, IBA Solutions). Supplier's protocol was optimized, including extra washing steps with 1% Triton X-100 to decrease the number of unspecific interactions recovered. Elution was performed using D-desthiobiotin. As mock, protein extracts from control strain were submitted to the same purification protocol.

Sample preparation for MS analysis

For interactome analysis, purified complexes (five replicates for each strain) were digested in solution at 37°C overnight after Cys reduction (10 mM Dithiothreitol (DTT) and alkylation (55 mM iodoacetamide). Peptide mixtures were desalted using micro-columns (C18 ZipTip, Merck, Millipore), eluted in 0.1% formic acid in ACN, and dried and resuspended in 0.1% formic acid prior to its analysis by nano-LC MS/MS.

Nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis

Analysis of peptide mixtures was performed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Peptides were separated using a nano-HPLC system (EASY-nLC 1,000, Thermo Scientific) equipped with a reverse-phase column (EASY-Spray column, 15 cm × 75 µm ID, PepMap RSLC C18, 2 µm, Thermo Scientific) and a precolumn (Acclaim Pepmap

100 C18 3 μm , 75 $\mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$, Thermo). Elution was performed at a constant flow rate of 250 nL/min with a two-solvent system (A: 0.1% formic acid in water and B: 0.1% formic acid in acetonitrile) and the following gradient: 0%–50% B over 100 min and 50%–100% B over 10 min. Column temperature was set to 45°C. For total proteome analysis, three replicates of each strain were used. Sixty-eight milligram of total protein extracts was loaded on SDS-PAGE (12%). The gel was fixed and stained, and each lane was excised into four gel pieces that were processed for MS analysis as previously described (53). Briefly, Cys reduction and alkylation were performed by incubation with 10 mM DTT at 56°C followed by 45 min incubation with 55 mM iodoacetamide at room temperature. In-gel tryptic digestion (Sequencing Grade Modified trypsin, Promega) was performed overnight at 37°C, and peptide extraction was carried out by consecutive incubations with 0.1% trifluoroacetic acid in 60% acetonitrile. Extracted peptides were vacuum dried and resuspended in 0.1% formic acid.

Nano-HPLC was coupled to a linear ion trap mass spectrometer (LTQ Velos, Thermo Scientific). Nano electrospray ionization source parameters were set as follows: spray voltage 2.3 kV and capillary temperature 260°C. The equipment was operated in a data-dependent acquisition mode: a full MS scan acquired in positive ion mode (m/z between 300 and 1,800 Da) was followed by fragmentation of the 10 most intense ions (normalized collision energy: 35; activation Q: 0.25; activation time: 15 ms) using a dynamic exclusion list.

Bioinformatics analyses

Bioinformatics data analysis was performed using PatternLab for Proteomics V5 (<http://patternlabforproteomics.org>) (54). A target-decoy database was generated using *M. smegmatis* strain ATCC 700084/MC2155 sequences (downloaded from Uniprot on 29 March 2016) plus the sequence of the Strep-tagged FhaA and 127 most common mass spectrometry contaminants. Search parameters were set as follows: tryptic peptides; oxidation of Met as variable modification; carbamidomethylation as fixed Cys modification; 800 ppm of tolerance from the measured precursor m/z . Search Engine Processor was used to filter peptide spectrum matches to a false discovery rate (FDR) < 1% at the protein level. Identification of proteins exclusively detected in FhaA-purified-crosslinked complexes was performed using PatternLab's Approximately Area Proportional Venn Diagram module. Proteins present in at least four out of five *Msmeg_fhaA* replicates, but absent in all control replicates, and statistically validated using the Bayesian model integrated into PatternLab for proteomics Venn Diagram module were considered part of FhaA interactome. In addition, TFold module was used to pinpoint proteins statistically enriched in FhaA complexes according to their spectral counts (BH q value: 0.05, F Stringency: 0.04, and L-stringency: 0.6) (55, 56).

Cell surface hydrophobicity test

Surface hydrophobicity was quantified using the Microbial Adhesion to Hydrocarbon method (57). For that purpose, cells were partitioned using a two-phase system, according to previous reports (58). Exponential growth phase cultures were washed and resuspended in PBS until a final OD600 of 0.7. Samples were mixed with xylene in a 1:1 ratio and incubated 15 min at room temperature to allow partitioning. OD600 of aqueous layer was determined. Hydrophobicity index represents the percentage of initial aqueous layer absorbance retained in the xylene fraction after partitioning. Experiments were performed in triplicate.

Biofilm formation assay

Microtiter dish biofilm formation assay was performed as previously described (53). Briefly, bacterial cultures were loaded in 96-well plates to an initial OD600 of 0.1. Biofilm formation was evaluated by biological triplicates when static cultures of both strains reached identical OD600. Staining was performed with crystal violet. Biofilms were

destained in 30% acetic acid, and OD570 of the retained crystal violet was determined. Experiments were performed in triplicate.

Ethidium bromide permeability test

Permeability test was performed according to (15). Briefly, exponential growth phase cultures were washed with 50 mM KH_2PO_4 pH 7.5 mM MgSO_4 and resuspended at an OD600 of 0.5, pre-energized for 5 min with 0.4% glucose and loaded into 96-well fluorescence plates. Ethidium bromide was added at a final concentration of 20 μM , and measurements were performed at 37°C in a Varioskan plate reader ($\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm). Kolmogorov Smirnov test was used.

Growth curve

To ensure that observed differences in biofilm formation are not due to differences in biomass, a static growth curve was recorded, with cells grown in the same conditions used for biofilm assays. Briefly, 96-well plates were loaded with three independent cultures of each strain in quintuplicate and incubated at room temperature without shaking. OD600 was measured once a day for 10 days.

Fluorescence microscopy and image acquisition and analysis

Exponential growth phase cultures were incubated with 50 μM HADA for 30 min. Samples were loaded into glass slides and allowed to dry at 37°C. Sulforhodamine-DHPE 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was added and allowed to dry. Slides were washed with sterile water and mounted in 10% bovine serum albumin. Images were acquired with a Zeiss LSM 880 confocal laser scanning microscope, equipped with a plan-apochromatic 63 $\times$ /1.4 oil immersion objective. Image acquisition was performed in channel mode with a pixel size of 0.105 μm and a resolution of 256 $\times$ 256. HADA excitation was performed with a 405 nm laser, and emitted light was collected in the range between 415 and 480 nm. Sulforhodamine-DHPE excitation was performed using a 561 nm laser, and light emission was collected between 580 and 620 nm. mScarlet excitation was performed using a 561 nm laser, and emitted light was collected in the range between 570 and 655 nm.

Images were processed and analyzed using Image J (59). All cell length measurements were performed using the Sulforhodamine-DHPE signal; all calculated parameters were obtained from the HADA or mScarlet-FhaA signals.

Control HADA foci were detected using *Find maxima tool* of Image J. Prominence was set to detect 2 (non-septate) or 3 (septate) foci per cell in control strain. The same setting was then applied to *Msmeg_fhaA* strain. For comparative purposes, and to account for differences in cell length, distances between HADA foci were expressed as a fraction of the total length.

For WT, *Msmeg_ΔfhaA*, and *Msmeg_ΔfhaA_fhaA* analysis, we use ImageJ to obtain the intensity profile of HADA drawing a segmented line across the longitudinal axis. The line has a width of 10 pixels, corresponding to approximately 1.06 μm , and a spatial resolution of 0.09 μm . Each profile is computed as the average intensity across the line width, and cell length was normalized. For each strain, we compute a representative profile by averaging all the bacteria profiles in the strain. Also, we obtained the position and intensity of the septum and poles for each bacterium in the strain by using *findpeaks* Scipy function. The septum position was ultimately utilized to select and align both the old and new poles, with the new pole positioned closest to the septum. To determine the pole intensity decay toward the septum, we consider 10 points of the profile curve and fit it to a first-order polynomial. We consider the slope of the fit curve as the value representing the decay.

For the *Msmeg_mscarlet_fhaA* analysis, ImageJ was used to extract the HADA fluorescence profile, following the procedure described above. Profiles of each individual bacterium were length-normalized and aligned according to their type of pole (old or

new). This classification allowed us to determine the fluorescence intensity of mScarlet-FhaA associated with each type of pole.

Statistical comparisons between strains were performed using one-way ANOVA or *t*-test for normally distributed data and Kolmogorov-Smirnov (two samples) or Kruskal-Wallis (three samples) for not normally distributed data.

Sample preparation for transmission electron microscopy

For TEM analysis, samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 2 h and post-fixed for 1 h in 1% OsO₄ with 2.5% potassium ferrocyanide in the same buffer. Samples were then dehydrated in acetone and embedded in Polybed 812 resin (Polysciences). Ultrathin (60 nm) sections were stained with 5% uranyl acetate (40 min) and 2% lead citrate (5 min) before observation using a JEOL 1200 EX transmission electron microscope at 120 kV equipped with a camera Megaview G2 CCD 1 k.

Electron tomography

As previously established for electron tomography (60–62), samples processed for TEM were sectioned (200 nm thick serial sections) in a PowerTome XL ultramicrotome (RMC Boeckeler) and collected onto formvar-coated copper slot grids, then stained with 5% (wt/vol) uranyl acetate and lead citrate. In addition, 10 nm colloidal gold particles (Gold colloid, Sigma-Aldrich) were used as fiducial markers during the tilted series' alignment. Finally, a single-axis tilt series ($\pm 65^\circ$ with 2° increment) was collected from the samples using a Tecnai G2 F20 transmission electron microscope (Thermo Fisher Scientific) operating at 200 kV in TEM mode with a camera AMT CMOS 4K. Tomographic tilt series were processed using IMOD version 4.9.13 (University of Colorado, USA). Projections were aligned by cross-correlation. The final alignment was performed using 10 nm fiducial gold particles followed by weighted back-projection reconstruction. Manual segmentation, surface rendering, and thickness map analysis were performed with the Amira software (Thermo Fisher Scientific).

Scanning electron microscopy

Samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 2 h and then adhered to poly-L-lysine treated coverslips. Next, the coverslips were washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer and post-fixed for 40 min in 1% OsO₄ with 2.5% potassium ferrocyanide. After another washing cycle of three rounds, the samples were dehydrated through a series of increasing concentrations (30%–100%) of ethanol. Finally, the samples were critical-point-dried in liquid CO₂ in a Leica EM CPD300 apparatus and sputtering with a 2-nm-thick platinum coat in a Quorum Q150V Plus apparatus. Samples were observed using a field emission gun Quattro S scanning electron microscope (Thermo Fisher Scientific) operating at 5 kV.

Morphometry

Cell wall thickness measurements were carried out on images obtained from ultra-thin TEM sections, whereas cell width measurements were derived from SEM images using the Fiji/Image J software. Two opposing regions of each cell were assessed for thickness, while three regions (ends and center) of each cell were measured for width. The mean values were calculated based on data obtained from 30 cells in each experimental group. Statistical analyses were conducted using the Kolmogorov Smirnov (TEM) or one-way ANOVA (SEM), with significance set at $P < 0.05$.

LAURDAN staining, image acquisition, and spectral phasor analysis

Exponential growth phase cultures (OD₆₀₀ 0.8) were centrifuged and washed in PBS. Pellets were resuspended in 50 μ L of 0.05 mM LAURDAN-dimethyl sulfoxide in PBS

and incubated at 37°C and 220 rpm for 2 h. Live bacteria were mounted in agarose patches and visualized using a Zeiss LSM 880 spectral confocal laser scanning microscope, equipped with a plan-apochromatic 63×/1.4 oil immersion objective. LAURDAN excitation was performed in lambda mode, using a 405 nm laser for excitation, and emission was collected in the range from 418 to 718 nm, in 30 channels, 10 nm each, and an extra channel for transmitted light. Images were acquired with a 256 × 256 pixel resolution and a scan zoom of 10× (pixel size 0.05 × 0.05 μm; pixel time 0.67 μs). As LAURDAN emission spectrum is sensitive to the lipid composition and dipolar relaxation, it may be used to assess water accessibility in the environment in which the probe is embedded. Spectral phasor analysis of LAURDAN emission was performed using the fluorescence lifetime imaging module of SimFCS 4 software (www.lfd.uci.edu/globals). Briefly, LAURDAN emission spectra from each pixel were Fourier transformed, and G and S (corresponding to the real and imaginary parts of the first harmonic of Fourier transform) were used as x and y coordinates of the phasor plot. Pixels with similar spectral properties cluster together on the plot. While the angular position (Φ) of clustered pixels into the phasor plot provides information about the emission-spectra-center-of-mass, spectral widening relies on radial position (M). Each pixel of the image is associated with a phasor in the phasor plot, and each phasor maps to pixels in the image.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to Magdalena Portela for the excellent technical support and to Dr. Adriana Parodi for her insightful discussions on the results. We also thank Dr. Raghunand Tirumalai for kindly providing us with the *mc*² 6 strains (*Msmeg_ΔfhaA*, *Msmeg_ΔfhaA_fhaA*, and WT). We extend our gratitude to Dr. Martin Graña for his critical review and valuable contributions to improving the manuscript and BSc. Bruno Schuty for fruitful discussions.

This work was funded by grants from the Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay (FCE_1_2014_1_104045; RD), FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund, COF 03/11), and ECOS-Sud France-Uruguay (contract U20B02, RD and AMW), the Agence Nationale de la Recherche (ANR, France), contract ANR-18-CE11-0017 (P.M.A.), and by institutional grants from the Institut Pasteur, the CNRS, and Université Paris Cité. M.G., J.R., B.R., and A.R.T. were supported by a fellowship from ANII (POS_NAC_2012_1_8824, POS_NAC_2015_1_109755, POS_FCE_2015_1_1005186, and POS_FCE_2020_1_1009183). J.R. and A.R.T. were supported by the Comisión Académica de Posgrado, Udelar, Uruguay. M.G., J.R., B.R., and A.R.T. were supported by PEDECIBA-Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas.

AUTHOR AFFILIATIONS

¹Analytical Biochemistry and Proteomics Unit, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable and Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

²Advanced Bioimaging Unit, Udelar and Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

³Precision Medicine Research Centre, Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics and National Center for Structural Biology and Bioimaging, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), UEDD INTA-CONICET, CICVyA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

⁵Programa de Posgrado, Facultad de Química, Udelar, Montevideo, Uruguay

⁶Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

⁷Institut Pasteur, Université Paris Cité, Bacterial Cell Cycle Mechanisms Unit, Paris, France

⁸Institut Pasteur, CNRS UMR 3528, Université Paris Cité, Structural Microbiology Unit, Paris, France

⁹Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Udelar, Montevideo, Uruguay

PRESENT ADDRESS

Magdalena Gil, Proteomic Platform, Mass Spectrometry for Biology Unit, CNRS UAR 2024, Institut Pasteur, Université Paris Cité, Paris, France

AUTHOR ORCID*s*

Jessica Rossello  <http://orcid.org/0000-0002-6475-9273>

Pedro M. Alzari  <http://orcid.org/0000-0002-4233-1903>

Rosario Durán  <http://orcid.org/0000-0002-8575-9651>

FUNDING

Funder	Grant(s)	Author(s)
Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)	FCE_1_2014_1_104045	Jessica Rossello Bernardina Rivera Rosario Durán
Comisión académica de Posgrado, Udelar		Jessica Rossello Azalia Rodríguez Taño
MERCOSUR Structural Convergence Found	COF 03/11	Jessica Rossello Bernardina Rivera Maximiliano Anzibar Fialho Magdalena Gil Azalia Rodríguez Taño Leonel Malacrida Rosario Durán
ECOS-Sud France-Uruguay	U20B02	Anne Marie Wehenkel Rosario Durán
Agence Nationale de la Recherche (ANR)	ANR-18-CE11-0017	Anne Marie Wehenkel Pedro M. Alzari Rosario Durán
Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)	POS_NAC_2012_1_8824	Magdalena Gil
Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)	POS_NAC_2015_1_109755	Jessica Rossello
Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)	POS_FCE_2015_1_1005186	Bernardina Rivera
Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)	POS_FCE_2020__1009183	Azalia Rodríguez Taño
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)		Jessica Rossello Bernardina Rivera Magdalena Gil Azalia Rodríguez Taño Rosario Durán

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Jessica Rossello, Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review and editing | Bernardina Rivera, Investigation, Writing – review and editing | Maximiliano Anzibar Fialho, Data curation, Formal analysis, Writing – review and editing | Ingrid Augusto, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – review and editing | Magdalena Gil, Formal analysis, Investigation, Writing – review and editing | Marina Andrea Forrellad, Investigation, Writing – review and editing | Fabiana Bigi, Investigation, Supervision, Writing – review and editing | Azalia Rodríguez Taño, Investigation, Visualization, Writing – review and editing | Estefanía Urdániz, Investigation, Writing – review and editing | Mariana Piuri, Investigation, Supervision, Writing – review and editing | Kildare Miranda, Supervision, Writing – review and editing | Anne Marie Wehenkel, Conceptualization, Investigation, Supervision, Writing – review and editing | Pedro M. Alzari, Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review and editing | Leonel Malacrida, Formal analysis, Supervision, Writing – review and editing | Rosario Durán, Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review and editing

DATA AVAILABILITY

The mass spectrometry interactomics data have been deposited to the ProteomeX-change Consortium via the PRIDE partner repository with the data set identifier [PXD054354](https://doi.org/10.1093/ptm/0000000000000000) (63).

ADDITIONAL FILES

The following material is available [online](#).

Supplemental Material

Figure S1 (mBio02526-24-s0001.tif). Static growth curve and permeability assay of *Msmeg_fhaA* and control strains.

Figure S2 (mBio02526-24-s0002.tif). TEM images showing differences on cell wall thickness between control and *Msmeg_fhaA* strains.

Figure S3 (mBio02526-24-s0003.tif). Comparison of HADA intensity profiles and HADA incorporation at the different poles for WT, *Msmeg_ΔfhaA*, and *Msmeg_ΔfhaA_fhaA* strains.

Legend (mBio02526-24-s0004.docx). Video S1 legend.

Supplemental Tables (mBio02526-24-s0005.xlsx). Tables S1 to S5.

Video S1 (mBio02526-24-s0006.mp4). 3D reconstruction from virtual sections of a cell tomogram of a *Msmeg_fhaA* cell with an altered cell topography at the cell poles.

REFERENCES

1. Bagcchi S. 2023. WHO's global tuberculosis report 2022. *Lancet Microbe* 4:e20. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00359-7)
2. Kieser KJ, Rubin EJ. 2014. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat Rev Microbiol* 12:550–562. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3299>
3. Brennan PJ. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* (Edinb) 83:91–97. [https://doi.org/10.1016/s1472-9792\(02\)00089-6](https://doi.org/10.1016/s1472-9792(02)00089-6)
4. Jarlier V, Nikaido H. 1994. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 123:11–18. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07194.x>
5. Meniche X, Otten R, Siegrist MS, Baer CE, Murphy KC, Bertozzi CR, Sassetti CM. 2014. Subpolar addition of new cell wall is directed by DivIVA in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E3243–E3251. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402158111>
6. Aldridge BB, Fernandez-Suarez M, Heller D, Ambravaneswaran V, Irimia D, Toner M, Fortune SM. 2012. Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility. *Science* 335:100–104. <https://doi.org/10.1126/science.1216166>
7. Donovan C, Bramkamp M. 2014. Cell division in *Corynebacterineae*. *Front Microbiol* 5:132. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00132>
8. Bellinzoni M, Wehenkel AM, Durán R, Alzari PM. 2019. Novel mechanistic insights into physiological signaling pathways mediated by mycobacterial Ser/Thr protein kinases. *Microbes Infect* 21:222–229. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.06.015>
9. 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:e8590. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008590>
10. Gee CL, Papavinasasundaram KG, Blair SR, Baer CE, Falick AM, King DS, Griffin JE, Venghatakrishnan H, Zukauskas A, Wei J-R, Dhiman RK, Crick

- DC, Rubin EJ, Sasseti CM, Alber T. 2012. A phosphorylated pseudokinase complex controls cell wall synthesis in mycobacteria. *Sci Signal* 5:ra7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002525>
11. Fernandez P, Saint-Joanis B, Barilone N, Jackson M, Gicquel B, Cole ST, Alzari PM. 2006. The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth. *J Bacteriol* 188:7778–7784. <https://doi.org/10.1128/JB.00963-06>
 12. Wehenkel A, Bellinzoni M, Graña M, Duran R, Villarino A, Fernandez P, Andre-Leroux G, England P, Takiff H, Cerveñansky C, Cole ST, Alzari PM. 2008. Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 1784:193–202. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.08.006>
 13. Roumestand C, Leiba J, Galoppe N, Margeat E, Padilla A, Bessin Y, Barthe P, Molle V, Cohen-Gonsaud M. 2011. Structural insight into the *Mycobacterium tuberculosis* Rv0020c protein and its interaction with the PknB kinase. *Structure* 19:1525–1534. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.07.011>
 14. Turapov O, Forti F, Kadhim B, Ghisotti D, Sassine J, Straatman-Iwanowska A, Bottrill AR, Moynihan PJ, Wallis R, Barthe P, Cohen-Gonsaud M, Ajuh P, Vollmer W, Mukamolova GV. 2018. Two faces of CwlM, an essential PknB substrate, in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Rep* 25:57–67. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.004>
 15. Viswanathan G, Yadav S, Joshi SV, Raghunand TR. 2017. Insights into the function of FhaA, a cell division-associated protein in mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 364. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw294>
 16. Loughheed KEA, Bennett MH, Williams HD. 2014. An *in vivo* crosslinking system for identifying mycobacterial protein-protein interactions. *J Microbiol Methods* 105:67–71. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.012>
 17. Gupta KR, Gwin CM, Rahlwes KC, Biegas KJ, Wang C, Park JH, Liu J, Swarts BM, Morita YS, Rego EH. 2022. An essential periplasmic protein coordinates lipid trafficking and is required for asymmetric polar growth in mycobacteria. *Elife* 11:e80395. <https://doi.org/10.7554/eLife.80395>
 18. Fay A, Czudnochowski N, Rock JM, Johnson JR, Krogan NJ, Rosenberg O, Glickman MS. 2019. Two accessory proteins govern MmpL3 mycolic acid transport in mycobacteria. *mBio* 10:e00850-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00850-19>
 19. Plocinski P, Arora N, Sarva K, Blaszczyk E, Qin H, Das N, Plocinska R, Ziolkiewicz M, Dziadek J, Kiran M, Gorla P, Cross TA, Madiraju M, 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* 194:6398–6409. <https://doi.org/10.1128/JB.01005-12>
 20. Mir M, Prisis S, Kang C-M, Lun S, Guo H, Murry JP, Rubin EJ, Husson RN. 2014. Mycobacterial gene *cuvA* is required for optimal nutrient utilization and virulence. *Infect Immun* 82:4104–4117. <https://doi.org/10.1128/IAI.02207-14>
 21. Cashmore TJ, Klatt S, Yamaro-Butte Y, Brammananth R, Rainczuk AK, McConville MJ, Crellin PK, Coppel RL. 2017. Identification of a membrane protein required for lipomannan maturation and lipoarabinomannan synthesis in *Corynebacterineae*. *J Biol Chem* 292:4976–4986. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.772202>
 22. UniProt Consortium. 2023. UniProt: the universal protein knowledge-base in 2023. *Nucleic Acids Res* 51:D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
 23. Hallgren J, Tsirogas KD, Pedersen MD, Almagro Armenteros JJ, Marcatili P, Nielsen H, Krogh A, Winther O. 2022. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
 24. Hayashi JM, Luo C-Y, Mayfield JA, Hsu T, Fukuda T, Walfeld AL, Giffen SR, Leszyk JD, Baer CE, Bennis OT, Madduri A, Shaffer SA, Aldridge BB, Sasseti CM, Sandler SJ, Kinoshita T, Moody DB, Morita YS. 2016. Spatially distinct and metabolically active membrane domain in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:5400–5405. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525165113>
 25. Zhu J, Wolf ID, Dulberger CL, Won HI, Kester JC, Judd JA, Wirth SE, Clark RR, Li Y, Luo Y, Gray TA, Wade JT, Derbyshire KM, Fortune SM, Rubin EJ. 2021. Spatiotemporal localization of proteins in mycobacteria. *Cell Rep* 37:110154. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110154>
 26. Belardinelli JM, Stevens CM, Li W, Tan YZ, Jones V, Mancía F, Zgurskaya HI, Jackson M. 2019. The MmpL3 interactome reveals a complex crosstalk between cell envelope biosynthesis and cell elongation and division in mycobacteria. *Sci Rep* 9:10728. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47159-8>
 27. 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–S27. [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(13\)70006-4](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(13)70006-4)
 28. Gurucha SS, Baulard AR, Kremer L, Loch C, Moody DB, Muhlecker W, Costello CE, Crick DC, Brennan PJ, Besra GS. 2002. Ppm1, a novel polyprenol monophosphomannose synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* 365:441–450. <https://doi.org/10.1042/BJ20020107>
 29. Rana AK, Singh A, Gurucha SS, Cox LR, Bhatt A, Besra GS. 2012. Ppm1-encoded polyprenyl monophosphomannose synthase activity is essential for lipoglycan synthesis and survival in mycobacteria. *PLoS One* 7:e48211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048211>
 30. Lee JH, Jeong H, Kim Y, Lee HS. 2020. *Corynebacterium glutamicum whiA* plays roles in cell division, cell envelope formation, and general cell physiology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 113:629–641. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01370-9>
 31. Pickford H, Alcock E, Singh A, Kelemen G, Bhatt A. 2020. A mycobacterial DivIVA domain-containing protein involved in cell length and septation. *Microbiol (Reading)* 166:817–825. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000952>
 32. Chakraborty P, Kumar A. 2019. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections? *Microb Cell* 6:105–122. <https://doi.org/10.15698/mic2019.02.667>
 33. Mazumder S, Falkinham JO, Dietrich AM, Puri IK. 2010. Role of hydrophobicity in bacterial adherence to carbon nanostructures and biofilm formation. *Biofouling* 26:333–339. <https://doi.org/10.1080/08927010903531491>
 34. Malacrida L, Jameson DM, Gratton E. 2017. A multidimensional phasor approach reveals LAURDAN photophysics in NIH-3T3 cell membranes. *Sci Rep* 7:9215. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08564-z>
 35. Malacrida L, Gratton E. 2018. LAURDAN fluorescence and phasor plots reveal the effects of a H₂O₂ bolus in NIH-3T3 fibroblast membranes dynamics and hydration. *Free Rad Biol Med* 128:144–156. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.004>
 36. Sullivan MR, McGowan K, Liu Q, Akusobi C, Young DC, Mayfield JA, Raman S, Wolf ID, Moody DB, Aldrich CC, Muir A, Rubin EJ. 2023. Biotin-dependent cell envelope remodelling is required for *Mycobacterium abscessus* survival in lung infection. *Nat Microbiol* 8:481–497. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01307-5>
 37. Man D-W, Kanno T, Manzo G, Robertson BD, Lam JKW, Mason AJ. 2018. Rifampin- or capreomycin-induced remodeling of the *Mycobacterium smegmatis* mycolic acid layer is mitigated in synergistic combinations with cationic antimicrobial peptides. *mSphere* 3:e00218-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00218-18>
 38. Kuru E, Tekkam S, Hall E, Brun YV, Van Nieuwenhze MS. 2015. Synthesis of fluorescent D-amino acids and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth in situ. *Nat Protoc* 10:33–52. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.197>
 39. Nguyen L, Scherr N, Gatfield J, Walburger A, Pieters J, Thompson CJ. 2007. Antigen 84, an effector of pleiomorphism in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 189:7896–7910. <https://doi.org/10.1128/JB.00726-07>
 40. Joyce G, Williams KJ, Robb M, Noens E, Tizzano B, Shahrezaei V, Robertson BD. 2012. Cell division site placement and asymmetric growth in mycobacteria. *PLoS ONE* 7:e44582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044582>
 41. Hannebelle MTM, Ven JXY, Toniolo C, Eskandarian HA, Vuaridel-Thurre G, McKinney JD, Fantner GE. 2020. A biphasic growth model for cell pole elongation in mycobacteria. *Nat Commun* 11:452. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14088-z>
 42. Wu KJ, Zhang J, Baranowski C, Leung V, Rego EH, Morita YS, Rubin EJ, Boutte CC. 2018. Characterization of conserved and novel septal factors in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 200:e00649-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00649-17>
 43. Kavunja HW, Biegas KJ, Banahene N, Stewart JA, Piligian BF, Groenevelt JM, Sein CE, Morita YS, Niederweis M, Siegrist MS, Swarts BM. 2020. Photoactivatable glycolipid probes for identifying mycolate-protein

- interactions in live mycobacteria. *J Am Chem Soc* 142:7725–7731. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c01065>
44. Bou Raad R, Méniche X, de Sousa-d'Auria C, Chami M, Salmeron C, Tropis M, Labarre C, Daffé M, Houssin C, Bayan N. 2010. A deficiency in arabinogalactan biosynthesis affects *Corynebacterium glutamicum* mycolate outer membrane stability. *J Bacteriol* 192:2691–2700. <https://doi.org/10.1128/JB.00009-10>
 45. Kang CM, Nyayapathy S, Lee JY, Suh JW, Husson RN. 2008. Wag31, a homologue of the cell division protein DivIVA, regulates growth, morphology and polar cell wall synthesis in mycobacteria. *Microbiol (Reading)* 154:725–735. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/014076-0>
 46. Kieser KJ, Boutte CC, Kester JC, Baer CE, Barczak AK, Meniche X, Chao MC, Rego EH, Sassetti CM, Fortune SM, Rubin EJ. 2015. Phosphorylation of the peptidoglycan synthase PonA1 governs the rate of polar elongation in mycobacteria. *PLoS Pathog* 11:e1005010. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005010>
 47. Jani C, Eoh H, Lee JJ, Hamasha K, Sahana MB, Han J-S, Nyayapathy S, Lee J-Y, Suh J-W, Lee SH, Rehse SJ, Crick DC, Kang C-M. 2010. Regulation of polar peptidoglycan biosynthesis by Wag31 phosphorylation in mycobacteria. *BMC Microbiol* 10:327. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-327>
 48. Chung ES, Johnson WC, Aldridge BB. 2022. Types and functions of heterogeneity in mycobacteria. *Nat Rev Microbiol* 20:529–541. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00721-0>
 49. Gil M, Lima A, Rivera B, Rossello J, Urdániz E, Cascioferro A, Carrión F, Wehenkel A, Bellinzoni M, Batthyány C, Pritsch O, Denicola A, Alvarez MN, Carvalho PC, Lisa M-N, Brosch R, Piuri M, Alzari PM, Durán R. 2019. New substrates and interactors of the mycobacterial Serine/Threonine protein kinase PknG identified by a tailored interactomic approach. *J Proteomics* 192:321–333. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.013>
 50. Bindels DS, Haarbosch L, van Weeren L, Postma M, Wiese KE, Mastop M, Aumonier S, Gotthard G, Royant A, Hink MA, Gadella TWJ Jr. 2017. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nat Methods* 14:53–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4074>
 51. Martinez M, Petit J, Leyva A, Sogues A, Megrian D, Rodriguez A, Gaday Q, Ben Assaya M, Portela MM, Haouz A, Ducret A, Grangeasse C, Alzari PM, Durán R, Wehenkel AM. 2023. Eukaryotic-like gephyrin and cognate membrane receptor coordinate corynebacterial cell division and polar elongation. *Nat Microbiol* 8:1896–1910. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01473-0>
 52. Sogues A, Martinez M, Gaday Q, Ben Assaya M, Graña M, Voegele A, VanNieuwenhze M, England P, Haouz A, Chenal A, Trépout S, Duran R, Wehenkel AM, Alzari PM. 2020. Essential dynamic interdependence of FtsZ and SepF for Z-ring and septum formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun* 11:1641. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15490-8>
 53. Rossello J, Lima A, Gil M, Rodríguez Duarte J, Correa A, Carvalho PC, Kierbel A, Durán R. 2017. The EAL-domain protein FcsR regulates flagella, chemotaxis and type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* by a phosphodiesterase independent mechanism. *Sci Rep* 7:10281. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09926-3>
 54. Santos MDM, Lima DB, Fischer JSG, Clasen MA, Kurt LU, Camillo-Andrade AC, Monteiro LC, de Aquino PF, Neves-Ferreira AGC, Valente RH, Trugilho MRO, Brunoro GVF, Souza TACB, Santos RM, Batista M, Gozzo FC, Durán R, Yates JR 3rd, Barbosa VC, Carvalho PC. 2022. Simple, efficient and thorough shotgun proteomic analysis with PatternLab V. *Nat Protoc* 17:1553–1578. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00690-x>
 55. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, Santos MDM, Fischer JSG, Aquino PF, Moresco JJ, Yates JR 3rd, Barbosa VC. 2016. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc* 11:102–117. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.133>
 56. Carvalho PC, Yates JR III, Barbosa VC. 2012. Improving the TFold test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* 28:1652–1654. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts247>
 57. Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* 9:29–33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x>
 58. Rosenberg M. 2006. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiol Lett* 262:129–134. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x>
 59. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. 2015. The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev* 82:518–529. <https://doi.org/10.1002/mrd.22489>
 60. Girard-Dias W, Alcântara CL, Cunha-e-Silva N, de Souza W, Miranda K. 2012. On the ultrastructural organization of *Trypanosoma cruzi* using cryopreparation methods and electron tomography. *Histochem Cell Biol* 138:821–831. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1002-8>
 61. Wendt C, Rachid R, de Souza W, Miranda K. 2016. Electron tomography characterization of hemoglobin uptake in *Plasmodium chabaudi* reveals a stage-dependent mechanism for food vacuole morphogenesis. *J Struct Biol* 194:171–179. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.02.014>
 62. Girard-Dias W, Augusto I, V. A. Fernandes T, G. Pascutti P, de Souza W, Miranda K. 2023. A spatially resolved elemental nanodomain organization within acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2300942120>
 63. Perez-Riverol Y, Bai J, Bandla C, García-Seisdedos D, Hewapathirana S, Kamatchinathan S, Kundu DJ, Prakash A, Frericks-Zipper A, Eisenacher M, Walzer M, Wang S, Brazma A, Vizcaino JA. 2022. The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res* 50:D543–D552. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1038>