



TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA

Identificación de nuevas proteínas de división celular de Mycobacteriales mediante proteómica de proximidad en células vivas

Autora: MsC. Azalia Rodríguez Taño

Orientador: Dr. Rosario Durán Muñoz

Orientador académico: Dr. Gustavo Salinas

Montevideo, diciembre 2025



ÍNDICE

1. ABREVIACIONES.....	1
2. RESUMEN.....	2
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1 Crecimiento y división celular bacteriana.....	4
3.1.1 FtsZ: estructura, conservación y función en la división celular bacteriana.....	6
3.1.1.1 Dinámica de ensamblaje y polimerización de FtsZ.....	8
3.1.1.2 Factores que afectan el posicionamiento del anillo Z, su polimerización y ensamblaje.....	10
3.1.2 Elongasoma y divisoma: Proteínas que participan en su ensamblaje y activación	14
3.2 Crecimiento y división celular en Mycobacteriales: un modelo alternativo a los organismos modelo	16
3.2.1 Estructura de la envoltura celular de los Mycobacteriales.....	16
3.2.2 Elongación polar asimétrica.....	21
3.2.3 Elongasoma y divisoma en Mycobacteriales: Proteínas que participan en su ensamblaje y activación	23
3.2.4 El rol de la fosforilación de proteínas en la división celular de los Mycobacteriales	27
3.2.5 Corynebacterium glutamicum como modelo	28
3.3. Proteómica basada en espectrometría de masas	28
3.4 Estrategias interactómicas basadas en espectrometría de masas.....	34
3.4.1 Estrategia de marcado por proximidad acoplada a espectrometría de masas.....	42
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	52
5. MATERIALES Y MÉTODOS	53
5.1. Cepas bacterianas	53
5.1.1 Obtención y clonado de las cepas bacterianas.....	54
5.1.1.1 Amplificación de los genes de interés por PCR.....	54
5.1.1.2 Visualización de los fragmentos amplificados por electroforesis	56
5.1.1.3 Unión de los fragmentos de ADN por la reacción de Gibson	56
5.1.1.4 Evaluación de la efectividad de las colonias crecidas por PCR de colonias y electroforesis	56
5.1.1.5 Purificación y secuenciación de colonias positivas.....	57
5.1.1.5 Obtención de células electrocompetentes de Corynebacterium glutamicum.....	57
5.1.1.6 Transformación en células competentes de Corynebacterium glutamicum.....	57
5.2 Cultivos celulares	58
5.3 Morfología celular y número de septos por microscopía confocal	58
5.4 Curvas de crecimiento.....	59
5.5 Obtención de extractos proteicos y cuantificación de proteínas totales	60
5.6 Western blot	61
5.7 Análisis de los proteomas totales por MS	62

5.7.1 Nano-HPLC-MS/MS.....	62
5.7.2 Análisis bioinformático de datos proteómicos	63
5.8 Marcaje con fenol biotina en las células vivas	64
5.9 Digestión de proteínas y purificación de péptidos biotinilados.....	65
5.10 Análisis bioinformático de datos proteómicos obtenidos por la estrategia APEX.....	66
5.11 Localización subcelular de las proteínas seleccionadas por microscopía confocal.....	67
5.12 Morfología celular de la cepa <i>C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ</i> por microscopía confocal.....	67
6. RESULTADOS.....	69
6.1 Desarrollo y validación de una estrategia de marcado por proximidad en las células vivas en <i>C. glutamicum</i>	69
6.1.1 Caracterización de la cepa que sobreexpresa FtsZ	70
6.1.1.1 La morfología celular de la cepa <i>C.glu_apex2-ftsZ</i> depende de los niveles de expresión de FtsZ	70
6.1.1.2 La sobreexpresión de FtsZ no afectó la curva de crecimiento	73
6.1.1.3 APEX2-FtsZ y APEX2 se expresan correctamente	74
6.1.1.4 La sobreexpresión de FtsZ no produce grandes cambios proteómicos	75
6.1.2 Caracterización del marcado de proteínas en las cepas que expresan APEX2	78
6.1.2.1 APEX2 es activa en el contexto bioquímico de <i>C. glutamicum</i>	79
6.1.2.2 La biotinilación por APEX2 ocurre en las células vivas	81
6.1.2.3 El pulso de H ₂ O ₂ no afectó la oxidación de metioninas	82
6.1.2.4 Detección y confirmación de péptidos biotinilados	83
6.2 Identificación de proteínas vecinas de FtsZ en <i>C. glutamicum</i>	88
6.3 Validación de la localización subcelular de las proteínas candidatas: localización en el septo	93
6.4 Exploración del rol de la fosforilación de proteínas en el ensamblaje del divisoma de <i>C. glutamicum</i>	96
6.4.1 APEX2_FtsZ se expresa correctamente en la cepa <i>C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ</i>	96
6.4.2 APEX2 es activa en la cepa <i>C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ</i>	97
6.4.3 Morfología celular de la cepa <i>C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ</i> por microscopía confocal...	98
6.4.4 Análisis proteómico comparativo de los niveles de FtsZ en las cepas <i>C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ</i> y <i>C.glu_apex2-ftsZ</i>	99
6.4.5 Evaluación del entorno proteómico de FtsZ en la cepa <i>C.glu</i> deficiente en PknA ..	100
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	104
8. BIBLIOGRAFÍA.....	114
9. ANEXOS.....	127
10. AGRADECIMIENTOS	195

1. ABREVIACIONES

APEX: (del inglés, ascorbate peroxidase): ascorbato peroxidasa
KO: del inglés, knockout
PG: peptidoglicano
CTT: (del inglés, C-terminal tail): cola C-terminal
CTV (del inglés, C-terminal variable): región C-terminal variable corta
NO: (del inglés, nucleoid occlusion): oclusión nuclear
SEDS: (del inglés, Shape, Elongation, Division, Sporulation): Forma, Elongación, División y Esporulación
SPOR: del inglés, sporulation-related repeat
AG: arabinogalactano
MA: (del inglés, mycolic acids): ácidos micólicos
mAGP: del inglés, mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan
PPIs: (del inglés, protein-protein interactions): interacciones proteína-proteína
PTM: (del inglés, post-translational modifications): modificaciones postraduccionales
DIA: (del inglés, Data-Independent Acquisition): adquisición independiente de los datos
LC-MS/MS: (del inglés): cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
RP: (del inglés, reverse phase): fase reversa
nESI: del inglés, nanoElectrospray Ionization
DDA: (del inglés, Data-Dependent Acquisition): adquisición dependiente de los datos
FDR: (del inglés, False Discovery Rate): tasa de descubrimientos falsos
PSMs: (del inglés, Peptide-Spectrum Matches): correspondencia péptido-espectro
SC: (del inglés, spectral counting): conteo de espectros
XIC: (del inglés, Extracted Ion Chromatogram): cromatograma de iones extraídos
NSAF: del inglés, Normalized Spectral Abundance Factor
AP: (del inglés, affinity purification): purificación por afinidad
XL: (del inglés, cross-linking): entrecruzamiento
CF: (del inglés, co-fractionation): co-fraccionamiento
LiP: (del inglés, limited proteolysis): proteólisis limitada
TPP: (del inglés, thermal proteome profiling): perfil térmico del proteoma
PL: (del inglés proximity labeling): marcado de proximidad
HRP: (del inglés, horseradish peroxidase): peroxidasa de rábano picante
FB: fenol biotina
PCR: (del inglés, polymerase chain reaction): reacción en cadena de la polimerasa
ON: (del inglés, over night): toda la noche
BHI: (del inglés, Brain Heart Infusion)
TA: temperatura ambiente
DO: densidad óptica
MM: medio mínimo
DE: desviación estándar
PPM: patrón de peso molecular
mAb: (del inglés, monoclonal antibody): anticuerpo monoclonal
ACN: acetonitrilo
Ambic: bicarbonato de amonio
DTT: ditiotretol
IAM: iodoacetamida
TFA: (del inglés, trifluoroacetic acid): ácido trifluoroacético
FA: (del inglés, formic acid: ácido fórmico
VD: (del inglés, ven diagrams): diagramas de venn
FASP: del inglés Filter-Aided Sample Preparation
BioID: (del inglés, Proximity-Dependent Biotin Identification): Identificación por biotilación dependiente de proximidad

2. RESUMEN

La división celular bacteriana es un proceso esencial y altamente regulado, en el que participan dos complejos multiproteicos: el elongasoma y el divisoma. Estos complejos constituyen la maquinaria celular responsable de llevar a cabo la elongación y la división celular respectivamente, y han comenzado a ser caracterizados en bacilos modelo como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

Sin embargo, en bacterias del orden *Mycobacteriales*, estos procesos presentan particularidades asociadas a su modo de crecimiento polar asimétrico y a su envoltura celular compleja. De hecho, este grupo de bacterias carece de proteínas homólogas a muchos de los componentes esenciales del elongasoma y del divisoma en los organismos modelo. Con respecto al divisoma, si bien su proteína central, FtsZ (del inglés, Filamenting temperature sensitive mutant Z), está altamente conservada, muchos de los componentes que se reclutan a este complejo en los modelos clásicos, incluidas las proteínas que anclan el anillo Z a la membrana, están ausentes en los genomas de las *Mycobacteriales*. Más aún, a diferencia de otras bacterias, existen sólidas evidencias de que la fosforilación de proteínas juega un rol clave en la regulación de la elongación y la división celular en este grupo de bacterias.

En esta tesis, nos propusimos identificar las proteínas que cumplen las funciones de las piezas faltantes en la maquinaria de división celular de *Mycobacteriales* y evaluar el posible rol de la fosforilación de proteínas en este proceso. Para ello, se exploró el entorno proteómico de FtsZ en células vivas bajo diferentes contextos de fosforilación. Con este objetivo, se desarrolló y validó una estrategia proteómica basada en biotinilación por proximidad mediante el uso de una ascorbato peroxidasa ingenierizada en células vivas, utilizando a *Corynebacterium glutamicum* como organismo modelo. La aplicación de esta estrategia permitió identificar un conjunto de proteínas vecinas de FtsZ en condiciones fisiológicas. Entre ellas, se destacan proteínas de división celular previamente reportadas, lo que valida la estrategia experimental empleada, así como nuevas proteínas de membrana cuya función en el ensamblaje del divisoma es aún desconocida. Para este último grupo, se confirmó su localización en el septo, lo que las posiciona como posibles nuevos integrantes del divisoma en *Mycobacteriales*. Por otro lado, utilizando una cepa knockout para una de las quinasas Ser/Thr involucradas en el control de la división celular, se evidenciaron cambios fenotípicos asociados a defectos en la división celular, así como

cambios en la composición del entorno proteómico de FtsZ, lo que permite comenzar a comprender el rol de la fosforilación de proteínas en la composición y el funcionamiento del divisoma en Mycobacteriales.

En conjunto, este trabajo aporta una estrategia novedosa para estudiar interacciones proteína-proteína en bacterias vivas del orden Mycobacteriales y demuestra su aplicabilidad para caracterizar la arquitectura molecular del divisoma. Los resultados obtenidos amplían el conocimiento actual sobre la composición del divisoma de *C. glutamicum*, y evidencian la importancia de la fosforilación mediada por PknA en la regulación de la división celular.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Crecimiento y división celular bacteriana

La división celular es un proceso fundamental para la supervivencia bacteriana y que ha sido extensamente estudiado, sin embargo, la persistencia de numerosas interrogantes aún por dilucidar, la mantiene como un área de investigación muy activa. La división celular de las bacterias ocurre por fisión binaria ¹ (Figura 1). Aunque este proceso puede aparentar sencillo, una bacteria que se convierte en dos células hijas genéticamente idénticas, en realidad implica una serie de eventos moleculares altamente coordinados y complejos ^{2,3}. Durante este proceso, las bacterias deben primero duplicar su ADN (replicación cromosómica) y segregarlo a polos opuestos del citoplasma (segregación cromosómica), y esto a su vez, debe estar estrictamente sincronizado con el inicio de la división celular, que representa el evento culminante del ciclo ²⁻⁴.

En los bacilos modelo más estudiados como *E. coli* y *B. subtilis*, este ciclo puede dividirse en dos etapas principales: elongación y división ⁵. Durante la elongación, la célula incorpora nuevos componentes de la envoltura celular a través del complejo multiproteico elongasoma. Este complejo se ensambla alrededor de la proteína MreB, el homólogo bacteriano de la actina eucariota. Esta proteína, asociada a la membrana, actúa como andamio para las enzimas de síntesis de peptidoglicano (PG) y se desplaza de manera circunferencial, lo que genera un patrón helicoidal a la síntesis de novo de la pared ⁶⁻⁹. Su papel es crucial para mantener la morfología bacilar, ya que los bacilos que carecen de MreB adoptan una forma cocoide ^{10,11}.

Una vez finalizada la replicación del ADN, se inicia la segunda etapa del ciclo: la división celular, que comienza con la formación del septo en el ecuador celular donde ocurrirá la constricción que dará lugar a las dos células hijas (Figura 1). Este proceso está dirigido por el complejo multiproteico divisoma, el cual se ensambla alrededor de la proteína FtsZ. Esta denominación, así como para muchas de las proteínas claves involucradas en la división celular bacteriana (“Fts”), hace referencia a la forma en que fueron descubiertos los genes *fts* en *E. coli*, en el trabajo de François Jacob y cols en 1968. Este estudio se realizó a partir de mutantes con letalidad condicionada por temperatura, en el que se observó que, al aumentar la temperatura, ciertas cepas mutantes de *E. coli* detenían procesos esenciales como la replicación del ADN o la división celular, a diferencia de la

cepa silvestre, que no mostraba tales defectos ¹². Esto llevó a pensar que los genes *fts* probablemente estaban implicados en la división celular, aunque pasaron décadas hasta que la función de muchos de ellos fue descrita. Uno de estos genes *fts* es precisamente *FtsZ*. *FtsZ* es una GTPasa que forma un anillo en la cara citoplasmática de la membrana interna (anillo Z) y marca el sitio donde ocurrirá la división celular ¹³⁻¹⁵. En las primeras etapas, dicho anillo sirve como plataforma de reclutamiento de proteínas que lo estabilizan y aseguran su anclaje a la membrana (denominadas proteínas de división “temprana”). En fases posteriores se incorporan enzimas responsables de sintetizar el peptidoglicano septal y degradar la pared celular (proteínas de división “tardía”). El proceso concluye cuando la constricción del septo se completa y la célula progenitora se divide en dos descendientes genéticamente idénticas ¹⁶⁻¹⁸ (Figura 1).

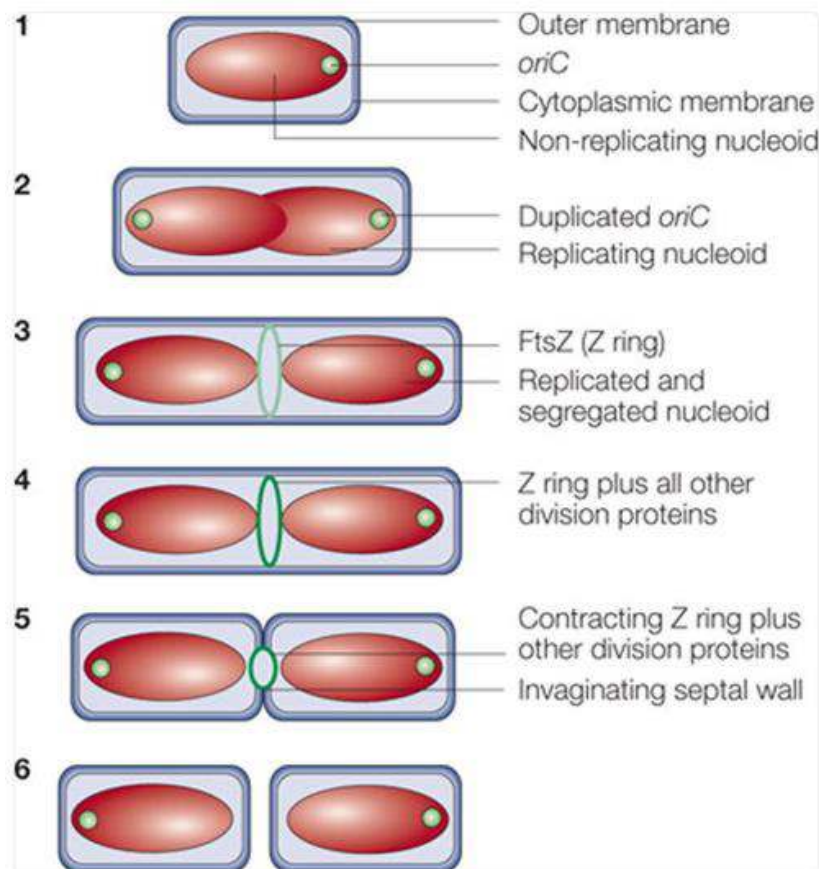


Figura 1: Representación esquemática de las etapas del proceso de fisión binaria en *E. coli*. **1)** Las células recién nacidas cultivadas a bajas tasas de crecimiento contienen un único cromosoma no replicante en una estructura conocida como nucleoide. **2)** Con el inicio de la replicación, los orígenes (*oriC*) se desplazan hacia los polos a medida que la célula comienza a elongarse, hasta que ambos cromosomas quedan segregados. **3)** Hacia el final de este proceso, *FtsZ* se ensambla en el anillo Z sobre la cara interna de la membrana citoplasmática (anillo verde claro) definiendo el sitio de división. **4)** Este anillo recluta numerosas proteínas, muchas de ellas asociadas a la membrana para conformar la maquinaria de división celular (anillo verde oscuro), que dirige la síntesis del septo. **5)** La contracción del anillo Z y la constricción de la membrana externa

completan la separación. **6)** Al final del proceso se originan dos células hijas independientes. Tomada de Margolin. 2005 ¹⁹.

3.1.1 FtsZ: estructura, conservación y función en la división celular bacteriana

FtsZ es una proteína citoplasmática de alrededor de 40 kDa. Su estructura presenta dos dominios globulares, N-terminal y C-terminal, unidos por una hélice central (hélice H7), formando una organización altamente conservada entre especies bacterianas ¹⁵. El dominio N-terminal, con actividad GTPasa y polimerizante, contiene motivos de unión a GTP y está conformado por seis hojas β paralelas, adoptando un pliegue tipo Rossmann característico de proteínas que interactúan con nucleótidos. A este dominio se asocian varios bucles denominados T, cuya organización y modo de unión al nucleótido guardan una estrecha analogía estructural con la tubulina eucariota ²⁰⁻²². Entre estos, el bucle T7, resulta esencial para la hidrólisis del GTP y la interacción entre subunidades de FtsZ ²³. El dominio C-terminal de FtsZ contiene una lámina β y dos hélices con predominancia de residuos ácidos ^{15,24} (Figura 2A). Aunque no es indispensable para la polimerización, este dominio permite la interacción con proteínas accesorias ²⁵. En caso de deleciones en esta región, FtsZ conserva la capacidad de polimerizar, pero no logra organizar anillos funcionales, lo que evidencia su rol en la estabilidad del anillo Z ²⁶ (Figura 2A).

Un análisis más detallado de secuencias de FtsZ y todos sus homólogos, han revelado una organización compuesta por cinco dominios distintos. El subdominio N-terminal, que es no estructurado y poco conservado, sin funciones claramente definidas. Le sigue el núcleo globular, altamente conservado y que contiene el sitio de unión al GTP y el bucle T7, ambos esenciales para la actividad GTPasa y las interacciones longitudinales entre subunidades. A continuación, se encuentra el enlazador C-terminal, una región flexible y poco conservada que conecta el núcleo con la cola C-terminal (CTT, del inglés, C-terminal tail), corta y crucial para las interacciones con proteínas accesorias y para establecer interacciones laterales entre protofilamentos en el anillo Z. Finalmente, la región C-terminal variable (CTV, del inglés, C-terminal variable), altamente diversa, puede favorecer interacciones laterales incluso en ausencia de proteínas moduladoras ²⁷⁻³⁰ (Figura 2B).

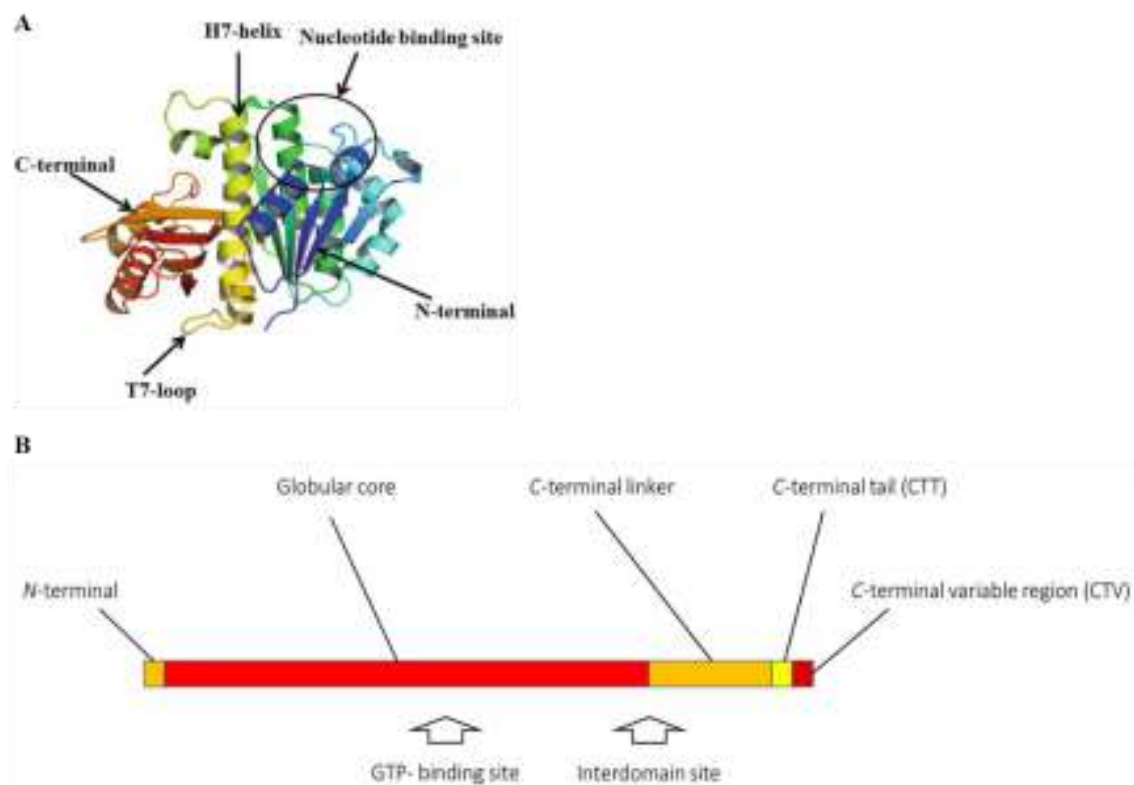


Figura 2: A) Estructura cristalina de FtsZ. FtsZ (PDB ID: 2VXY) fue obtenida del Protein Data Bank y representada en PyMol ³¹. Se observan los dos dominios globulares, N y C-terminal, unidos por la hélice central (H7). El bucle T7 del dominio C-terminal participa en la hidrólisis del GTP y en la interacción entre subunidades. Tomada de Khan y Ray. 2019 ³². **B)** Esquema de los dominios de FtsZ. Se representan los cinco dominios: N-terminal, núcleo globular, enlazador C-terminal, cola C-terminal (CTT) y región C-terminal variable (CTV). Se indican el sitio de unión al GTP y la hendidura interdominio. Tomada de Casiraghi y cols. 2020 ²⁹.

A pesar de compartir baja similitud en secuencia, FtsZ y la tubulina eucariota presentan una homología estructural significativa y se consideran homólogos ²¹ (Figura 3), aunque la unidad funcional de FtsZ es el monómero y la de la tubulina un heterodímero. Esta homología incluye regiones conservadas como el motivo GGGTGS/TG de unión a GTP ^{33,34} y la capacidad de formar polímeros mediante interacciones cabeza-cola ^{21,22,35-37}.

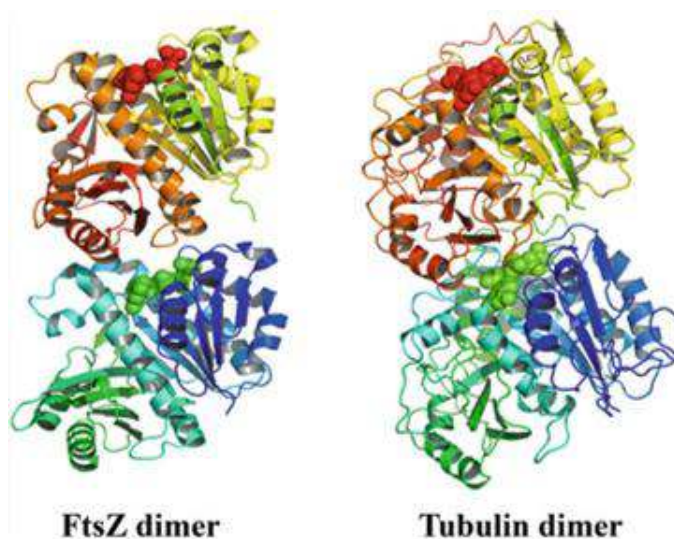


Figura 3: Comparación estructural entre FtsZ y la tubulina eucariota. Las estructuras cristalográficas de FtsZ (izquierda, código 1W5B) y de la tubulina (derecha, código 1TUB) se obtuvieron del Protein Data Bank y se visualizaron con el software PyMol ³¹. Tomada de Khan y Ray. 2019 ³².

FtsZ es una proteína altamente conservada y es la que actúa como componente central del divisoma en la mayoría de los procariotas, además de estar presente en cloroplastos y algunas mitocondrias. Sin embargo, ciertas bacterias con genomas reducidos, han perdido este gen y utilizan mecanismos alternativos para dividirse ^{28,38}. Existen diferentes subfamilias de FtsZ, siendo FtsZ1 la más ampliamente distribuida y la única que es universal y esencial para la formación del anillo Z (conocida como “FtsZ” por defecto). Por otro lado, FtsZ3, presente en algunas halobacterias, muestran una conservación parcial y funciones aún no del todo comprendidas ²⁸.

3.1.1.1 Dinámica de ensamblaje y polimerización de FtsZ

FtsZ actúa como una GTPasa autoactivada cuya capacidad de polimerizar depende de la unión de GTP. La formación de protofilamentos ocurre mediante la asociación lineal de monómeros en orientación cabeza-cola, donde el GTP queda intercalado entre subunidades y es hidrolizado tras el ensamblaje ¹⁵. La hidrólisis de GTP no sólo permite el reciclaje de subunidades, sino que induce un cambio conformacional del polímero desde un estado recto a uno curvo ²¹, lo cual se considera relevante para su función mecánica ³⁹.

De manera global, la dinámica de ensamblaje de FtsZ involucra tres etapas principales: 1) ensamblaje de los monómeros de FtsZ, 2) recambio en estado estacionario y 3) desensamblaje; las cuales incluyen diferentes subetapas (Figura 4).

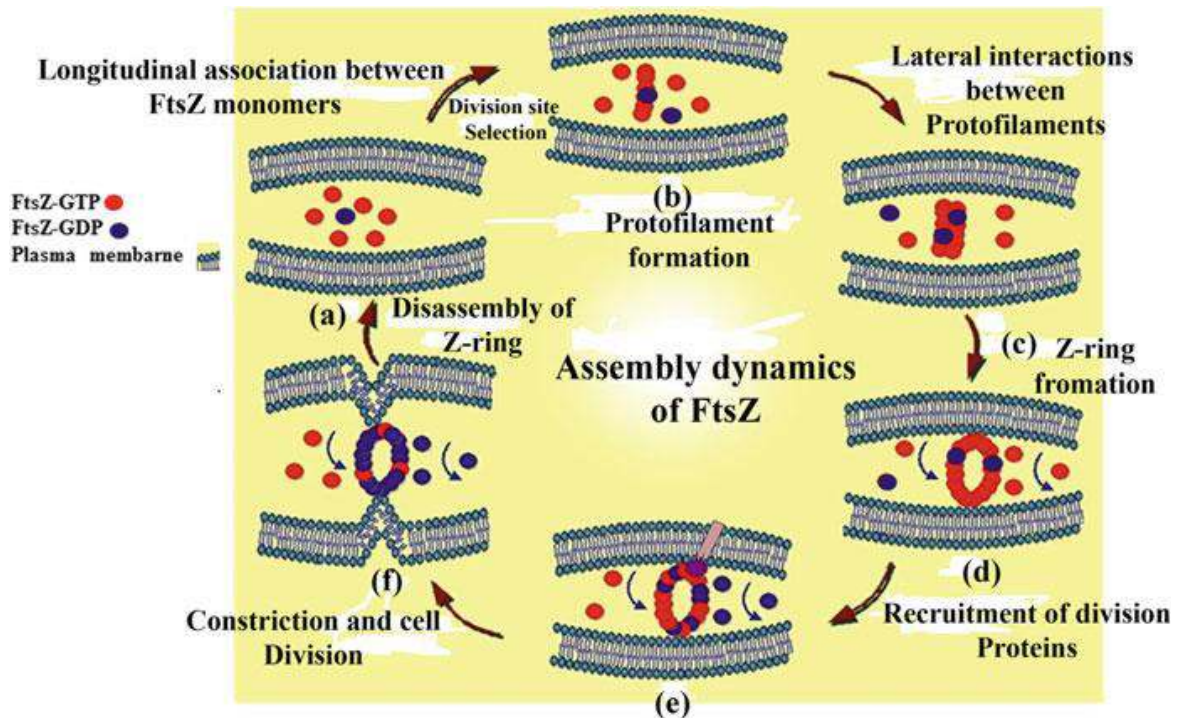


Figura 4: Dinámica del ensamblaje de FtsZ. **1)** Ensamblaje de los monómeros de FtsZ: (a) Unión de monómeros de FtsZ tras la segregación del nucleóide. (b) Ensamblaje de protofilamentos y estabilización mediante proteínas reguladoras. (c) Organización y formación del anillo Z. **2)** Recambio en estado estacionario: (d) Incorporación de diversas proteínas reguladoras en el sitio del anillo Z para completar el septo. (e) Constricción del anillo Z que conduce a la división celular. **3)** Desensamblaje: (f) Desensamblaje del anillo Z en monómeros de FtsZ. Tomada de Khan y Ray. 2019 ³².

En la primera etapa, los monómeros de FtsZ se polimerizan espontáneamente para formar protofilamentos, en presencia de GTP. Estos filamentos se curvan ligeramente y se asocian en haces o láminas, formando la base estructural del anillo Z. En la segunda etapa, la hidrólisis del GTP impulsa el mecanismo de treadmilling (Figura 5), en el que se incorporan nuevas subunidades GTP en un extremo del protofilamento mientras se disocian subunidades con GDP en el extremo opuesto, lo que permite un desplazamiento neto del filamento sin alterar su longitud total ⁴⁰⁻⁴³. Este recambio dinámico es esencial para el posicionamiento, movimiento circunferencial y formación del anillo Z. También facilita la formación del septo y la constricción progresiva del anillo Z durante la división celular. En la tercera etapa, los protofilamentos se desestabilizan y se desensamblan, ya sea por agotamiento de GTP o por acumulación de subunidades con GDP, lo que lleva a la desorganización del anillo Z. Este proceso es reversible y está modulado por factores celulares y condiciones fisicoquímicas, como la presencia de cationes divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+}), cuyos efectos sobre la polimerización y estabilidad de FtsZ se han estudiado *in vitro* ^{24,37,44-46}.

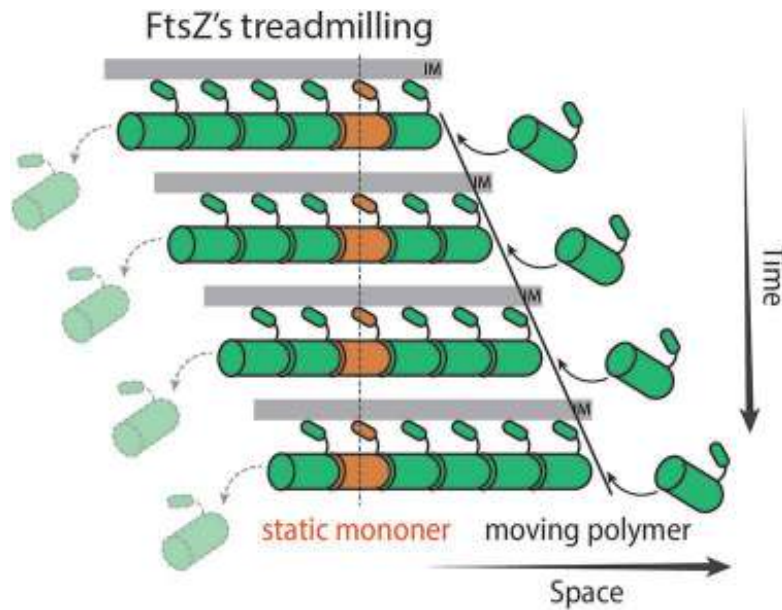


Figura 5: Treadmilling de FtsZ. Los monómeros se añaden en el extremo derecho del filamento y se liberan en el extremo izquierdo, generando un desplazamiento hacia la derecha mientras las subunidades (naranja) permanecen fijas. Tomada de Yang y Liu. 2022 ⁴⁷.

3.1.1.2 Factores que afectan el posicionamiento del anillo Z, su polimerización y ensamblaje

La formación y posicionamiento del anillo Z está estrictamente controlada y requiere de una red de reguladores que actúan de manera positiva o negativa sobre la polimerización y ensamblaje de FtsZ. Estos reguladores aseguran que el anillo se forme en el lugar correcto y en el momento adecuado, integrando señales espaciales y temporales del ciclo celular.

Los reguladores positivos promueven la estabilización del anillo Z en el medio de la célula, facilitando además su anclaje a la membrana interna y la correcta formación del septo. Entre las principales proteínas se encuentran FtsA, ZipA, ZapA-D, SepF y WhmD ⁴⁸ (Figura 6).

FtsA y ZipA

FtsA y ZipA representan los anclajes primarios de FtsZ en la membrana interna de bacterias modelo y han sido los más caracterizados. En *E. coli*, tanto FtsA como ZipA se unen al CTT de FtsZ. Aunque cada una resulta esencial para que la célula complete su división, la presencia de cualquiera de ellas es suficiente para que se forme el anillo Z ^{2,49}.

FtsA es un homólogo de la actina, altamente conservado, que cumple un rol central en la división bacteriana al anclar FtsZ a la membrana citoplasmática interna ⁵⁰ e interactuar con proteínas del divisoma que actúan en etapas posteriores. Se localiza tempranamente

en el sitio de división y participa en la activación de la constricción septal ^{2,42}. Además de su función de anclaje a la membrana, regula la dinámica de FtsZ: en condiciones in vitro, puede estimular la formación de polímeros cortos y dinámicos, promover interacciones laterales entre filamentos y facilitar el treadmilling ⁵¹. Sin embargo, una sobreproducción de FtsA desestabiliza el anillo Z, generando defectos en la división ⁵². FtsA posee actividad ATPasa ⁵³, y su capacidad de ensamblarse en polímeros o permanecer como monómeros parece influir en la regulación de FtsZ: los monómeros favorecen la división, mientras que los polímeros tienden a desestabilizar el anillo ⁵⁴. Aunque se han observado estructuras compatibles con polímeros de FtsA en algunos estudios de criotomografía, su relevancia in vivo sigue siendo un interrogante ^{39,55,56}. La proporción relativa entre FtsA y FtsZ también resulta crítica, variando entre especies (*E. coli* y *B. subtilis*) ^{33,57}, y FtsA puede actuar en conjunto con complejos como FtsQLB para promover el ensamblaje completo del divisoma.

ZipA, es una proteína característica de proteobacterias y contribuye al anclaje de FtsZ a la membrana en *E. coli*. Consta de un segmento transmembrana N-terminal, un dominio central flexible y una región citosólica C-terminal que interactúa con la región CTC de FtsZ. Estudios in vitro han mostrado que ZipA puede inducir la agrupación de filamentos de FtsZ y reclutarlos a membranas artificiales, donde forman haces y estructuras radiales ^{49,51,58}. Si bien estas estructuras son dinámicas, no siempre se ha observado treadmilling en ellas ^{59,60}. ZipA presenta afinidad similar por monómeros y polímeros de FtsZ, lo que sugiere que su función principal es incrementar la concentración local de FtsZ en la membrana para favorecer la polimerización ^{51,61}.

En ausencia de FtsA o ZipA de manera individual, el anillo Z aún puede formarse, pero no cuando ambas están ausentes en la célula ³.

ZapA-D, SepF y WhmD

ZapA es una proteína de división temprana conservada en *E. coli* y *B. subtilis* que interactúa directamente con FtsZ, favorece la agrupación de sus protofilamentos y cuya función resulta redundante ya que su delección no produce fenotipo ⁶². ZapB es una proteína de división no esencial que favorece el ensamblaje de FtsZ de manera dependiente de su interacción con el anillo Z ⁶³. ZapC actúa como estabilizador esencial del divisoma al unirse directamente a FtsZ y modular su ensamblaje ^{64,65}. ZapD

incrementa las interacciones laterales entre protofilamentos potenciando la formación del anillo Z ^{66,67}, SepF funciona en *B. subtilis* como un anclaje alternativo y regulador del anillo Z que complementa la función de FtsA y favorece la formación de septos en etapas tempranas y tardías ⁶⁸⁻⁷⁰. Un estudio reciente identificó a FtsZ y SepF como las proteínas mínimas requeridas para establecer un anillo Z activo en *B. subtilis* ⁷¹.

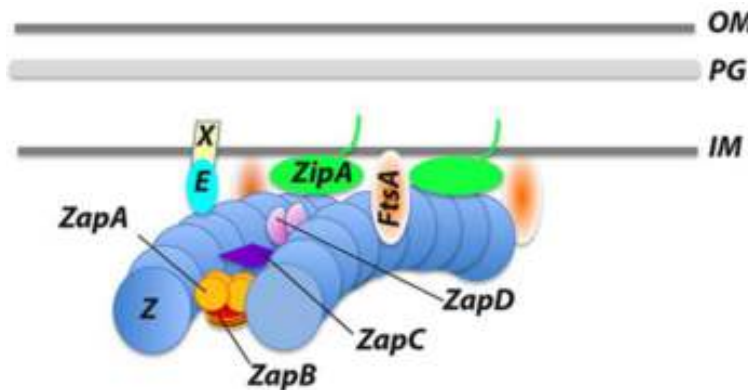


Figura 6: Representación esquemática de las proteínas que se localizan en el sitio de división en *E. coli* y que promueven el ensamblaje y la estabilidad del anillo Z durante el primer paso de la citocinesis bacteriana. IM, membrana interna; PG, peptidoglicano; OM, membrana externa. Modificada de Huang y cols. 2013 ⁷².

Los reguladores negativos ayudan al desmontaje del anillo Z durante el proceso de constricción y evitan la polimerización en posiciones inapropiadas, como los polos celulares o regiones donde el cromosoma aún no ha sido segregado.

Entre los reguladores negativos más conservados destacan el sistema Min y de oclusión nuclear (NO, del inglés, nucleoid occlusion), ambos fundamentales en organismos modelo como *E. coli* y *B. subtilis*. El sistema Min, formado por MinC, MinD y MinE (Figura 7A), establece un gradiente de inhibición más alto en los polos y más bajo en la zona central de la célula, impidiendo la polimerización de FtsZ en los extremos y asegurando que el anillo Z se forme en la región media ⁷³⁻⁷⁶. MinC actúa directamente sobre FtsZ inhibiendo su polimerización, MinD potencia esta inhibición ⁷⁷, y MinE promueve la oscilación del complejo MinCD entre polos, evitando bloqueos permanentes y garantizando la correcta localización del anillo ⁷⁸. Por su parte, el sistema NO previene la formación del anillo Z en lugares donde se encuentra el ADN cromosómico ⁷⁹ (Figura 7B). Este proceso lo lleva a cabo la proteína SlmA en *E. coli* ⁸⁰ y la proteína Noc en *B. subtilis* ⁸¹, las cuales interaccionan con el ADN cromosómico y previenen la formación del anillo.

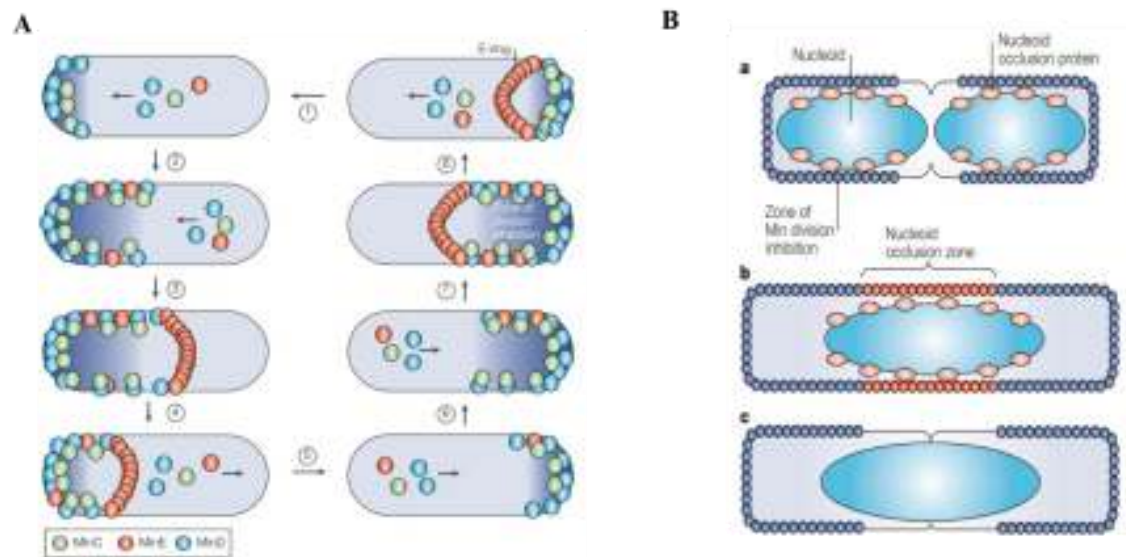


Figura 7: **A)** Ciclo de oscilación del sistema MinCDE. El complejo MinCDE comienza a concentrarse en uno de los polos y se expande hacia la región media de la célula (1-2, 5-6). En el borde anterior de la zona se organiza el anillo de MinE, que desplaza el complejo hacia atrás (3, 7). La zona polar se desensambla, liberando MinC, MinD y MinE, que regresan al polo y reinician el ciclo (4-5, 8-1). Como resultado de esta oscilación, se mantiene una zona de inhibición de la polimerización de FtsZ en los polos durante gran parte del ciclo celular. **B)** Sistema NO. a) En condiciones normales, las proteínas Noc o SlmA (óvalos rojos claros) actúan junto al sistema Min (círculos azules), impidiendo que el anillo de FtsZ se forme sobre los nucleoides segregados. b) Cuando la replicación o segregación cromosómica se interrumpe y el nucleoide permanece en la región central, las proteínas NO bloquean la septación en esa posición (círculos rojos). c) En ausencia de las proteínas NO, este control se pierde y el sistema Min por sí solo no alcanza a evitar que FtsZ forme anillos sobre el nucleoide central. Tomadas de Rothfield y cols. 2005 ⁸².

La combinación de la oclusión nuclear con el sistema MinCDE hace que, una vez duplicado el ADN de la bacteria, la formación del anillo Z se restrinja a la zona del ecuador celular. En casos donde se inhabilite uno u otro sistema se puede dar la formación de anillos Z adicionales ⁸³.

Otros reguladores negativos cumplen funciones más específicas: EzrA es una proteína transmembrana en *B. subtilis* que inhibe la polimerización de FtsZ y evita su ensamblaje aberrante en los polos ^{84,85}. SulA, se activa durante el mecanismo de reparación del daño del ADN iniciado por la respuesta SOS en *E. coli* y bloquea la polimerización de FtsZ uniéndose a su bucle T7 ^{86,87}. UgtP, en *B. subtilis*, coordina el tamaño celular con la disponibilidad de nutrientes al modular la dinámica de FtsZ ⁸⁸. MciZ, un péptido expresado durante la esporulación, inhibe la polimerización de FtsZ de manera dependiente de GTP ^{89,90}. ClpX, como parte de la proteasa ClpXP, reconoce y degrada polímeros de FtsZ, evitando su acumulación excesiva y contribuyendo al control de la división ^{27,91}.

En resumen, la correcta localización del anillo Z y su anclaje en la membrana, son procesos altamente controlados que requieren de un gran número de proteínas que pueden actuar como reguladores positivos o negativos de este proceso.

3.1.2 Elongasoma y divisoma: Proteínas que participan en su ensamblaje y activación

Como ya se mencionó con anterioridad, MreB y FtsZ son las proteínas principales a través de las cuales se ensamblan los complejos elongasoma y divisoma, respectivamente, en los organismos modelo *E. coli* y *B. subtilis*. Sin embargo, existen otras proteínas estructurales y accesorias que conforman la maquinaria funcional de ambos complejos (más de 20 proteínas conocidas en *E. coli*, que incluyen a las proteínas de división “temprana” y de división “tardía”).

En estos bacilos, el elongasoma es el complejo multiproteico responsable de la síntesis lateral del PG y, en consecuencia, de mantener la morfología alargada de la célula. La polimerización de MreB constituye el paso inicial de este ensamblaje, ya que actúa como andamiaje para el reclutamiento de otras proteínas del complejo. El núcleo catalítico del elongasoma está compuesto por RodA, una glucosiltransferasa de la familia de las SEDS (del inglés, Shape, Elongation, Division, Sporulation), y la transpeptidasa PBP2 (PBP2A o PBPH en *B. subtilis*). RodA polimeriza las cadenas de glicano, mientras que PBP2 las une a la pared celular preexistente ^{92,93}. Además, el elongasoma incluye a las proteínas conservadas de la membrana interna, MreC, MreD y RodZ ^{94,95}, y a las enzimas de síntesis de lípido II MraY y MurG, que interactúan con MreB ⁹⁶. El filamento de MreB se ancla a la membrana interna mediante su interacción con el dominio citoplasmático de RodZ ⁹⁷ (Figura 8).

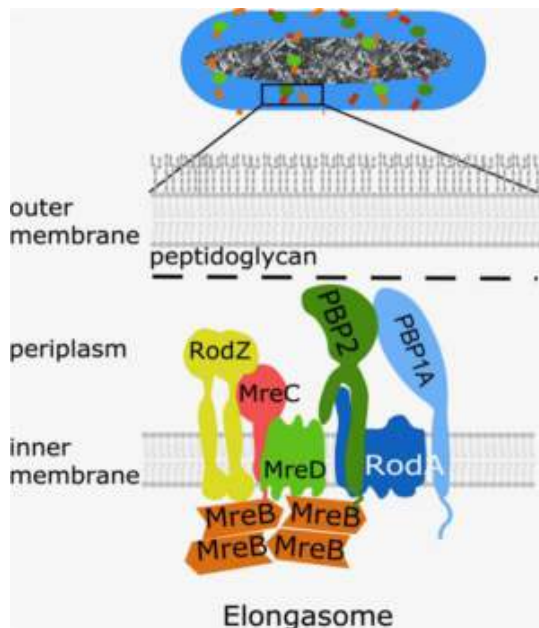


Figura 8: Componentes principales del elongasoma y sus interacciones en *E. coli*. Se esquematiza la envoltura celular de *E. coli* y del complejo de elongación. La proteína MreB se dispone en agrupaciones debajo de la membrana citoplasmática, donde actúa como plataforma de reclutamiento para otras proteínas del elongasoma. La capa de PG se ubica entre la membrana interna y la membrana externa. Modificada de Liu y cols. 2020 ⁸².

En el divisoma, además de las proteínas que participan en el posicionamiento y anclaje del anillo Z a la membrana, se encuentran las siguientes proteínas: FtsQ, FtsL, FtsB, FtsN, FtsW, FtsI y FtsK ⁹⁸ (Figura 9). Un complejo clave es FtsQLB en *E. coli* (con sus homólogos DivIB, DivIC y FtsL en *B. subtilis*), que forma un subcomplejo de membrana involucrado en transmitir señales de activación hacia las enzimas de síntesis del septo ^{99–101}. Estas proteínas no sólo sirven como elementos estructurales, sino que actúan como plataforma reguladora que conecta el anillo de FtsZ con la activación de la maquinaria biosintética. Otro componente central es FtsN (en *E. coli*), cuya llegada tardía al divisoma marca el inicio de la constricción: mediante su dominio SPOR (del inglés, sporulation-related repeat), reconoce zonas del PG modificadas por amidasas y, de esta manera, ayuda a dirigir el complejo de síntesis de PG (FtsWI) hacia el sitio correcto ^{102–104}.

El complejo catalítico que finalmente ejecuta la síntesis del nuevo septo está formado por FtsW, una glucosiltransferasa, y FtsI/PBP3, una transpeptidasa. Ambas actúan en conjunto para incorporar y entrecruzar nuevas cadenas de PG durante la formación del septo ¹⁰⁵. Estas enzimas, aunque localizadas en el divisoma desde etapas relativamente tempranas, permanecen inactivas hasta recibir señales de activación que dependen de FtsQLB y FtsN, garantizando que la constricción no ocurra prematuramente ^{99,100}. Finalmente, FtsK desempeña un rol doble: además de formar parte del divisoma, coordina la segregación cromosómica con la constricción septal, evitando que el ADN quede atrapado en el septo ¹⁰⁶. De esta manera, estas proteínas accesorias aseguran que la división celular en *E. coli* y *B. subtilis* se ejecute con precisión temporal y espacial.

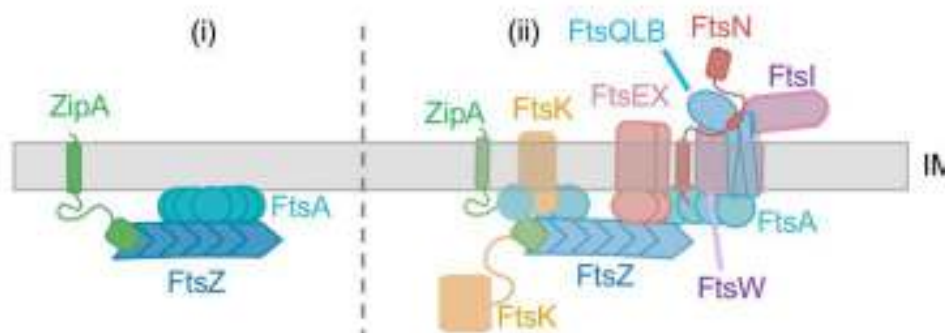


Figura 9: Proteínas esenciales del divisoma. Se muestra el complejo FtsQLBWI en asociación con FtsN, junto con otros componentes del divisoma localizados en la membrana. El ensamblaje ocurre de manera secuencial: primero se organiza el protoanillo (I) y posteriormente se incorporan las demás proteínas del divisoma (II). Modificada de Perkins y cols. 2024 ¹⁰⁷.

Si bien todavía quedan muchas preguntas abiertas en cuanto a la composición y función del divisoma y elongasoma en bacilos modelo como *E. coli* y *B. subtilis*, en los últimos años, se han identificado muchos de sus componentes estructurales y se ha comenzado a dilucidar su ensamblaje y dinámica.

3.2 Crecimiento y división celular en *Mycobacteriales*: un modelo alternativo a los organismos modelo

Los organismos modelo como *E. coli* y *B. subtilis* han sido fundamentales para establecer los principios básicos del ciclo celular, la replicación del ADN y la citocinesis. Sin embargo, este paradigma no puede extrapolarse completamente a otros grupos bacterianos con fisiologías distintas ^{108,109}. Entre ellos, los *Mycobacteriales*, que incluyen especies de relevancia clínica como *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Mycobacterium leprae*, presentan una pared celular extraordinariamente compleja ^{109–111}, un patrón de crecimiento polar asimétrico ^{109,112}, y una composición del divisoma y elongasoma que se aparta significativamente de los modelos clásicos ^{108,113}.

3.2.1 Estructura de la envoltura celular de los *Mycobacteriales*

La envoltura celular de los *Mycobacteriales* es única entre las bacterias. Aunque este grupo está genéticamente relacionado con bacterias Gram positivas, su estructura didérmica, con una membrana externa lipídica densa y rica en ácidos micólicos es comparable a las Gram negativas ¹¹⁴. Esta envoltura celular está compuesta por la membrana interna y por la pared celular, la cual está constituida por tres capas principales:

peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos (MA, del inglés, mycolic acids), formando el denominado complejo mAGP (del inglés, mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan), que confiere a la célula una notable rigidez y baja permeabilidad ^{114,115} (Figura 10).

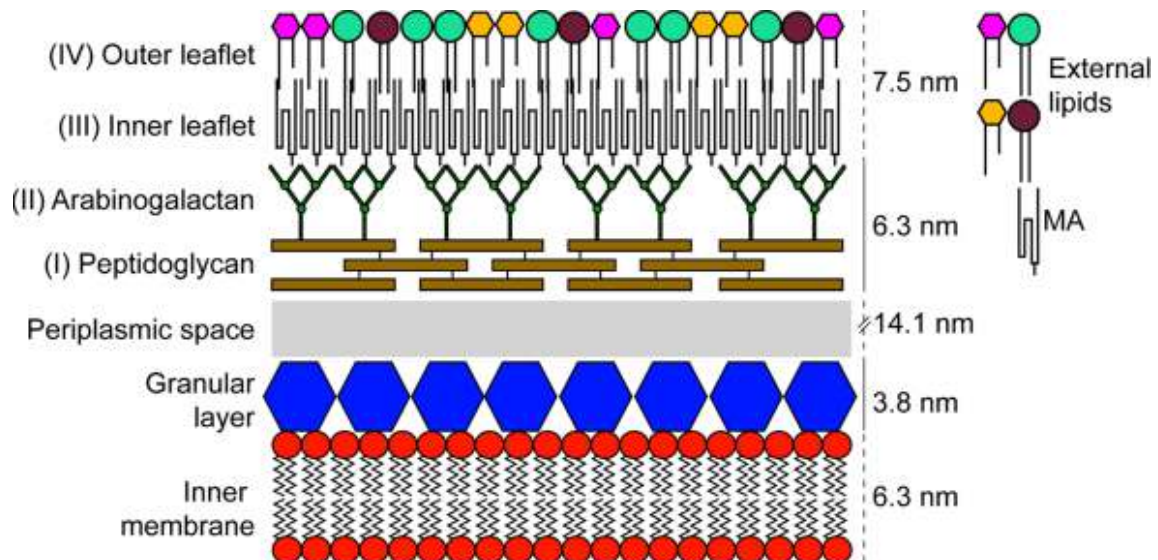


Figura 10: Representación esquemática de la envoltura celular en Mycobacteriales. Se distinguen las principales capas: (I) PG, (II) AG y (III–IV) membrana de MA (micomembrana), conformada por una hoja interna (inner leaflet) y una hoja externa (outer leaflet). Por debajo del complejo mAGP se ubica el espacio periplásmico y, más internamente, la membrana interna (inner membrane). Se indican además las dimensiones promedio de cada capa, obtenidas a partir de estudios de criomicroscopía electrónica de secciones vítreas (CEMOVIS) en *Mycobacterium bovis* BCG ¹¹⁶. Tomada de Vincent y cols. 2018 ¹¹⁷.

Membrana interna

La membrana interna está compuesta por una bicapa fosfolipídica con proteínas embebidas que participan activamente en el transporte de aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos, así como en procesos de señalización y secreción ¹¹⁴. Entre sus componentes lipídicos se encuentran la cardiolipina, el fosfatidil-inositol, la fosfatidiletanolamina, además de distintas formas altamente glicosiladas y aciladas de fosfatidil-mio-inositol manósidos (PIMs), que constituyen una fracción importante de la masa seca bacteriana ¹¹⁸. Los PIMs son precursores de lipomananos (LM) y lipoarabinomananos (LAM), glicolípidos característicos de los Mycobacteriales que cumplen funciones en la interacción hospedero-patógeno y modulación inmune. Su síntesis comienza en la cara citoplasmática de la membrana interna y continúa en el periplasma, mediante la acción sucesiva de glicosiltransferasas y proteínas responsables de elongación y ramificación ^{119–123}.

Pared celular

La pared celular de los Mycobacteriales está constituida por PG, el cual está unido covalentemente a AG, y estos están esterificados por MA ^{114,118}.

El PG constituye el esqueleto de la pared celular; aporta rigidez, estabilidad osmótica y determina la morfología bacteriana ¹²⁴. Está formado por cadenas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc), además de N-glicolilmurámico (MurNGlyc), característico de los Mycobacteriales, que confiere mayor resistencia frente a enzimas como la lisozima ^{114,123}. Las cadenas de glicanos están unidas a péptidos cortos (L-Ala-D-iso-Glu-mDAP-D-Ala-D-Ala), que se entrecruzan mediante enlaces de tipo 3-4 clásicos o 3-3 atípicos ^{110,125}.

Su síntesis comienza en el citoplasma con la formación del lípido I y el lípido II mediante la acción de las enzimas MurA-F y MurG, su translocación a través de la membrana por FtsW y MviN ^{5,126} y la polimerización final en el periplasma por las PBPs (del inglés, penicilin-binding-proteins) (PonA1/PBP1, PonA2/PBP2) ¹²⁷ (Figura 11).

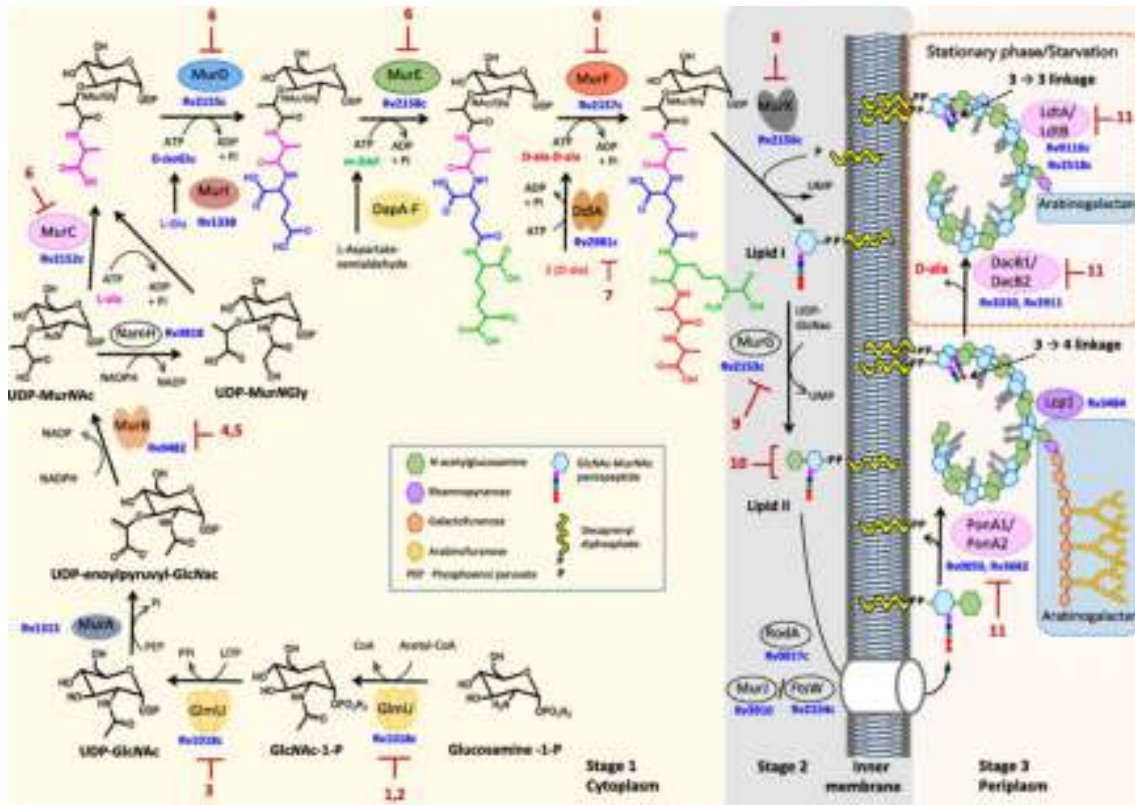


Figura 11: Biosíntesis del PG. Se muestran las 3 etapas del proceso: producción de los precursores en el citoplasma y síntesis del lípido I y el lípido II en la cara interna de la membrana (Etapa 1), su translocación a través de la membrana (Etapa 2) y la polimerización, el entrecruzamiento de las cadenas peptídicas y la unión al AG que ocurre en el periplasma (Etapa 3). Tomada de Raghavendra y cols. 2018 ¹²⁸.

Los AG constituyen la capa intermedia de la pared celular, enlazándose covalentemente al PG y a los MA ¹²⁹. Su estructura consiste en un dominio galactano lineal de alrededor de 30 residuos de galactosa, sintetizado por las galacto-furanosil-transferasas GltT1 y GltT2, y unido covalentemente al MurNGlyc del PG ¹¹⁰ (Figura 12). Este dominio puede encontrarse en forma lineal o modificado por grandes polímeros de arabinosa que conforman el dominio arabinano, cuya síntesis involucra DprE1-2 y las arabino-furanosil-transferasa AftA, AftB, EmbA y EmbB ^{123,130}. Esta diversidad en las enzimas responsables de transferir las cadenas de arabinosa es en parte responsable de la diversidad estructural de los AG ¹³¹.

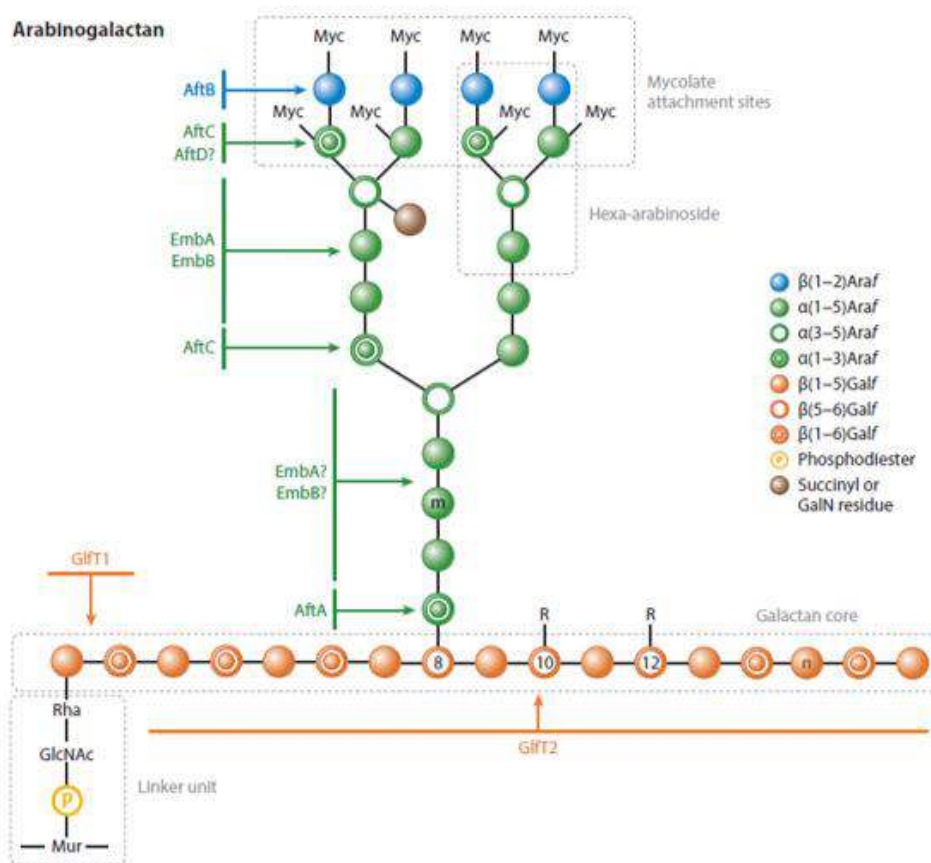


Figura 12: Estructura del AG y funciones de las enzimas claves, responsables de su biosíntesis. Tomada de Jankute y cols. 2015 ¹²³.

La membrana externa o micomembrana es la última capa y está compuesta principalmente por MA. Los MA son ácidos grasos α - y β -hidroxilados de cadena muy larga (70–90 carbonos), con diversas modificaciones como anillos de ciclopropano o grupos metil-cetonas ^{132–135}. Existen tres tipos principales: α -micólicos, metoxi-micólicos y ceto-micólicos ^{133,134}. Estos compuestos confieren baja fluidez y elevada impermeabilidad a la envoltura, siendo factores de virulencia y dianas de antibióticos ^{134,136}.

La biosíntesis de los MA requiere de los sistemas enzimáticos FAS-I y FAS-II (del inglés, Fatty Acid Synthase); que generan y elongan las cadenas acílicas hasta formar los MA maduros mediante la acción de Pks13 y FadD32 y Rv2509 ^{137–139}. Finalmente, MmpL3, transporta los MA a través de la membrana plasmática y los une a los AG, completando el ensamblaje del complejo mAGP ¹²³ (Figura 13).

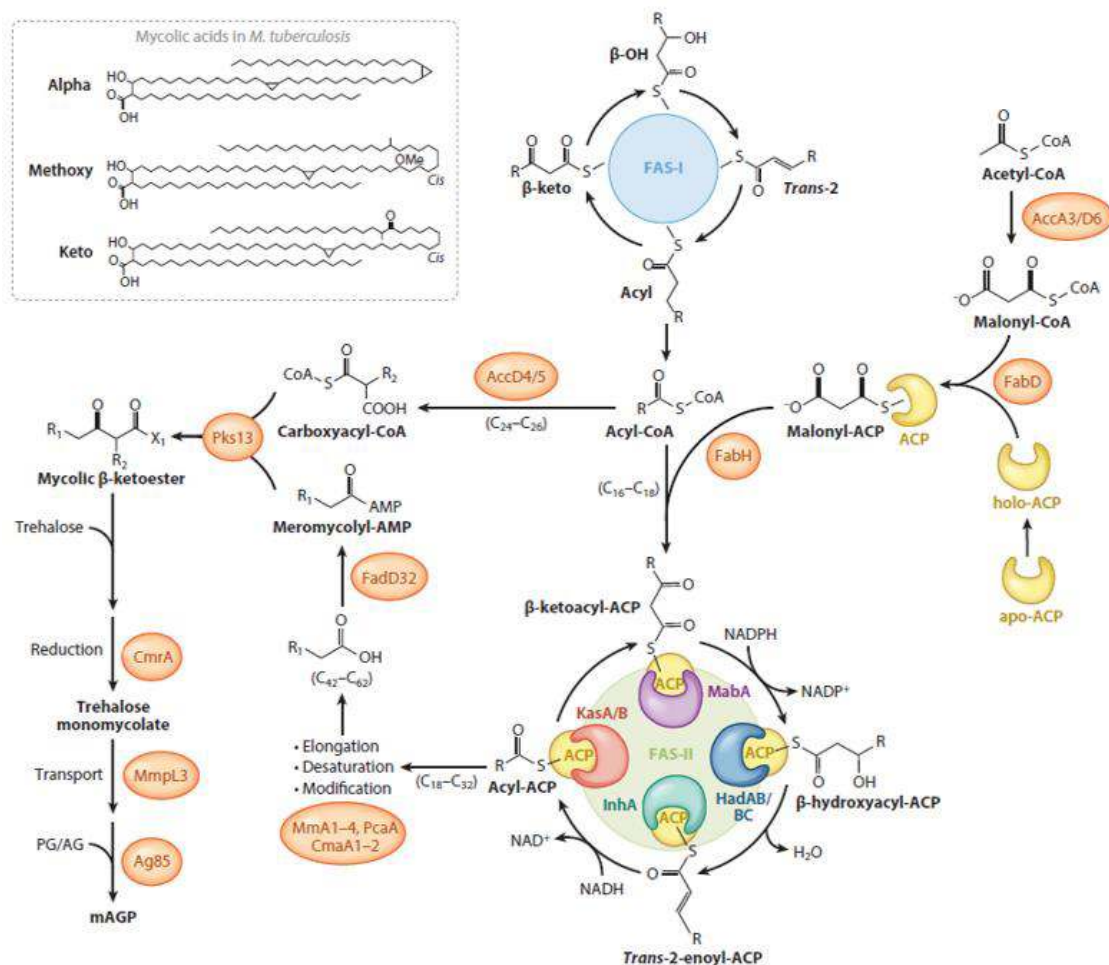


Figura 13: Estructura de los tres tipos de MA: α -micólicos, metoxi-micólicos y ceto-micólicos y representación esquemática de su biosíntesis. Tomada de Jankute y cols. 2015 ¹²³.

Por tanto, la complejidad de la envoltura celular de los *Mycobacteriales* requiere de sistemas enzimáticos igualmente complejos para su biosíntesis durante el crecimiento y la división celular.

3.2.2 Elongación polar asimétrica

A diferencia de las bacterias modelo como *E. coli* y *B. subtilis* que insertan nuevo material de la pared celular a lo largo de toda la célula, los *Mycobacteriales* crecen desde los polos ^{110,140,141} (Figura 14).

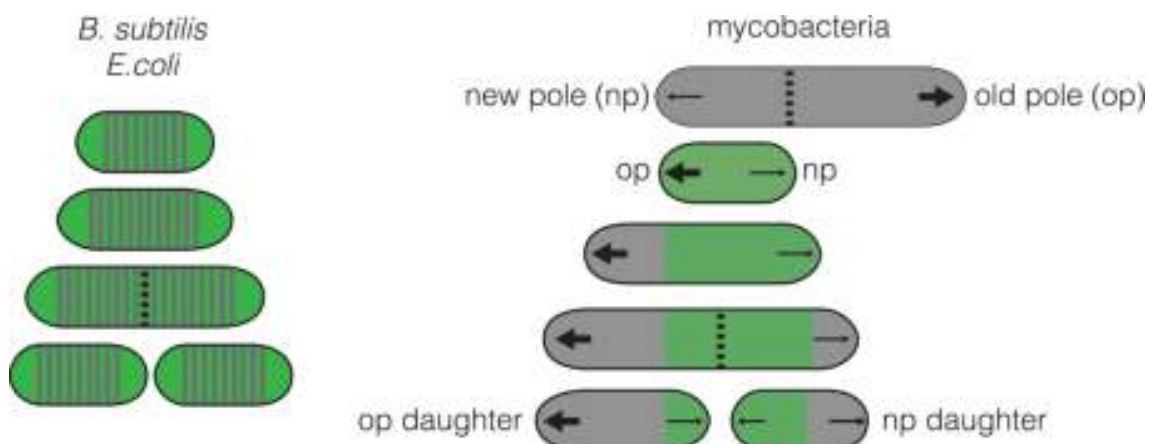


Figura 14: Crecimiento y división en los organismos modelo y los Mycobacteriales. En *B. subtilis* y *E. coli* la nueva pared (gris) se incorpora a lo largo de toda la célula, mientras que en Mycobacteriales se añade sólo en los polos, de forma desigual según el origen de cada uno. Flechas: sitios de síntesis de pared (flecha grande = mayor crecimiento); línea punteada: septo; verde: pared antigua; gris: pared nueva. Tomada de Baranowski y cols. 2019 ¹⁰⁹.

Existe consenso en que la elongación es polar, y de acuerdo con la mayoría de los estudios, sigue un modelo unipolar asimétrico, considerado actualmente el más aceptado (Figura 15). En el modelo de crecimiento unipolar asimétrico, la síntesis de la envoltura celular ocurre principalmente desde el polo viejo, transmitido por la célula madre, ya que concentra la mayor parte de los complejos responsables de este proceso. En contraste, el polo nuevo, que surge tras la constricción del septo en el ciclo anterior, debe ensamblar la maquinaria biosintética desde el inicio, lo que determina que el crecimiento sea nulo o más lento ¹⁴²⁻¹⁴⁴. A esto se añade que no todas las células heredan polos con la misma antigüedad: algunas reciben polos que fueron generados varios ciclos atrás, mientras que otras portan polos de formación mucho más reciente. Aquellas que conservan polos antiguos, denominadas “aceleradoras”, presentan una velocidad de crecimiento superior a las que poseen polos más jóvenes, lo que resulta en células de mayor longitud. Por el contrario, las células que cuentan con polos recientes, conocidas como “alternadoras”, muestran un crecimiento más lento ^{142,143}.

Esta elongación polar asimétrica tiene dos consecuencias importantes. Por un lado, contribuye a la heterogeneidad de la población bacteriana, con células que exhiben diferencias en sus tamaños y niveles de resistencia a antibióticos, entre otras ¹⁴². Por otro lado, el crecimiento polar implica que luego de un ciclo celular, el septo en el medio de la célula debe convertirse en un polo, aunque la transición de septo a polo es un proceso muy poco comprendido.

Recientemente, se ha descrito el modelo bifásico tipo NETO (del inglés, “new end take off”), que propone que el nuevo polo atraviesa una fase de latencia y solo después inicia el crecimiento rápido, alcanzando un ritmo similar al del polo viejo antes de la división próxima ¹⁴⁵. Este modelo ha ganado interés, pero aún no ha desplazado al unipolar asimétrico como el marco predominante (Figura 15).

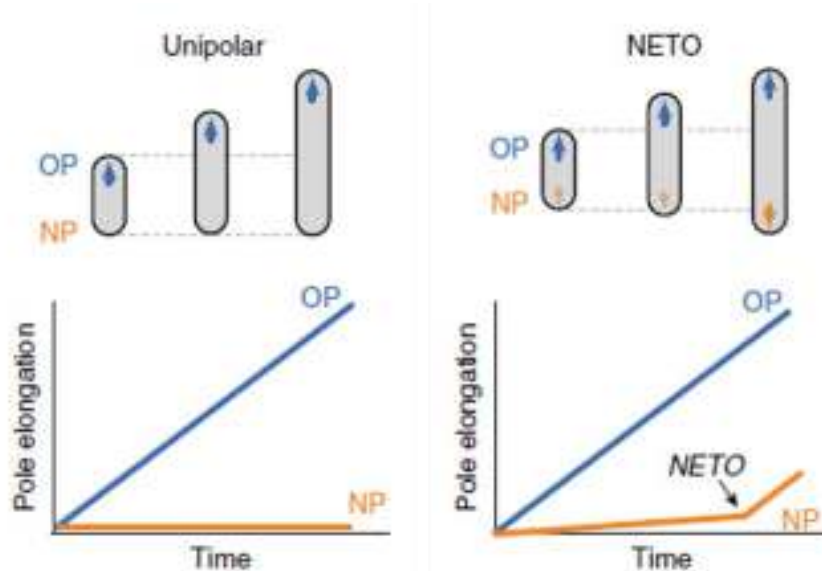


Figura 15: Modelos de crecimiento polar: unipolar, y NETO. Representación esquemática de las curvas de elongación del polo viejo (OP, azul) y del polo nuevo (NP, naranja) desde el nacimiento de la célula (división de la célula madre) hasta la siguiente división, según los modelos unipolar y NETO. Adaptada de Hannebelle y cols. 2020 ¹⁴⁵.

3.2.3 Elongasoma y divisoma en Mycobacteriales: Proteínas que participan en su ensamblaje y activación

Los Mycobacteriales carecen de varios homólogos de proteínas claves del elongasoma y divisoma de los organismos modelo. Si bien se han comenzado a identificar proteínas exclusivas y redes de interacciones específicas en los Mycobacteriales, mayormente se desconocen quienes cumplen las funciones de las proteínas faltantes ¹⁰⁹ (Figura 16).

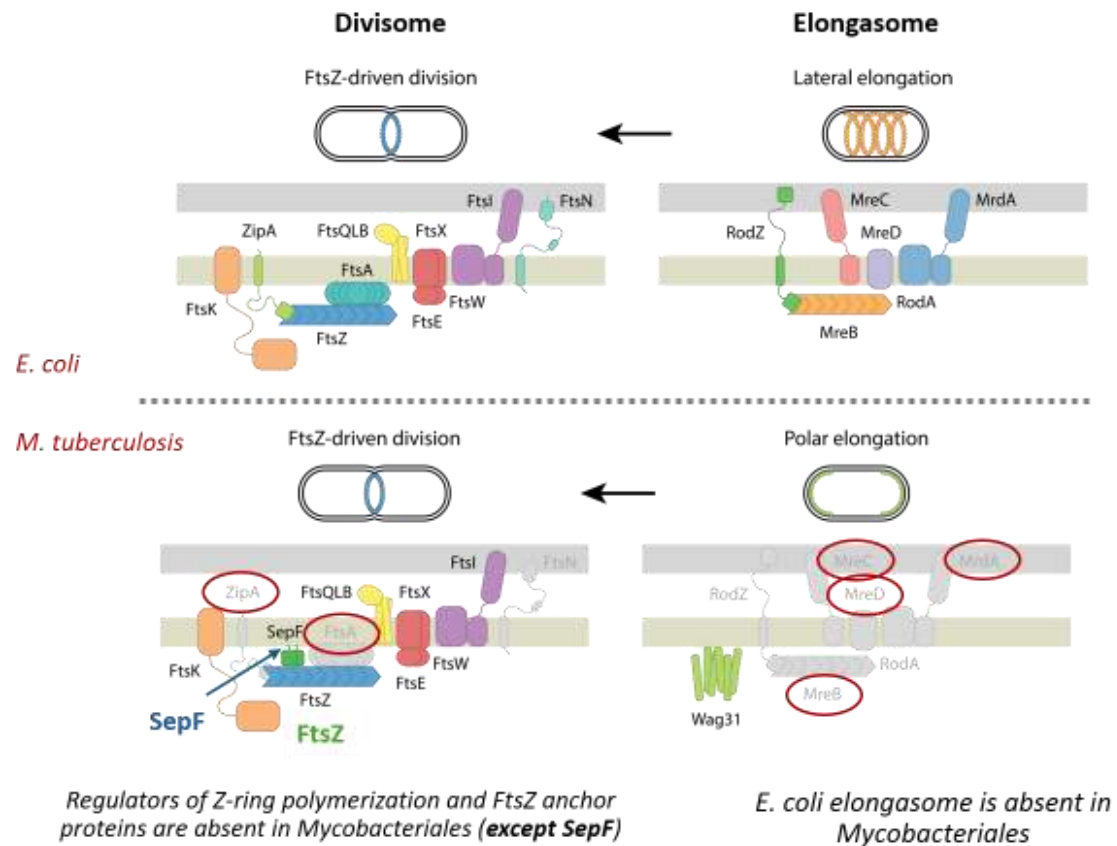


Figura 16: Proteínas que participan en el ensamblaje del elongasoma y divisoma de *E. coli* y *M. tuberculosis*. En *E. coli*, la elongación ocurre a lo largo de la pared lateral y depende de MreB como proteína central, junto con MreC, MreD y MrdA como componentes asociados. En contraste, en *M. tuberculosis* el crecimiento se restringe a los polos y es organizado por Wag31, que establece el sitio de elongación polar. En ambos organismos, FtsZ constituye la proteína central del divisoma y se concentra en el medio de la célula. Sin embargo, en *E. coli* el anclaje del anillo Z a la membrana depende de ZipA y FtsA, y la activación terminal de la división requiere de FtsN, mientras que *M. tuberculosis* carece de homólogos evidentes de estas proteínas; y en su lugar, la proteína SepF, es la proteína principal que estabiliza el anillo Z a la membrana. Imagen generada por Daniela Megrian. 2024.

Los Mycobacteriales carecen de la proteína MreB, la proteína central del elongasoma en *E. coli* y *B. subtilis*¹⁴⁶. En su lugar, codifican un homólogo de DivIVA de *B. subtilis*, la proteína Wag31 (Figura 16). Wag31 se concentra en los polos y establece el sitio de crecimiento polar, además de organizar el elongasoma y reclutar enzimas de síntesis de envoltura^{141,141,147,148}. Su papel central en el elongasoma es evidente, ya que la depleción de Wag31 provoca pérdida progresiva de la forma bacilar hasta generar células esféricas, y su desregulación conduce a crecimiento polar aberrante^{141,148,149}. Asimismo, Wag31 también se localiza en el septo de células en división, lo que sugiere que participa en la formación del nuevo polo en las células hijas¹⁴³. Se ha descrito que Wag31 interactúa con múltiples proteínas, varias de ellas exclusivas de estas bacterias, aunque gran parte de los componentes del elongasoma aún no han sido identificados. Entre las proteínas

conocidas destaca CwsA, cuya interacción con Wag31 resulta esencial para la estabilidad y la localización polar de este andamiaje ¹⁵⁰, aunque esta proteína no es estrictamente conservada en los Mycobacteriales ^{151,152}.

La división celular de los Mycobacteriales también presenta particularidades. A diferencia de lo que ocurre en organismos modelo como *E. coli* y *B. subtilis*, en estas bacterias la localización del septo no está guiada por las reglas moleculares clásicas que aseguran su formación en la zona media de la célula ^{110,151}. En particular, el sistema Min y NO que evitan la formación del anillo Z en lugares incorrectos, están ausentes en los Mycobacteriales. Estas bacterias solo presentan un candidato relacionado con MinD (Ssd), cuya sobreexpresión alarga las células y reprime genes de crecimiento y división ¹⁵³. Se ha postulado que esta falta de los sistemas que regulan la posición del septo, podría llevar a que éste se localice en posiciones más variables, que abarcan entre un 20 y un 80% de la longitud celular ¹⁵⁴.

Otras diferencias entre los organismos modelo y estas bacterias están relacionadas con los estabilizadores y reguladores positivos y negativos del anillo Z. En *E. coli* y *B. subtilis*, las proteínas que anclan FtsZ a la membrana y la posicionan en el lugar correcto, están bien caracterizadas, FtsA, ErzA, SepF, ZapA. Sin embargo, los Mycobacteriales, carecen de homólogos de estas proteínas, a excepción de SepF, que localiza el septo de forma dependiente de FtsZ ¹⁵⁵ (Figura 16). El agotamiento y la sobreexpresión de SepF conducen a filamentos y ramificaciones, fenotipos canónicos de la división celular ¹⁵⁶.

Después de ensamblar el divisoma “temprano” se reclutan proteínas “tardías”, necesarias para construir la pared celular septal. En *B. subtilis* participan: FtsQLB, FtsW y PBP2B ¹⁵⁷ y en *E. coli*: FtsK, FtsQLB, FtsW, PBP3 y FtsN ¹⁵⁸. Aunque estas proteínas están presentes en Mycobacteriales, a excepción de FtsN, las funciones específicas siguen siendo desconocidas (Figura 16). Algunos estudios preliminares sugieren una jerarquía de dependencias de estas proteínas en los Mycobacteriales: FtsZ→FtsK→FtsQ→FtsLB ¹⁵⁹. Por otra parte, la pequeña proteína transmembrana CrgA, específica de este grupo de bacterias, participa en casi todas las etapas de división, y se asocia con CwsA, que a su vez regula la localización de Wag31 en los polos, estableciendo un eje de comunicación entre la maquinaria septal y el inicio del crecimiento polar en las células hijas ¹⁵⁰. Este mecanismo, como ya mencionamos antes, no está estrictamente conservado en todos los Mycobacteriales.

En la síntesis del PG de los organismos modelo participan principalmente las proteínas MurA, MurJ, las PBPs y RodA. Si bien, los Mycobacteriales codifican homólogos de estas proteínas, existen algunas diferencias de regulación específicas. Una de ellas es que el primer paso en la biosíntesis del PG, catalizado por la enzima MurA, está regulado por CwlM, una proteína citoplasmática que en su forma no fosforilada se une a MurA y la activa, mientras que la fosforilación por la quinasa PknB modula su función ¹⁶⁰. Otra diferencia importante es que el homólogo de MurJ en micobacterias, MviN, se regula mediante fosforilación, lo que añade una capa de control postraducciona que no es habitual en los organismos modelo clásicos. Por otro lado, y a diferencia de los bacilos modelo, en las micobacterias, la síntesis de PG durante la elongación y la división recae principalmente en PonA1, una PBP esencial que combina funciones de elongación y división, y cuya actividad transglicosilasa es indispensable ^{161,162}. Durante la citocinesis algunas PBPs interactúan con los miembros del divisoma FtsW y CrgA, mientras que PonA1 aparece tanto en septos como en polos, sugiriendo un rol dual en la síntesis septal y en la instauración del crecimiento polar ¹⁶³.

El proceso final es la degradación del PG para permitir la separación de las células hijas. En este proceso también hay diferencias. En *B. subtilis*, participan las enzimas hidrolasas como LytC, LytD, LytE y LytF ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶, mientras que en estas bacterias se involucran a las hidrolasas RipA/B, ChiZ y Ami1 ¹⁶⁷.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo identificó nuevos componentes del elongasoma y divisoma de los Mycobacteriales. Usando *C. glutamicum* como modelo, identificamos el complejo Glp/GlpR, conformado por una molibdotransferasa reutilizada similar a la gefirina (Glp) y su receptor de membrana (GlpR), como nuevos integrantes del divisoma. Nuestros resultados muestran que Glp interacciona directamente con FtsZ y GlpR con Wag31, estableciendo un puente funcional entre el divisoma y el elongasoma durante la citocinesis ¹⁶⁸. Por otro lado, estudiamos el rol de la proteína conservada en los Mycobacteriales, FhaA, y demostramos su rol esencial en el crecimiento polar y asimétrico en micobacterias. Nuestros resultados muestran que esta proteína participa en el correcto posicionamiento polar del elongasoma, y que en su ausencia el crecimiento pierde su asimetría ¹⁶⁹.

Por tanto, nuestro conocimiento actual muestra que la composición y arquitectura del elongasoma y divisoma de los Mycobacteriales difiere de los organismos modelo y es aún muy poco comprendida.

3.2.4 El rol de la fosforilación de proteínas en la división celular de los Mycobacteriales

Existen sólidas evidencias de que los Mycobacteriales, a diferencia de otros grupos bacterianos, emplean la fosforilación de proteínas como un mecanismo central para regular la elongación y la división celular^{170,171}. Los genomas de estas bacterias codifican un número variable de quinasas de proteínas Ser/Thr, aunque sólo cuatro de ellas (PknA, PknB, PknG y PknL) se encuentran estrictamente conservadas¹⁷² y tres de ellas (PknA, PknB y PknL) tienen un papel importante en la división celular y la morfogénesis¹⁷³⁻¹⁷⁵. De hecho, la alteración de los niveles de expresión de PknA o PknB produce morfologías aberrantes que reflejan defectos en la elongación y la división tanto en micobacterias y corinebacterias^{173,174,176}.

Asimismo, se ha demostrado que las proteínas de andamiaje, tanto del elongasoma como del divisoma, pueden ser fosforiladas in vitro por quinasas Ser/Thr, y la fosforilación in vivo de Wag31 y FtsZ ha sido confirmada mediante estudios de fosfoproteómica en micobacterias^{177,178}, aunque existe menos evidencia al respecto en corinebacterias¹⁷⁹. En micobacterias, se ha reportado la fosforilación de Wag31 por PknA en un residuo específico de treonina (Thr73), aunque la relevancia fisiológica de esta modificación permanece en debate^{173,180}. En corinebacterias, por el contrario, no se ha reportado la fosforilación de Wag31; sin embargo, la conservación de PknA y PknB en estos organismos respalda la hipótesis de su implicancia en los procesos de crecimiento y división celular^{151,176}. En *C. glutamicum* se han descritos sitios de fosforilación de FtsZ, y se demostró que PknA es la principal quinasa responsable de la fosforilación del residuo T108¹⁷³, localizado en una región de la proteína que participa en la unión/hidrólisis de nucleótidos (Figura 17).

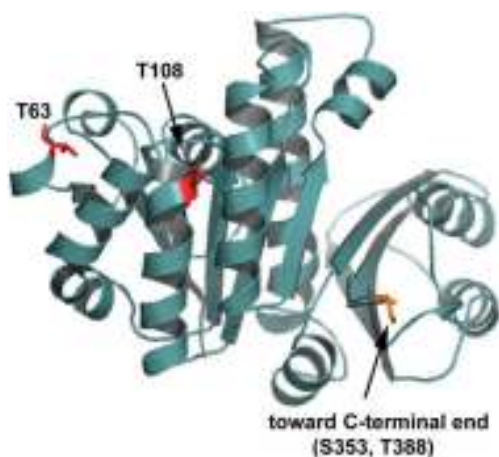


Figura 17: Sitios putativos de fosforilación de FtsZ por PknA. Se muestra un modelo predicho de homología de FtsZ de *C. glutamicum*. Los residuos fosforilados por quinasas de proteínas Ser/Thr se representan en rojo y están señalados. El residuo T108 se localiza en una región que participa en la unión/hidrólisis de nucleótidos, mientras que T63 se localiza en la interfaz del dominio de oligomerización de FtsZ. Los residuos S353 y T388 se encuentran hacia el extremo C-terminal. El extremo C-terminal no está representado en este modelo. Tomada de Donovan y Bramkamp. 2014¹⁵¹.

En conclusión, aunque se conoce que la fosforilación de proteínas constituye una estrategia clave para controlar la morfología, el crecimiento y la división celular en Mycobacteriales, los blancos fosforilados, así como el mecanismo molecular subyacente, aún son desconocidos.

3.2.5 *Corynebacterium glutamicum* como modelo

C. glutamicum, una bacteria no patógena de rápido crecimiento, ha sido ampliamente estudiada y constituye un modelo útil para estudiar los mecanismos de elongación y división celular en los Mycobacteriales. Dada su relevancia industrial, ha sido objeto de numerosos estudios y se dispone de una amplia variedad de herramientas genéticas¹⁸¹. Además, la mayoría de las proteínas implicadas en los procesos de elongación y división en micobacterias, también están presentes en *C. glutamicum*^{110,151}. A diferencia de *M. tuberculosis*, que posee 11 quinasas Ser/Thr¹⁷³, y de *M. smegmatis*, con más de 20¹⁸², *C. glutamicum* codifica únicamente las cuatro Ser/Thr quinasas de proteínas estrictamente conservadas en los Mycobacteriales (PknA, PknB, PknL y PknG)¹⁷⁶. Cabe destacar, los mutantes de delección de cada una de estas Ser/Thr quinasas son viables en *C. glutamicum*, lo que constituye una herramienta valiosa para investigar mecanismos conservados de división celular y su regulación por fosforilación de proteínas en los Mycobacteriales

3.3. Proteómica basada en espectrometría de masas

La proteómica es la disciplina científica dedicada al estudio a gran escala de las proteínas que conforman un sistema biológico, conocidas colectivamente como el proteoma. A diferencia del genoma, que es relativamente constante, el proteoma es dinámico y varía

en función del estado fisiológico, tipo celular, estadio de desarrollo o condiciones ambientales del organismo. El término proteómica, acuñado en la década de los noventa como una analogía con la genómica ¹⁸³, abarca no sólo la identificación y cuantificación de proteínas, sino también el análisis de su localización subcelular, sus interacciones, sus modificaciones postraduccionales (PTM, del inglés, post-translational modifications), y su degradación o recambio. La diversidad funcional del proteoma se incrementa sustancialmente por procesos como el splicing alternativo, las variaciones genéticas y la modificación covalente de residuos específicos, lo cual da origen a múltiples formas moleculares de una misma proteína. Para abarcar esta complejidad, se ha propuesto el término proteoforma, que designa cada una de las variantes moleculares que puede adoptar el producto de un único gen, incluyendo mutaciones, isoformas de splicing y PTMs ¹⁸⁴.

Entre las metodologías que han revolucionado el estudio del proteoma se destaca la espectrometría de masas (MS, del inglés, mass spectrometry). Esta metodología permite la identificación y cuantificación sistemática de proteínas y sus modificaciones con alta sensibilidad, especificidad y aplicabilidad universal. La MS ha evolucionado notablemente en las últimas décadas, pasando de ser una herramienta para catalogar proteínas a convertirse en una plataforma multifacética capaz de analizar actividades enzimáticas, interacciones proteicas, dinámica de señalización, y composición de complejos de proteínas.

Existen dos estrategias para la proteómica basada en MS: top-down y bottom-up (Figura 18). La aproximación top-down analiza proteínas intactas. Esto permite una caracterización más precisa de las proteoformas, ya que se conservan las modificaciones combinadas que ocurren en una misma molécula. Aunque top-down ofrece datos más ricos en cuanto a isoformas y PTMs, su implementación a gran escala ha sido limitada por desafíos técnicos asociados a la ionización, fragmentación, separación de proteínas de alto peso molecular y la complejidad de la interpretación de los datos generados. En la estrategia bottom up, las proteínas son primero digeridas enzimáticamente (comúnmente con tripsina u otras proteasas) y se analizan los péptidos resultantes mediante cromatografía líquida acoplada a MS en tándem (LC-MS/MS, del inglés, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry). Esta estrategia es la más ampliamente utilizada en los estudios de proteómica a gran escala, debido a su robustez,

sensibilidad y adaptabilidad a muestras complejas. Sin embargo, presenta limitaciones, como la pérdida de información sobre modificaciones combinadas o variantes específicas de proteínas, ya que esta información se pierde al digerir las proteínas ^{184,185}. Cuando los péptidos provienen de una mezcla compleja de proteínas, a esta metodología se le llama proteómica de tipo shotgun, denominada así por su analogía con la secuenciación genómica tipo shotgun ¹⁸⁶. Una de las limitaciones de este método es que la inferencia de proteínas se realiza de forma indirecta a partir de los péptidos detectados, lo cual puede generar ambigüedad, especialmente cuando los péptidos son compartidos por múltiples proteínas. Sin embargo, se mantiene como una de las herramientas más robustas y versátiles en proteómica moderna, y su uso sigue expandiéndose gracias a los continuos avances en MS, preparación de muestras y análisis bioinformático.

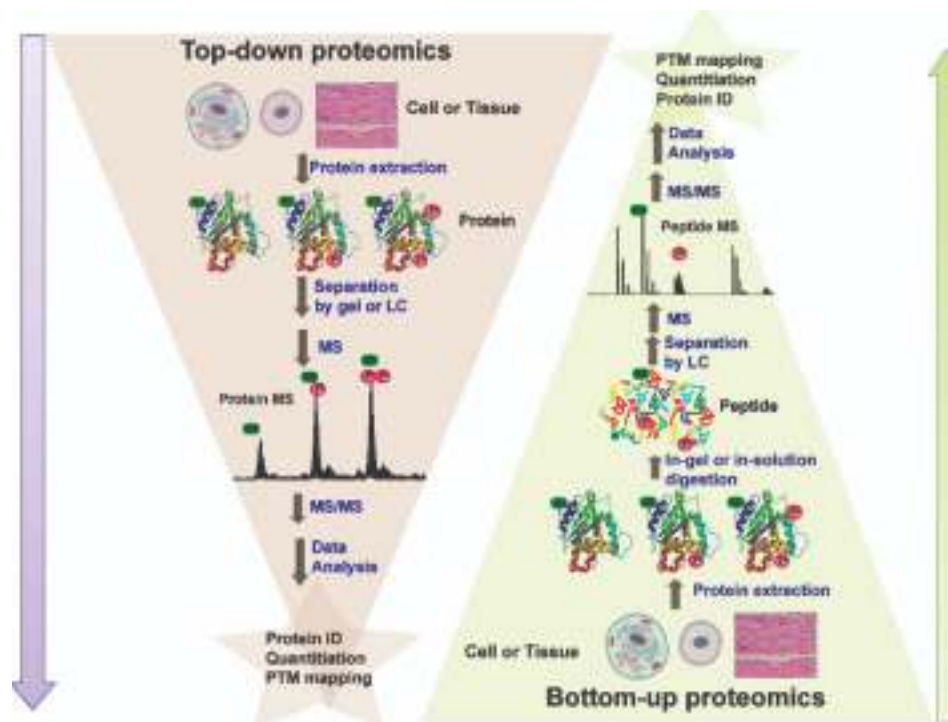


Figura 18: Comparación esquemática entre proteómica top-down y bottom-up. En el enfoque top-down, las proteínas intactas se separan y analizan directamente por MS, lo que permite identificar proteoformas y localizar PTMs. En el enfoque bottom-up, las proteínas se digieren en péptidos, que luego se separan y fragmentan. La identificación de estos péptidos mediante comparación con bases de datos permite inferir las proteínas presentes, aunque con cobertura de secuencia incompleta. Tomado de Gregorich y cols. 2014 ¹⁸⁷.

En la estrategia shotgun, las proteínas son primero extraídas de una muestra biológica compleja y posteriormente digeridas, siendo la tripsina la enzima más comúnmente utilizada. Esta proteasa corta específicamente los enlaces peptídicos en el extremo carboxilo de los residuos de Lys y Arg, generando péptidos de longitud y propiedades

ideales para su posterior análisis por MS. Los péptidos tripticos son luego separados, típicamente mediante CL en fase reversa (RP, del inglés, reverse phase) acoplada a ionización por nanoelectrospray (nESI, del inglés, nanoElectrospray Ionization). Utilizando esta estrategia es posible cuantificar decenas de miles de péptidos, correspondientes a miles de proteínas, a partir de sólo unos pocos microgramos de material biológico inicial en el lapso de una hora¹⁸⁸.

En los métodos de proteómica de descubrimiento o no dirigida, la estrategia de adquisición de datos puede dividirse en dos categorías principales: dependiente de los datos (DDA, del inglés, data-dependent acquisition) o independiente de los datos (DIA, del inglés data-independent acquisition)¹⁸⁹ (Figura 19).

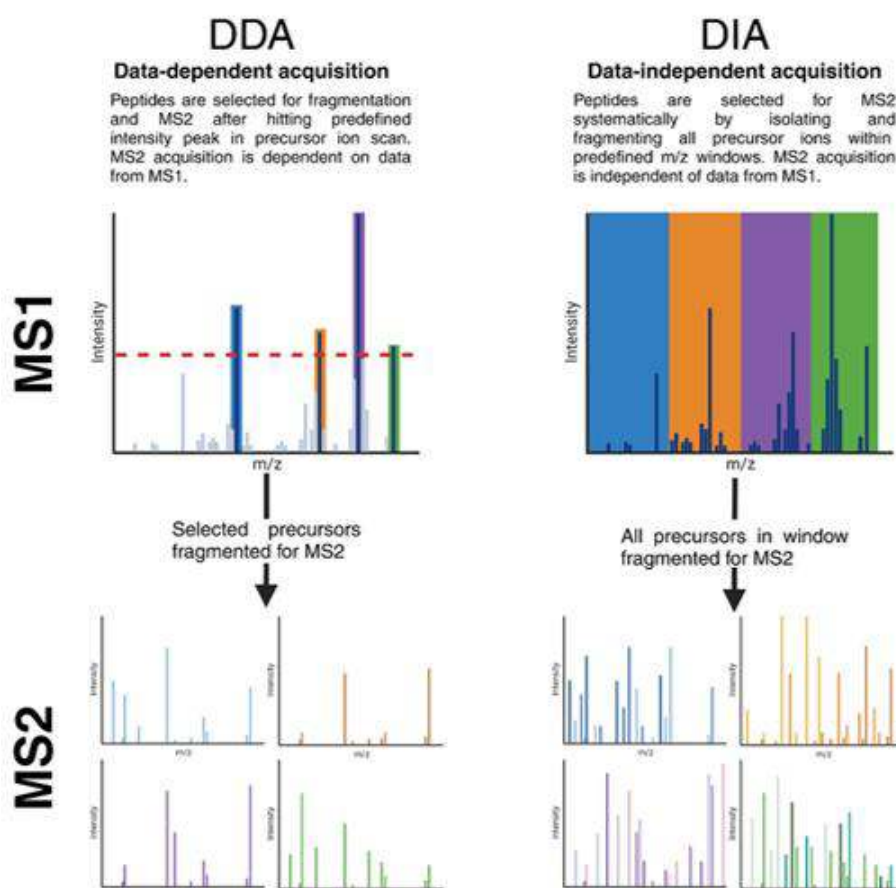


Figura 19: Comparación esquemática entre los métodos DDA y DIA para la adquisición de datos. En DDA, los iones precursores a ser fragmentados se seleccionan en base a su intensidad a partir del espectro MS1. Esto implica que sólo una fracción de los péptidos es analizada por MS/MS y que se generan espectros que contienen iones provenientes mayoritariamente de un ión precursor, facilitando el análisis posterior de los datos. En DIA no hay una selección específica desde MS1; todos los precursores dentro de un rango de m/z se fragmentan de manera simultánea. Como resultado, los espectros MS2 son más complejos y contienen señales de múltiples precursores, lo que exige algoritmos bioinformáticos más avanzados para resolver cada componente. Tomada de Ward y cols. 2024¹⁹⁰.

La estrategia DDA es el enfoque clásico, aunque hoy en día el DIA está cobrando relevancia ¹⁹¹. En el modo DDA, el espectrómetro de masas realiza primero un barrido MS completo (MS1) y selecciona los iones precursores más intensos (generalmente entre 12 y 20, dependiendo del equipo y parámetros seleccionados por el operador) para fragmentarlos y generar espectros MS/MS (MS2). Esta estrategia tiene asociado un problema de muestreo que puede resultar en diferencias de los iones detectados entre réplicas (missing values), especialmente para péptidos de baja abundancia. No obstante, la identificación de péptidos en DDA es altamente específica, y se apoya en motores de búsqueda que comparan los espectros de fragmentación experimentales con espectros teóricos derivados de una base de datos de secuencias de proteínas digerida in silico. Se genera una lista de péptidos candidatos que presentan valores de m/z que coinciden con el valor experimental $\pm$ un error permitido. Para cada candidato se genera un espectro MS/MS teórico, que luego se compara con el espectro experimental (PSM, del inglés, Peptide Spectrum Matching) (Figura 20) ^{192,193}, y se utilizan funciones de puntuación diseñadas para discriminar entre coincidencias correctas e incorrectas. Así, el péptido más probable se posiciona en primer lugar entre los candidatos evaluados. Para calcular la tasa de descubrimientos falsos (FDR, del inglés, False Discovery Rate), se introducen péptidos incorrectos conocidos denominados señuelos que permiten estimar la distribución de coincidencias incorrectas dentro del espacio de búsqueda.

En la estrategia DIA, se fragmenta, en cada ciclo de adquisición, todos los precursores dentro de ventanas m/z definidas y se realizan adquisiciones sucesivas variando las ventanas de manera de cubrir un amplio rango de valores de m/z . Este enfoque genera espectros quiméricos que contienen fragmentos de múltiples iones precursores en el mismo espectro (Figura 19). Como resultado, DIA ofrece mayor reproducibilidad y menor tasa de missing values en análisis de múltiples muestras, siendo particularmente útil para estudios cuantitativos comparativos. Sin embargo, el análisis posterior de estos espectros MS/MS, formados por fragmentos de distintos precursores, requiere el uso de bibliotecas espectrales previamente construidas o métodos computacionales avanzados, debido a la complejidad de asignar fragmentos a sus respectivos precursores en espectros mixtos ¹⁸⁸.

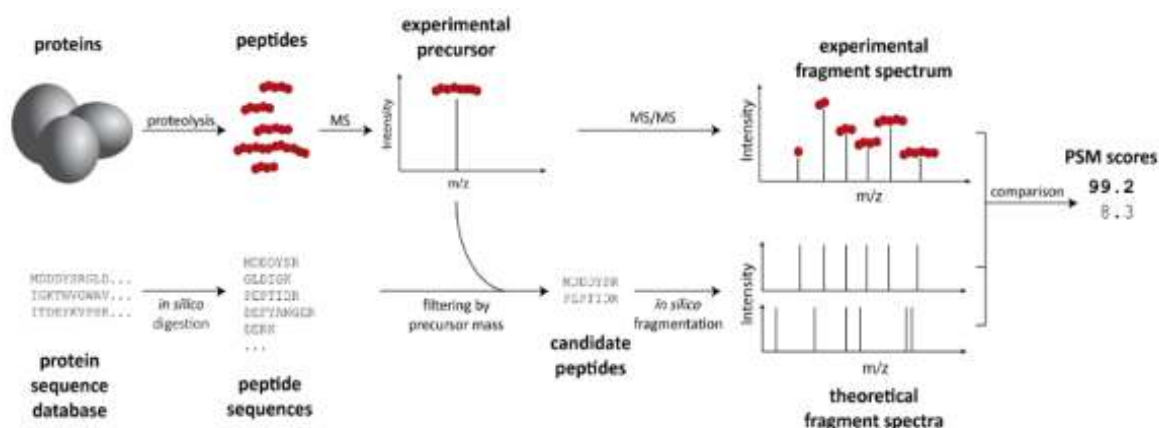


Figura 20: Proceso de identificación de péptidos mediante PSM. Los espectros de fragmentación (MS/MS) obtenidos experimentalmente se comparan con espectros teóricos generados a partir de una base de datos que contiene las secuencias proteicas de referencia. Estos espectros teóricos se construyen tras una digestión enzimática o química in silico, simulando la fragmentación de cada péptido. La coincidencia entre los espectros experimentales y los teóricos se evalúa mediante funciones de puntuación diseñadas para discriminar entre asignaciones correctas e incorrectas, PSM. Tomada de OpenMS ¹⁹³.

La cuantificación en proteómica basada en MS presenta varios desafíos, ya que esta técnica no es intrínsecamente cuantitativa: la intensidad de la señal no depende únicamente de la cantidad de analito, sino también de su eficiencia de ionización entre otras variables. Existen, sin embargo, diversas estrategias que permiten obtener información cuantitativa, ya sea en términos absolutos o relativos, a partir de los experimentos proteómicos. Estas estrategias se pueden clasificar en las que implican marcado de los péptidos y aquellas libres de marcas. Si bien las estrategias basadas en marcaje suelen ofrecer una mayor precisión en la cuantificación, implican costos elevados, pasos adicionales en la preparación de muestras y una mayor complejidad experimental ¹⁹⁴. Dentro de los enfoques libres de marcas se destacan: la cuantificación basada en la intensidad de los precursores (XIC, del inglés, Extracted Ion Chromatogram) y el conteo de espectros (SC, del inglés Spectral Counting) (Figura 21). El método XIC estima la abundancia de un péptido mediante la integración del área bajo la curva de su señal cromatográfica, lo cual requiere una cromatografía altamente reproducible y una alineación precisa entre corridas. El conteo espectral se basa en el número de espectros MS/MS asignados a péptidos de una proteína. Este número tiende a correlacionarse con su abundancia relativa, siendo más robusto para detectar proteínas altamente expresadas, aunque menos sensible para aquellas de baja abundancia. Una variante mejorada del conteo espectral es el uso de NSAF (del inglés, Normalized Spectral Abundance Factor), que corrige el sesgo introducido por la longitud de las proteínas. Las proteínas más largas

generan más péptidos, y por ende más espectros, lo que podría sobreestimar su abundancia si no se corrige. NSAF se calcula dividiendo el valor de SC asignados a una proteína por su longitud (L) en aminoácidos, y luego por la suma total de todos los SC/L para todas las proteínas identificadas en una mezcla compleja. Esta métrica permite comparar abundancias relativas dentro y entre muestras. La eficacia de este método depende en gran medida de la calidad de las identificaciones a partir de la asignación de espectros ¹⁹⁵.

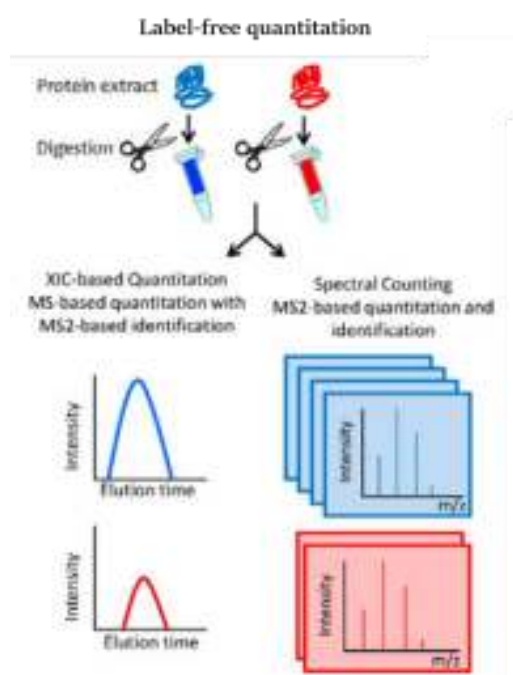


Figura 21: Métodos libres de marca para cuantificación de proteínas. La cuantificación puede realizarse a partir del método XIC, comparando las señales MS de un mismo péptido entre diferentes experimentos, lo que permite estimar su abundancia relativa. En el método SC, la cuantificación de proteínas se infiere a partir del número de espectros de fragmentación (MS/MS) obtenidos para una proteína dada, asumiendo que existe una correlación entre el número de espectros y su abundancia relativa. En este caso, la identificación y cuantificación se obtienen de manera simultánea a partir de los mismos espectros MS/MS. En ambos casos, cada muestra se analiza de forma independiente y se comparan los resultados para obtener cuantificaciones relativas. Modificada de Villar y cols. 2017 ¹⁹⁶.

3.4 Estrategias interactómicas basadas en espectrometría de masas

La interactómica estudia las interacciones proteína-proteína (PPIs, del inglés protein-protein interactions) que subyacen a todos los procesos biológicos. Se estima que más del 80% de las proteínas no funcionan de manera aislada, sino que forman complejas redes interactómicas que son críticas para la organización y función celular ¹⁹⁷. Estas interacciones pueden clasificarse como estables, que implican proteínas que se ensamblan en complejos con una asociación duradera, o transitorias, asociadas a cambios dinámicos en la célula ^{198–201}. La MS ha revolucionado el análisis de las PPIs al proporcionar herramientas para identificar, caracterizar y mapear estas redes con alta sensibilidad y especificidad ^{198–201}.

Los métodos usados incluyen: la purificación por afinidad acoplada a MS (AP, del inglés, affinity purification), el entrecruzamiento químico de proteínas acoplado a MS (XL, del

inglés, cross-linking), el co-fraccionamiento acoplado a MS (CF, del inglés, co-fractionation), la proteólisis limitada acoplada a MS (LiP, del inglés, limited proteolysis), el análisis del perfil térmico del proteoma (TPP, del inglés, thermal proteome profiling), y el marcado por proximidad acoplado a MS (PL, del inglés proximity labeling)^{198–201}.

AP-MS

La AP-MS es un método clásico y ampliamente utilizado para estudiar PPIs a gran escala, que combina la captura de complejos proteicos mediante cromatografía de afinidad (en base a etiquetas o anticuerpos específicos) y su posterior análisis por MS. En este método, la proteína de interés junto con sus interactores se recupera mediante enriquecimiento por afinidad. Para ello se puede usar un anticuerpo contra el cebo o alternativamente la expresión de la proteína de interés fusionada con una etiqueta que facilite la posterior purificación. Tras una lisis celular suave y no desnaturizante, la proteína cebo y sus proteínas asociadas se aíslan con una resina de afinidad que reconoce al anticuerpo o la etiqueta de afinidad, eliminando las uniones inespecíficas mediante lavados. La elución de la proteína de interés y sus proteínas interactuantes depende del método de afinidad usado (Figura 22).

Como se ha mencionado, las etiquetas de afinidad son componentes claves en esta técnica. Las mismas pueden ser desde pequeñas secuencias de péptidos hasta dominios proteicos más grandes, que pueden ubicarse en el extremo N y C terminal o incluso en el medio de la secuencia de la proteína de interés²⁰⁰. Entre las más comunes se encuentra la His-tag (hexahistidina), que permite la purificación de proteínas etiquetadas y sus interactores mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados²⁰². También, la etiqueta FLAG, que es un octapéptido hidrofílico (DYKDDDDK) que puede ser reconocido por anticuerpos específicos. Existen varios anticuerpos monoclonales comerciales anti-FLAG, así como anticuerpos policlonales con una afinidad mayor^{203,204}. Otra etiqueta ampliamente usada es la Strep-tag, un péptido de ocho aminoácidos (WRHPQFGG) capaz de unirse a la estreptavidina²⁰⁵. Este sistema, Strep-tag-estreptavidina ha evolucionado hacia versiones mejoradas que incrementan la afinidad y estabilidad de unión, como Strep-tag II (WSHPQFEK)²⁰⁶ que usa una variante de estreptavidina modificada, conocida como Strep-Tactin.

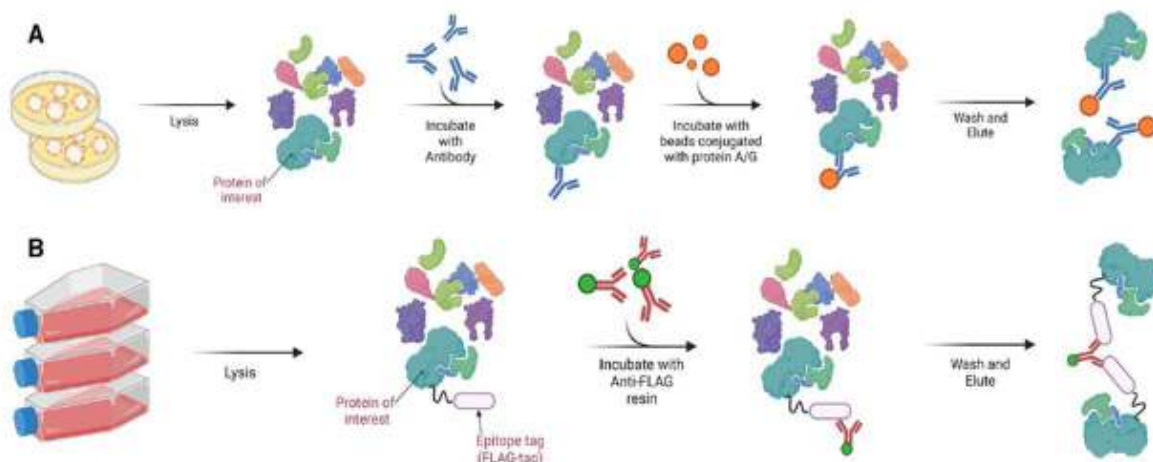


Figura 22: Flujo de trabajo de AP-MS. **A)** A partir de un lisado proteico, se emplea un anticuerpo específico para aislar de manera selectiva una proteína de interés (POI) no marcada que se encuentre en niveles fisiológicos. Dicha POI puede asociarse con otros interactores proteicos, directa o indirectamente. Para inmovilizar estos complejos, se incorporan perlas recubiertas con proteína A/G, las cuales capturan los anticuerpos junto con las proteínas unidas. Finalmente, mediante etapas de lavados y elución, se recuperan la POI y sus interactores, que posteriormente son analizados por LC-MS/MS. **B)** En ausencia de anticuerpos adecuados, la POI puede fusionarse a etiquetas de epítipo (por ejemplo, FLAG), permitiendo su expresión en células y la posterior purificación con resinas conjugadas a anticuerpos anti-etiqueta de epítipo. Tomada de Low y cols. 2021²⁰¹.

Si bien la AP-MS ha sido muy utilizada para el estudio de las PPIs, posee algunas limitaciones importantes, ya que no permite capturar interacciones transitorias o débiles, y se pueden detectar interacciones entre proteínas luego de la lisis que no estaban en contacto en la célula. También, las proteínas unidas a la membrana son difíciles de recuperar en las condiciones de lisis suaves, necesarias para preservar las interacciones

XL-MS

El XL-MS es una técnica que se utiliza acoplada al AP-MS y que permite estabilizar PPIs previamente a su purificación. Esta técnica consiste en el entrecruzamiento químico de proteínas en su estado nativo, utilizando reactivos capaces de formar enlaces covalentes entre residuos de aminoácidos cercanos espacialmente (agentes entrecruzantes). Los agentes entrecruzantes suelen ser pequeñas moléculas bifuncionales con dos grupos reactivos separados por un espaciador. Las proteínas entrecruzadas se someten a proteólisis, y las mezclas de péptidos generadas se separan y analizan mediante LC-MS/MS (Figura 23). El análisis bioinformático de los datos obtenidos permite identificar

las secuencias de los péptidos entrecruzados y los sitios específicos de entrecruzamiento
198–201.

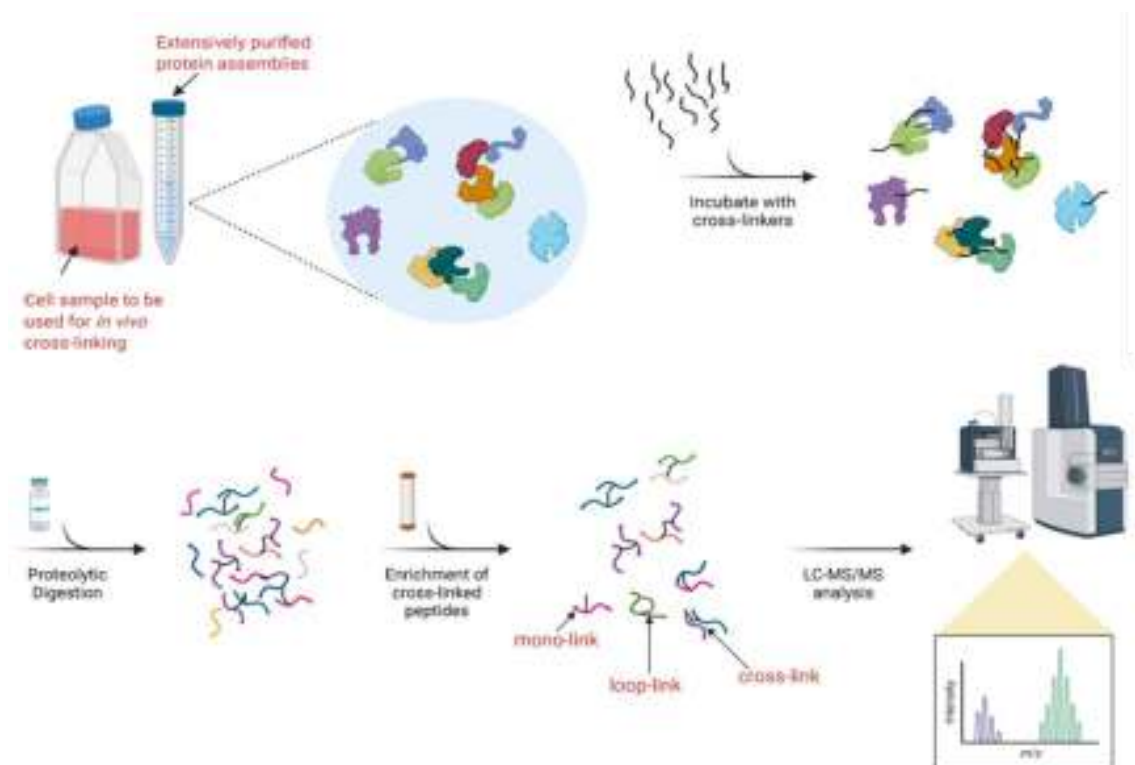


Figura 23: Flujo de trabajo de XL-MS. El entrecruzamiento químico puede realizarse in vitro, con complejos proteicos purificados, o in vivo, en células intactas. Tras la adición del agente entrecruzante, las proteínas se digieren en péptidos, generando principalmente tres tipos de péptidos modificados: mono (el entrecruzador se une a un único residuo del péptido), loop (ambos extremos del entrecruzador se enlazan a dos residuos del mismo péptido) y entrecruzados (el entrecruzador une residuos de dos péptidos distintos), además de péptidos no modificados. Dada esta heterogeneidad, la mezcla resultante se fracciona para enriquecer los péptidos entrecruzados, que luego se analizan por LC–MS/MS. Tomado de Low y cols. 2021²⁰¹.

Este enfoque es particularmente útil para preservar y analizar interacciones dinámicas o débiles, proporcionando información estructural y topológica en el contexto nativo de las proteínas^{198–201}. Además, permite estudiar complejos proteicos difíciles de solubilizar o asociados a membranas, ya que, una vez entrecruzadas las proteínas, se pueden usar condiciones más drásticas para favorecer la recuperación de interactores de membrana. A pesar de sus ventajas, XL-MS presenta limitaciones significativas, incluyendo una baja eficiencia de entrecruzamiento (~1–5%)^{201,207}, la complejidad inherente al análisis de datos y la necesidad de software especializado para interpretar los resultados. Además, los agentes entrecruzantes no siempre pueden entrar en las células y capturar las interacciones in vivo, y en su mayoría se usan para estudiar complejos relativamente simples e in vitro^{208–210}.

CF-MS

El CF-MS es una técnica que separa complejos proteicos mediante métodos cromatográficos o electroforéticos en condiciones no desnaturizantes, preservando las interacciones nativas antes de su análisis por MS. Cada fracción se somete luego a proteólisis, se analiza mediante LC-MS/MS, y se identifican y cuantifican sus componentes proteicos (Figura 24) ^{199,201}.

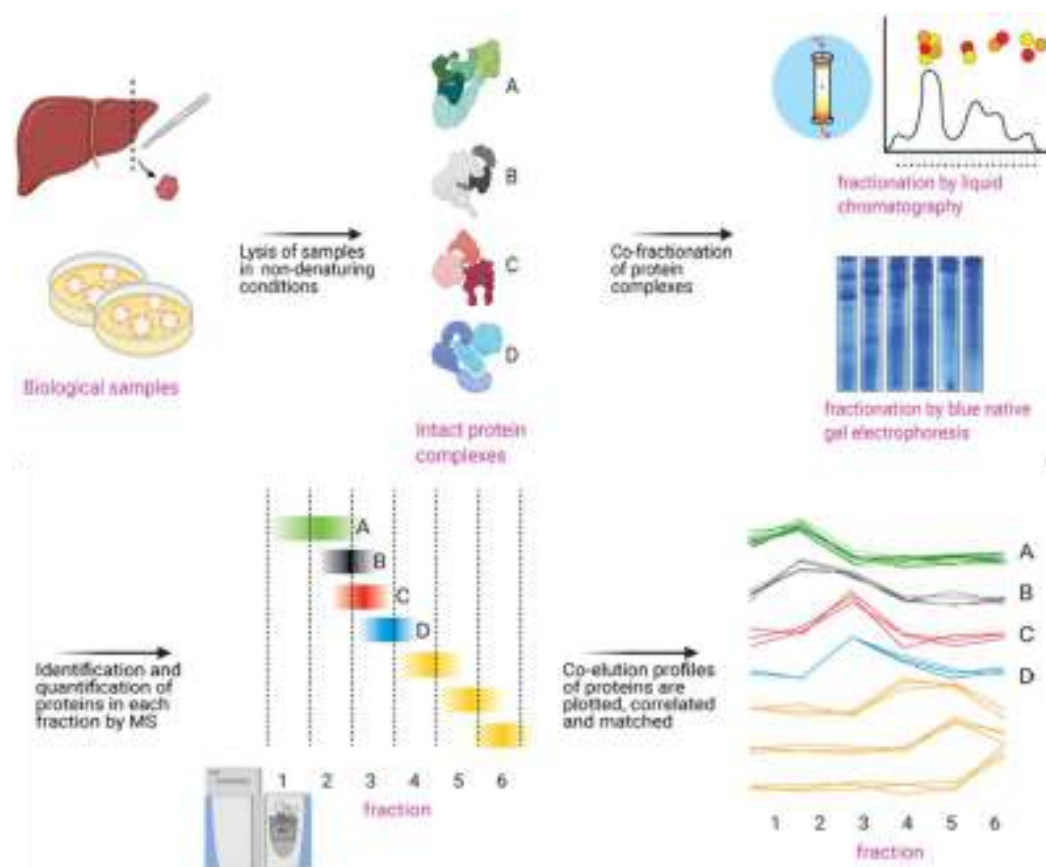


Figura 24: Flujo de trabajo de CF-MS. Las muestras se lisan en condiciones suaves para preservar la integridad de los complejos proteicos y se separan en condiciones nativas mediante cromatografía en columna o electroforesis en gel nativo. Cada fracción se analiza individualmente mediante LC-MS/MS cuantitativo tipo bottom-up. Con el apoyo de algoritmos computacionales especializados, se generan perfiles de co-migración que permiten reconstruir la red de interacciones proteicas. Tomada de Low y cols. 2021 ²⁰¹.

Existen diferentes técnicas de CF-MS como la cromatografía de exclusión por tamaño, la cual es una de las más usadas y separa proteínas según su tamaño molecular o volumen hidrodinámico ^{201,211}. También se pueden mencionar, la cromatografía de interacción hidrofóbica, que separa las moléculas según el grado de hidrofobicidad de su superficie; la cromatografía de intercambio iónico, que separa los complejos según su carga superficial neta; la ultracentrifugación en gradiente de densidad, que los separa en función de su densidad; y la electroforesis nativa, que mantiene las interacciones proteicas nativas

mientras separa los complejos principalmente según su tamaño ^{212–215}. La elección del método de fraccionamiento depende de las propiedades específicas de los complejos en estudio y de las preguntas de investigación que se buscan responder ^{199,201}.

En general esta metodología es particularmente útil para analizar múltiples complejos simultáneamente en condiciones fisiológicas ⁹⁶. Sin embargo, presenta limitaciones, como el estudio de interacciones solamente *in vitro* y la posibilidad de falsos positivos debido a co-eluciones azarosas, lo cual se pueden minimizar adoptando métodos de separación de alta resolución o combinando múltiples separaciones ortogonales, además de análisis bioinformáticos más rigurosos ^{198–201}.

LiP-MS

La LiP-MS es una técnica que analiza cambios estructurales inducidos por interacciones proteína-proteína o proteína-ligando mediante la digestión parcial de proteínas en condiciones nativas. Utiliza una digestión controlada con una proteasa no específica, como la proteínasa K, para generar fragmentos peptídicos que reflejan la accesibilidad superficial de las proteínas. Posteriormente, las muestras se digieren con tripsina y se analizan mediante LC-MS/MS para la identificación de péptidos, lo que proporciona información sobre cambios conformacionales de proteínas y sus interacciones en sistemas biológicos ²¹⁶. Entre sus principales ventajas se encuentra su capacidad para revelar alteraciones estructurales que otras técnicas podrían pasar por alto ²⁰³. Sin embargo, su aplicación requiere condiciones experimentales rigurosamente controladas, y la interpretación de datos puede ser compleja, especialmente en mezclas proteicas heterogéneas. También, esta técnica puede no ser apropiada para proteínas de membrana ^{198,199} (Figura 25).

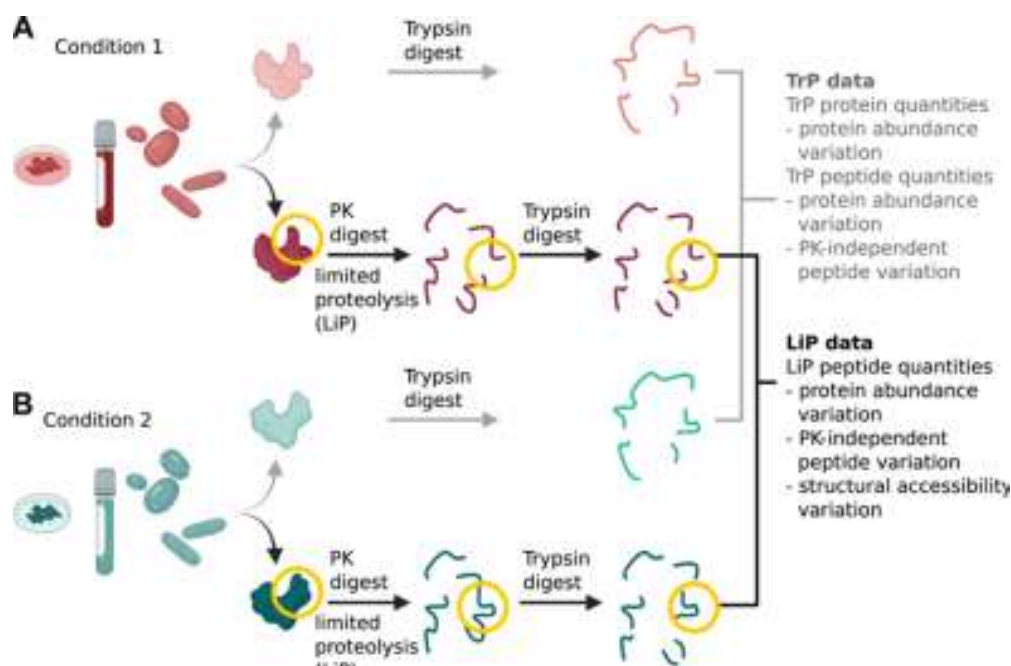


Figura 25: Flujo de trabajo de LiP-MS. Se preparan extractos de proteínas en condiciones nativas de las diferentes condiciones a comparar y se digiere con **(A)** tripsina solamente o **(B)** proteinasa K (tiempo corto, proteólisis limitada) seguida de tripsina. Las regiones con diferencias en la conformación tridimensional (amarillo) muestran un patrón de digestión distinto en el paso de proteólisis limitada. Posteriormente, las intensidades de LiP y TrP se cuantifican mediante MS. Tomada de Nagel y cols. 2025 ²¹⁷.

TPP

El TPP está basado en el ensayo de desplazamiento térmico celular (CETSA, del inglés cellular thermal shift assay) y es una técnica que mide cambios en la estabilidad térmica de las proteínas a nivel de proteoma mediante MS ^{218–220}. Se basa en que las proteínas al unirse a un ligando, ya sea un fármaco, un metabolito u otra proteína, pueden volverse más resistentes a la desnaturalización inducida por calor ²²¹. Tras aplicar un gradiente de temperatura a estas células o lisados (generalmente de TA a la temperatura de desnaturalización de las proteínas), las muestras se enfrían rápidamente para detener la desnaturalización, se procesan para recuperar las proteínas solubles y se analizan por MS para identificar cambios en su abundancia bajo distintas condiciones térmicas ²²² (Figura 26).

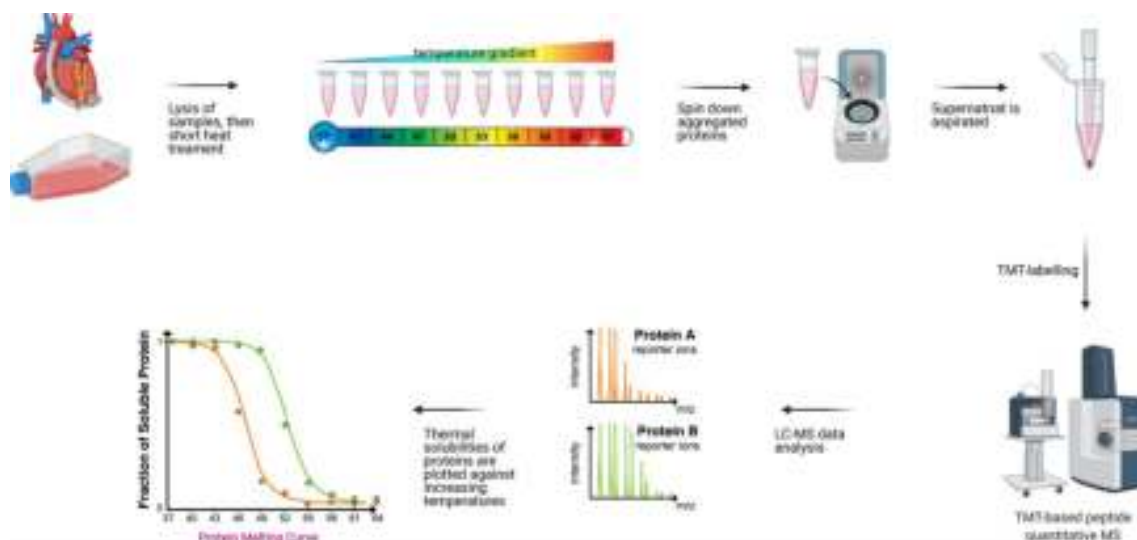


Figura 26: Las células intactas o los lisados celulares se someten a un gradiente de temperatura para inducir la desnaturalización. Tras la centrifugación, la fracción soluble se marca con reactivos TMT (del inglés, Tandem Mass Tag), compuestos isotópicamente marcados que permiten la cuantificación simultánea de múltiples muestras en un único experimento. Las muestras se analizan posteriormente por LC-MS/MS y se generan curvas de fusión que reflejan la estabilidad térmica y dinámica de complejos. Tomada de Low y cols. 2021 ²⁰¹.

Varios estudios han demostrado el uso de TPP para detectar PPIs. Por ejemplo, se ha observado que los miembros de un complejo proteico tienden a mostrar curvas de fusión térmica similares, un fenómeno denominado (TPCA, del inglés, thermal proximity coaggregation), que ha sido usado para seguir la dinámica de complejos en células vivas ^{218–220} (Figura 26). Asimismo, se han empleado KO genéticos para evidenciar cómo la ausencia de un miembro de un complejo desestabiliza térmicamente a los demás ²¹⁸.

TPP permite estudiar la estabilidad térmica de miles de proteínas en paralelo y directamente en células vivas, sin necesidad de modificar ni marcar los compuestos. Esto lo hace único para mapear tanto interacciones proteína-fármaco como proteína-proteína, capturando incluso interacciones débiles o transitorias que otros métodos no detectan bien. Sin embargo, TPP no mide la interacción directa, sino un cambio en la curva de fusión térmica. Esto significa que la estabilización/desestabilización puede deberse a un ligando, pero también a metabolitos, PTM o interacciones indirectas a través de terceros interactores. Por eso, los resultados requieren análisis estadístico sofisticado y validación con métodos complementarios ^{223,224}.

3.4.1 Estrategia de marcado por proximidad acoplada a espectrometría de masas

Como vimos anteriormente, las interacciones transitorias, débiles o de baja abundancia, y principalmente aquellas que involucran proteínas de membrana, son difíciles de detectar mediante técnicas tradicionales como la AP-MS. Estas limitaciones han impulsado el desarrollo de las tecnologías de PL-MS ²²⁵, que combinan herramientas de biología molecular y bioquímica para etiquetar químicamente proteínas cercanas en células vivas, permitiendo la detección de interacciones que no son detectables usando otros métodos interactómicos convencionales. Dentro de ella la más utilizada es la biotinylation dependiente de proximidad acoplada a MS ^{201,226}.

Esta metodología consiste en expresar una proteína cebo, fusionada con una enzima de etiquetado ingenierizada, como una ligasa de biotina o una peroxidasa. Las células que expresan estas proteínas de fusión se incuban con sustratos específicos de cada enzima, los cuales generan intermediarios reactivos que introducen de manera covalente un grupo biotinylo en proteínas localizadas dentro de un radio de 10-20 nm de la enzima ^{199,227}. Las proteínas biotinyladas posteriormente se purifican mediante perlas conjugadas con estreptavidina, avidina o neutravidina. Tras lavados rigurosos para eliminar uniones inespecíficas, las proteínas biotinyladas se eluyen, se digieren enzimáticamente y se analizan por LC-MS/MS ^{199,226,228} (Figura 27).

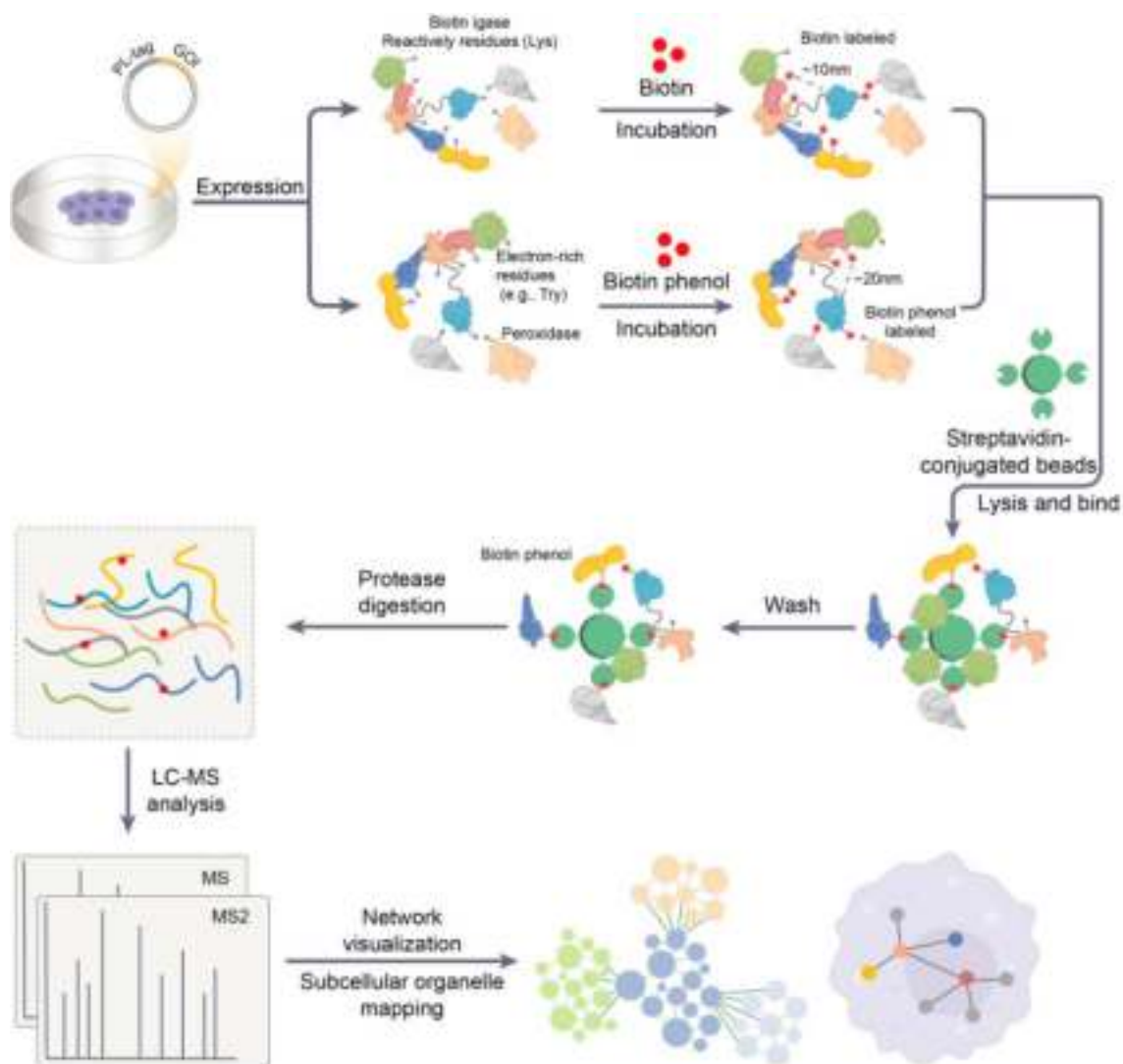


Figura 27: Flujo de trabajo de PL-MS. La proteína cebo se fusiona a una enzima ingenierizada, ligasas de biotina o peroxidasas, capaz de biotinilar inespecíficamente proteínas cercanas. Tras la incorporación del sustrato (biotina o fenol biotina), la enzima lo convierte en intermediarios reactivos que biotinilan covalentemente residuos cercanos (Lys en el caso de las ligasas de biotina y Tyr en el caso de peroxidasas) dentro de un radio aproximado de 10–20 nm. La reacción se detiene mediante lisis desnaturante o por agentes de quenching, y las proteínas biotiniladas se enriquecen con perlas de estreptavidina. Finalmente, se digieren y analizan por LC-MS/MS para identificar proteínas proximales, mapear redes de interacción y localizar el cebo en su contexto subcelular. Tomada de Wu y cols. 2024 ¹⁹⁹.

En este punto, una limitación frecuente de los enfoques clásicos de PL-MS es que las proteínas vecinas se identifican fundamentalmente en base a péptidos nativos, y rara vez se detectan los péptidos biotinilados. Para superar este obstáculo se han desarrollado metodologías específicas como DiDBiT (del inglés, Direct Detection of Biotinylated Proteins by Mass Spectrometry) y BioSITE (del inglés, Biotinylation Site Identification Technology). Ambas se basan en la digestión previa y el enriquecimiento de péptidos (y no de proteínas como en las metodologías más ampliamente utilizadas). Esto permite la detección directa de péptidos biotinilados mediante LC-MS/MS, aunque ambas

estrategias difieren en el paso de enriquecimiento: DiDBiT emplea la captura de péptidos digeridos con Neutravidina, mientras que BioSITE utiliza anticuerpos anti-biotina tras la digestión proteica. Estos enfoques han demostrado aumentar significativamente el número de sitios de biotinilación identificados, lo que permite identificar de forma mucho más confiable los interactores y facilita la cuantificación y el mapeo preciso de interacciones dependientes de proximidad ^{229,230}.

El análisis bioinformático de los datos es fundamental para identificar las proteínas cercanas al cebo y generar redes de interacción conocidas como proteomas proximales. Estas redes incluyen, no sólo el interactoma, sino también proteínas adyacentes que pueden ser relevantes para entender su contexto funcional ¹⁹⁹.

Un aspecto central de estas técnicas es que el etiquetado depende de la proximidad, las proteínas más cercanas al cebo son preferentemente etiquetadas y la intensidad del etiquetado disminuye con la distancia, definiendo un "radio efectivo de etiquetado" que abarca tanto contactos físicos reales del cebo como proteínas que se encuentran en su vecindad inmediata ²³¹.

La eficacia de los estudios basados en PL-MS requiere un diseño experimental meticuloso. Es fundamental optimizar tanto la elección de la enzima de etiquetado como las condiciones del proceso, ajustando cuidadosamente la duración del etiquetado y la concentración de sustratos para maximizar la identificación de interacciones reales y minimizar los falsos positivos. Además, es crucial que los niveles de expresión de la proteína de fusión (cebo-enzima) se mantengan lo más cercanos posible a las condiciones fisiológicas, a fin de evitar resultados artefactuales. La inclusión de controles rigurosos, permite establecer una línea base de etiquetado inespecífico y diferenciar las interacciones reales dependientes de la proximidad de los eventos de etiquetado de fondo ^{199,226}.

Desde la introducción del primer enfoque de PL-MS, han surgido un número creciente de enzimas ingenierizadas, que como ya mencionamos, en su mayoría se agrupan en dos categorías principales: las ligasas de biotina y las peroxidasas.

Ligasas de biotina

Uno de los métodos pioneros y más usados de PL-MS, es la identificación dependiente de biotinilación (BioID, del inglés, Proximity-Dependent Biotin Identification). BioID, desarrollado en 2012 por Roux y cols., utiliza una versión mutada de la ligasa de biotina BirA de *Escherichia coli*, denominada BirA* (BirA Arg118G) ²³². Las ligasas de biotina catalizan la biotinilación de las carboxilasas dependientes de biotina con gran especificidad. El mecanismo de reacción involucra inicialmente la formación de un intermediario a partir de los sustratos biotina y ATP: biotinil 5' AMP. Posteriormente la biotina es transferida a un residuo de Lys específico de las carboxilasas dependiente de biotina y finalmente la proteína biotinilada es liberada del sitio activo. Un residuo de Arginina conservado de las ligasas de biotina (Arg118 en BirA) es fundamental para estabilizar la interacción del intermediario biotinil 5' AMP en el sitio activo de la enzima. La sustitución de este residuo por una Gly en la proteína ingenierizada BirA* provoca un aumento de 400 veces en la velocidad de disociación de biotinil 5' AMP, el cual es liberado del sitio activo y genera una nube de intermediarios altamente reactivos que etiqueta de forma inespecífica y covalente residuos de Lys en proteínas situadas dentro de un radio estimado de 10 nm ^{232,233}. Desde su introducción, la estrategia BioID ha sido ampliamente utilizada para mapear los proteomas de regiones subcelulares y organelos ^{234,235}, incluidos aquellos que involucran estructuras insolubles o de baja abundancia, como por ejemplo el retículo endoplásmico ²³⁶. También ha sido clave en investigaciones relacionadas con infecciones virales, como las interacciones proteína-huésped del SARS-CoV-2 ²³⁷. Sin embargo, BioID tiene limitaciones, como su tamaño (~35 kDa) ²³⁸, que puede interferir en la función de la proteína de interés, y su cinética lenta, que requiere hasta 18-24 horas para generar señales suficientes, lo que puede llevar a un etiquetado inespecífico y limitar su uso en estudios dinámicos ¹⁹⁸.

Para superar estas restricciones, se han desarrollado variantes a lo largo de los años, con tamaños más pequeños y cinéticas de etiquetado más rápidas. Una de ellas es BioID2, otra ligasa de biotina, pero derivada de *Aquifex aeolicus*, con la mutación Arg40G antes descrita, y un peso molecular más pequeño de 27 kDa, que le permite una biotinilación más eficiente ²³⁹. Recientemente, se desarrollaron las estrategias UltraID y MicroID, que se basan también ligasas de biotina derivadas de *Aquifex aeolicus*, pero las mismas son

más pequeñas aún y tienen actividades de etiquetado mucho más rápidas en comparación con BioID2 ²⁴⁰.

Además, se desarrollaron TurboID y miniTurbo, basadas en BirA modificada mediante ingeniería dirigida y ambas permiten una biotinilación rápida en menos de 10 minutos ²⁴¹. TurboID, con 15 mutaciones respecto a BirA*, tiene una afinidad mejorada por la biotina y mayor actividad en compartimentos como el lumen del retículo endoplásmico ²⁴². Aunque es altamente activa, esta enzima puede generar etiquetado inespecífico. Además, TurboID ha sido utilizado en modelos vivos, como la caracterización del proteoma cardíaco mediante CRISPR-Cas9, y en la creación de un atlas del secretoma en ratones, demostrando su potencial en aplicaciones biomédicas avanzadas ²⁴². Por su parte, miniTurbo, con un tamaño más pequeño (28 kDa) y 13 mutaciones, es menos activa pero ofrece un control temporal más preciso ²⁴³.

Split-BioID ²³¹ y Split-TurboID ²⁴⁴ son enfoques innovadores en los que las enzimas se dividen en dos fragmentos inactivos que se reensamblan en la célula sólo cuando las proteínas fusionadas interactúan entre sí o se aproximan en contactos organelo-organelo. De esta manera, el etiquetado dependiente de proximidad se activa exclusivamente en el contexto de la interacción, lo que constituye su principal ventaja frente a los sistemas constitutivos y reduce de manera significativa la biotinilación inespecífica.

Por otro lado, ProtA-TurboID, fue desarrollado en 2021 por Santos-Barriopedro y cols ²⁴⁵, y combina TurboID con Proteína A, lo que permite su uso en células permeabilizadas o no permeabilizadas sin necesidad de manipulación genética. Esta técnica emplea anticuerpos específicos para biotinilar proteínas cercanas al antígeno y facilita el análisis de interacciones proximales mediante MS.

BASU, derivada de *Bacillus subtilis*, es una ligasa de 29 kDa con una cinética 1000 veces más rápida y una relación señal-ruido 30 veces mayor que BirA*. Este avance ha permitido identificar proteínas asociadas a marcas de histonas específicas mediante el método ChromID, desarrollado en 2020 por Villaseñor y cols ²⁴⁶. Este enfoque combina BASU con lectores de cromatina diseñados (eCRs) para estudiar marcas de histonas individuales.

AirID, introducida por Kido y cols en 2020, es una enzima desarrollada mediante reconstrucción metagenómica que ofrece etiquetado específico con menor toxicidad ²⁴⁷.

Recientemente, se ha desarrollado LOV-Turbo, una variante de TurboID controlada por luz. Esta enzima, activada por luz azul de baja potencia, permite un control temporal preciso y reduce el etiquetado inespecífico, mejorando la especificidad en estudios dinámicos ²⁴⁸.

La siguiente tabla resume las principales enzimas utilizadas y sus características.

Tabla 1: Ligasas de biotina

Enzima / Variante	Origen / ingeniería	Tamaño aproximado	Cinética (tiempo típico)	Variante “split”	Ventajas principales	Limitaciones principales
BioID (BirA* R118G)	E. coli BirA mutante	~35 kDa	Lenta (~12–24 h)	Split-BioID	Robusta, poco tóxica, útil para interacciones estables; funciona en múltiples sistemas.	Tiempo de incubación muy largo; bajo rendimiento de marcaje; genera alto background.
BioID2	Aquifex aeolicus BirA truncada	~27 kDa	Horas (más rápida que BioID)	—	Más pequeña; menor requerimiento de biotina; menos interferencia estructural con la proteína fusionada.	Aún relativamente lenta; menor eficiencia que TurboID.
TurboID	Evolución dirigida de BirA	~35 kDa	Rápida (~10–60 min)	Split-TurboID	Alta eficiencia; rápida; funciona en células vivas, animales y plantas.	Alto background si no se controla el tiempo; elevado consumo de biotina; posible toxicidad.
miniTurbo	Variante compacta de TurboID	~28 kDa	Rápida (~10–60 min)	—	Más pequeña; menor background que TurboID; útil en proteínas sensibles.	Menor eficiencia de marcaje que TurboID completo.
BASU	BirA* de B. subtilis	~28 kDa	Muy rápida (~1–5 min)	—	Extremadamente rápida; alta señal/ruido en sistemas de ARN (RaPID).	Uso poco extendido; validación limitada en mamíferos.
ProtA-TurboID	Fusión de Protein A a TurboID	~55–60 kDa	Rápida (~10–60 min)	—	Permite usar anticuerpos para dirigir TurboID a proteínas endógenas; útil en células primarias/tejidos.	Tamaño grande; depende de anticuerpos de alta calidad; riesgo de inespecificidad.
AirID	BirA ancestral reconstruida	~34 kDa	Rápida (≤1 h)	—	Buen desempeño en células de mamíferos y plantas; menos biotinylation inespecífica.	Actividad moderada; menos adoptada y caracterizada que TurboID.
LOV-Turbo	TurboID acoplado a dominio fotosensible	~45 kDa	Rápida tras activación lumínica (~10–30 min)	—	Control temporal de la biotinylation con luz azul; útil para interacciones	Requiere fuente de luz azul; riesgo de fototoxicidad; background si hay

	LOV				dinámicas.	exposición lumínica no controlada.
--	-----	--	--	--	------------	------------------------------------

Peroxidasas

Las peroxidasas son enzimas que han sido usadas como herramientas esenciales en las metodologías de etiquetado por proximidad, debido a su capacidad para generar radicales reactivos en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas enzimas catalizan la oxidación de sustratos, como fenol biotina (FB), generando radicales biotina fenoxilo de corta duración ²⁴⁹, que reaccionan covalentemente, principalmente con residuos de Tyr y Trp de proteínas cercanas ^{250,251}. Este principio permite estudiar la composición proteica en compartimentos subcelulares con alta especificidad espacial y explorar PPIs transitorias o dinámicas ²⁵². Entre las peroxidasas más utilizadas en este contexto están la peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés, horseradish peroxidase), la ascorbato peroxidasa ingenierizada (APEX, del inglés, ascorbate peroxidase) y su versión mejorada APEX2. Aunque comparten el mismo fundamento catalítico, cada una presenta características, ventajas y limitaciones únicas que las hacen adecuadas para diferentes aplicaciones experimentales ²⁰⁰.

HRP

La HRP fue pionera en el etiquetado por proximidad, mostrando su capacidad para transformar reactivos como aril azida-biotina en radicales reactivos en presencia de H_2O_2 ²⁵³. Estos radicales reaccionan con aminoácidos ricos en electrones como Tyr, His, Trp y Cys, permitiendo la biotinilación covalente de proteínas vecinas.

A pesar de su versatilidad, el uso de HRP presenta ciertas limitaciones. La enzima es sensible a condiciones reductoras y puede desnaturalizarse en ambientes ácidos, lo que restringe su utilidad en compartimentos intracelulares como el citosol, núcleo y mitocondrias. Además, el etiquetado en células vivas puede ser menos eficiente debido a estas restricciones ²⁴³. No obstante, HRP sigue siendo una herramienta valiosa para explorar la composición proteica de entornos específicos, como las membranas celulares, y para llevar a cabo análisis en tejidos fijados, donde su estabilidad es menos problemática ²⁵⁴.

APEX y APEX2

APEX es una ascorbato peroxidasa diseñada, derivada del guisante, que fue presentada por primera vez en 2012^{251,255}. Tras la adición de H_2O_2 , APEX cataliza la conversión de FB en un radical biotinil-fenoxilo. Este radical, con una vida extremadamente corta de menos de 1 ms, puede reaccionar con residuos de aminoácidos ricos en electrones, como Tyr y Trp, en proteínas que se encuentran en las cercanías de la enzima (Figura 28)^{251,256}.

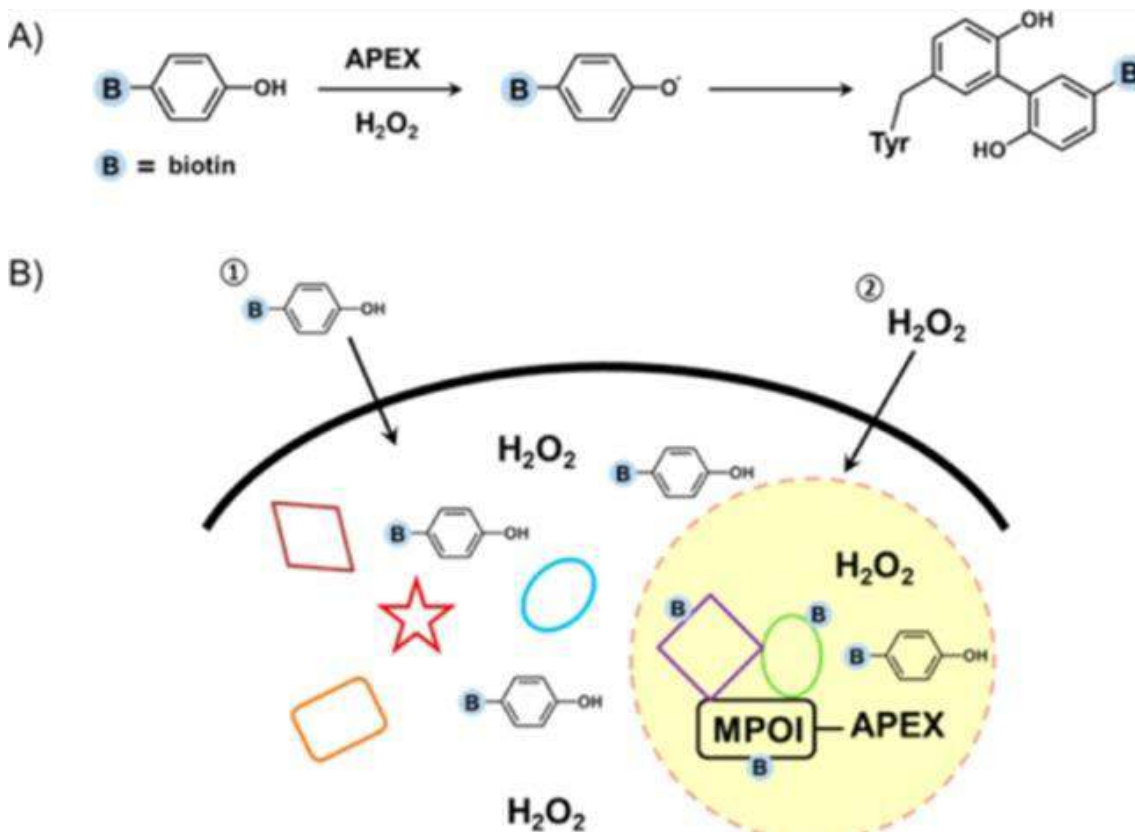


Figura 28: Esquema de la estrategia APEX para identificar interacciones proteína-proteína. **A)** El sustrato FB es oxidado por APEX en presencia de H_2O_2 , generando radicales fenoxilo muy reactivos que reaccionan covalentemente con residuos aromáticos cercanos. **B)** Al fusionar la proteína de interés con APEX, e incubar las células que la expresan con FB y H_2O_2 se produce una rápida marcación del entorno proteómico de la proteína de interés. Las proteínas biotinizadas se aíslan mediante estreptavidina y se identifican por nano LC-MS/MS. Tomada de Chu y cols. 2017²⁵⁶.

Una de las características más notables de APEX es su capacidad para completar el etiquetado en tiempos tan breves como un minuto. Esta alta velocidad hace que sea particularmente adecuada para analizar PPIs transitorias o eventos dinámicos relacionados con procesos de señalización celular. Además, APEX se distingue de otras peroxidasas como HRP porque no posee sitios de unión al calcio ni enlaces disulfuro, lo

que resulta en una proteína de menor masa molecular (28 kDa) y mayor actividad enzimática en su forma monomérica.

El proceso de etiquetado por APEX implica la reacción de los radicales biotinil-fenoxilo con proteínas vecinas (mayoritariamente en residuos de Tyr), generando aductos covalentes estables. Tras el etiquetado, las proteínas biotiniladas se enriquecen mediante perlas magnéticas unidas a estreptavidina, lo que facilita su análisis mediante MS. Este método ha sido crucial para revelar composiciones proteicas específicas en diferentes compartimentos celulares. Por ejemplo, se ha empleado con éxito para caracterizar la matriz mitocondrial humana, el proteoma del espacio intermembrana y la topología del transportador de calcio mitocondrial. Estas aplicaciones destacan el potencial de APEX para el mapeo proteico subcelular y la identificación de interacciones moleculares en sistemas biológicos complejos ^{250,251,255}.

No obstante, APEX presenta ciertas limitaciones como que su dependencia de H₂O₂ puede provocar efectos adversos en vías sensibles al estado redox y causar estrés celular ²⁵⁷. Para superar estas limitaciones, Lam y cols llevaron a cabo una evolución dirigida de la enzima y seleccionaron mutantes de APEX con mayor actividad catalítica ²⁵⁴, con capacidad para tolerar concentraciones más altas de H₂O₂ y con mayor estabilidad térmica. Además, su actividad de biotinilación fue efectiva incluso cuando se expresa en niveles bajos ²⁵⁸.

Además de FB, APEX2 puede utilizar otros sustratos, como biotina-anilina, biotina-naftilamina o alquin-fenol, lo que amplía su versatilidad experimental. Sin embargo, aunque estos sustratos tienen propiedades diferentes que podrían ser ventajosas en ciertas aplicaciones, su uso en condiciones subcelulares específicas aún requiere más estudio ^{259,260}.

Comparada con APEX, APEX2 muestra mejoras significativas en su eficiencia enzimática y precisión en el etiquetado, lo que explica su creciente aplicación en PL-MS ^{258,261}.

La siguiente tabla resume las principales peroxidasas y sus características.

Tabla 2: Peroxidasas

Enzima / Variante	Origen / ingeniería	Tamaño aproximado	Cinética (tiempo típico)	Ventajas principales	Limitaciones principales
HRP (peroxidasa de rábano)	Enzima vegetal nativa	~44 kDa	Rápida (segundos–minutos) en superficie	Alta actividad; etiquetado muy localizado; útil en membranas y tejidos fijados.	Inactiva/ineficiente en medios reductores (citoplasma, núcleo, mitocondria); sensible a pH ácido; requiere acceso extracelular del sustrato; limitada principalmente a superficie o muestras fijadas.
APEX	Ascorbato peroxidasa vegetal (ingenierizada)	~28 kDa	Muy rápida (~1 min)	Funciona en compartimentos intracelulares (citoplasma/organelos); alta resolución temporal; compatible con biología estructural y MS.	Requiere H ₂ O ₂ (riesgo de estrés/artefactos redox); ventana temporal debe controlarse estrictamente; menor estabilidad que APEX2.
APEX2	APEX optimizada por evolución dirigida	~28 kDa	Muy rápida (~1 min)	Mayor estabilidad en condiciones reductoras y tolerancia a H ₂ O ₂ moderado; útil incluso con baja expresión; admite sustratos alternativos (biotina-anilina, alquín-fenol).	Dependencia de H ₂ O ₂ ; requiere quenching y control estricto de tiempos; posible biotilación inespecífica si se prolonga la reacción.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El estado actual del conocimiento indica que la división celular en los *Mycobacteriales* es un proceso que presenta diferencias significativas respecto a los bacilos clásicos más estudiados, tanto en la composición del divisoma como en la regulación de la división celular. En particular, muchas de las proteínas que cumplen funciones clave en el divisoma de *E. coli* y *B. subtilis* no están presentes en los *Mycobacteriales*, donde además existen evidencias sólidas de la regulación de este proceso esencial mediante la fosforilación de proteínas.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la exploración del ambiente proteómico en torno a la proteína central del divisoma, FtsZ, en células vivas y con distintos estados de fosforilación; nos permitirá identificar nuevas proteínas implicadas en la división celular de los *Mycobacteriales*, así como una mejor caracterización del rol de la fosforilación de proteínas en el ensamblado del divisoma.

El objetivo general del trabajo es identificar nuevas proteínas del divisoma de los *Mycobacteriales* y caracterizar el efecto de la fosforilación de proteínas sobre su incorporación a este complejo, utilizando estrategias de proteómica de proximidad en células vivas.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar y validar una estrategia de marcado por proximidad en las células vivas en *C. glutamicum*.
2. Identificar proteínas vecinas de FtsZ en *C. glutamicum*.
3. Validar la localización subcelular de las proteínas candidatas.
4. Explorar el rol de la fosforilación sobre el proteoma de proximidad de FtsZ en *C. glutamicum*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas bacterianas

Para la obtención de la cepa *C.glu_apex2_ftsZ*, células electrocompetentes de *C. glutamicum* ATCC 13032 se transformaron con el plásmido pTGR5 conteniendo la región codificante del gen *ftsZ* de *C. glutamicum* (cgl2155). A esta secuencia se adicionó en el extremo N terminal la secuencia de APEX2¹⁵⁵ y se fusionó a dos etiquetas: el epítipo FLAG (epítipo de 8 aminoácidos DYKDDDDK) e Histag (6 residuos de Histidina); lo cual permitió la posterior purificación de la proteína FtsZ. La expresión de esta construcción es regulada finamente por un promotor inducible de baja actividad transcripcional PgntK²⁶², reprimido por sacarosa e inducido por gluconato¹⁵⁵. Como cepas controles se emplearon: *C. glutamicum* ATCC 13032 (denominada *C.glu* en este trabajo) y *C.glu_apex2*. Esta última fue obtenida de forma similar a la descrita para la cepa *C.glu_apex2_ftsZ*, utilizando el plásmido con la secuencia de APEX2 y las etiquetas FLAG e Histag. Estas cepas se obtuvieron en colaboración con la Unidad de Microbiología Estructural del Institut Pasteur de París, Francia.

Para la obtención de las cepas que sobreexpresan cada uno de los 7 candidatos seleccionados como interactores de FtsZ y su validación, células electrocompetentes de *C. glutamicum* ATCC 13032 se transformaron con el plásmido pTGR5 conteniendo la región codificante de uno de los siguientes genes; cgl2198 (Q8NNK0), cgl0298 (Q8NTK9), cgl1266 (Q8NR01), cgl2374 (Q8NN39), cgl2839 (Q8NLU7), cgl2210 (Q8NNI9) y cgl2990 (Q8NLF2) de *C. glutamicum*. Estas secuencias se fusionaron a la secuencia de la proteína verde fluorescente mNeon para evaluar su localización subcelular por microscopía y a Histag. Estas cepas se denominan en el presente trabajo como *C.glu_mNeon_nombre del gen (cgl...)*.

Para obtener la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* KO para *pknA* en *C. glutamicum* (*C.glu_ΔpknA_apex2-ftsZ*), células electrocompetentes de la cepa *C. glutamicum* KO para *pknA* (*C.glu_ΔpknA*), cedida por el Dr. Bott (Forschungszentrum, Jülich, Germany)¹⁷⁴; se transformaron con el mismo plásmido utilizado para transformar la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*.

5.1.1 Obtención y clonado de las cepas bacterianas

5.1.1.1 Amplificación de los genes de interés por PCR

Para la obtención y el clonado de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo, primeramente, se procedió a la amplificación de los genes de interés mediante una PCR (del inglés, polymerase chain reaction). Se utilizó la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530, New England Biolabs) siguiendo el protocolo y las recomendaciones indicadas por el proveedor. El volumen final de reacción fue de 20 μ l, y la composición de la mezcla se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3: Componentes empleados en la PCR

Components	20 μ l Reaction	Final Concentration
Nuclease-free water	to 20 μ l	
5X Phusion HF	4 μ l	1X
10 mM dNTPs	0.4 μ l	200 μ M
10 μ M Forward Primer	1 μ l	0.5 μ M
10 μ M Reverse Primer	1 μ l	0.5 μ M
Template DNA	1 μ l	<250 ng
DMSO	0.6 μ l	<3%
Phusion DNA Polymerase	0.2 μ l	1.0 units/50 μ l PCR

Los oligonucleótidos cebadores se diseñaron con el software Benchling (Benchling Inc.) y se compraron en Eurofins liofilizados. Las secuencias, así como los ADN moldes empleados, se detallan en la Tabla 4. Los oligonucleótidos se resuspendieron en agua libre de nucleasas (Invitrogen) para obtener un stock de concentración final de 100 μ M y se mantuvieron con rotación durante 1 hora para favorecer su completa disolución. Posteriormente, se diluyeron hasta una concentración de trabajo de 10 μ M, según las recomendaciones del fabricante.

Tabla 4: Oligonucleótidos y moldes utilizados

Insert	Construct name	Plasmid	Primer	Sequence	Template
Cgl1266	mNeon-Cgl1266	pUMS_201	Primer Forward	TGTACAAGGGATCTGGCTCAACTGA TAACTCGCGAAATTCAAATCAGAAT TTTG	gDNA
			Primer Reverse	CGGTACCTTAAGCGGCCGCTCTACG CGATTGGGTTACACCCC	
Cgl2198	mNeon-Cgl2198	pUMS_192	Primer Forward	TGTACAAGGGATCTGGCTCAGTGTG CACCCCTATTCCCCGATTG	gDNA
			Primer Reverse	CGGTACCTTAAGCGGCCGCTCTAGA CTTCAGCACCAATTTCAACGCG	
Cgl0298	mNeon-Cgl0298	pUMS_208	Primer Forward	TGTACAAGGGATCTGGCTCAGTGAG CAACAAAGACGGCCTTTTAC	gDNA
			Primer Reverse	CGGTACCTTAAGCGGCCGCTTTAGT GGTCGCCAGTGATGGC	
Cgl2210	mNeon_C gl2210	pUMS_268	Primer Forward	TGTACAAGGGATCTGGCTCAGCAG ACGCGAAAAAGCAGGC	gDNA
			Primer Reverse	CGGTACCTTAAGCGGCCGCTTTAAG CCTCGCCCTTGCGTT	
Cgl2990	mNeon_C gl2990	pUMS_285	Primer Forward	TGTACAAGGGATCTGGCTCAATGCC TGCAAAGGAGGACAA	gDNA
			Primer Reverse	CGGTACCTTAAGCGGCCGCTTTAGT GCCCCAAGATGGACA	
Cgl2374	mNeon_C gl2374	pUMS_286	Primer Forward	TGTACAAGGGATCTGGCTCAATGA GCAAGCGTGAAGAATC	gDNA
			Primer Reverse	CGGTACCTTAAGCGGCCGCTTTAGC TGTGCTGCGTGGTAA	
Cgl2839	mNeon_C gl2839	pUMS_287	Primer Forward	TGTACAAGGGATCTGGCTCAATGGG CGAACAATTTCCAGG	gDNA
			Primer Reverse	CGGTACCTTAAGCGGCCGCTCTATT TGTTCTTCTTCCAGGGC	
Vector	pTGR-PgntK-mNeon		Primer Forward	AGCGGCCGCTTAAGGTAC	pUMS_8 2
			Primer Reverse	TGAGCCAGATCCCTTGTACAGTTCA TCCATGCCCATC	

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador (Matercycler epgradient S, Eppendorf) bajo las siguientes condiciones:

Tabla 5: Condiciones del termociclador

Step	Temperature	Time		
Hot Start	Yes			
Initial denaturation	95 °C	2 min		
Denaturation	95 °C	15 seg	Cycles	30 X
Annealing	60-65 °C	20 seg		
Elongation	72 °C	3 min		
Final Elongation	72 °C	3 min		
Cool down	4 °C	min		

Los productos de PCR se purificaron directamente desde el tubo de reacción utilizando el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo del proveedor.

5.1.1.2 Visualización de los fragmentos amplificados por electroforesis

La visualización de los fragmentos amplificados y clonados se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p/v) preparados en tampón TAE 1X (a partir de solución stock TAE 50X, Euromedex). De cada muestra, se cargaron 8 µl mezclados con 2 µl de buffer de carga (Thermo Fisher Scientific) y el marcador de peso molecular correspondiente (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, rango: 250-10000 pb). La tinción se efectuó con 10 µl SYBR Safe DNA Gel Stain (concentración 1X, Invitogen). La corrida se realizó a 80–100 V hasta que el frente de migración alcanzó aproximadamente el 70–80% de la longitud del gel (aproximadamente 15–30 minutos a 100 V). La visualización y adquisición de las imágenes se efectuaron con el sistema ChemiDoc (modelo MP, BioRad).

5.1.1.3 Unión de los fragmentos de ADN por la reacción de Gibson

Los fragmentos amplificados y purificados se ensamblaron mediante Gibson Assembly utilizando el kit comercial (New England Biolabs). Las mezclas de reacción se incubaron en termociclador a 50 °C durante 1 hora. Posteriormente, se adicionaron 0.5 µl de la enzima DpnI (New England Biolabs, 20000 units/ml) y se incubaron 30 minutos a 37 °C para eliminar el ADN molde no digerido. Un volumen de 5 µl de la mezcla de ensamblaje se utilizó para transformar células quimiocompetentes CopyCutter (Lucigen). La transformación se realizó incubando las células en hielo durante 30 minutos, seguido de un choque térmico a 42 °C por 30 segundos y una nueva incubación en hielo por 1 min 30 s. Luego se añadieron 900 µl de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación durante 1 hora. Las células se centrifugaron y el sobrenadante se eliminó, dejando aproximadamente 100 µl de medio para resuspender el pellet. Finalmente, se sembraron en placas LB suplementadas con kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron a 37 °C.

5.1.1.4 Evaluación de la efectividad de las colonias crecidas por PCR de colonias y electroforesis

A partir de las placas de transformación, se seleccionaron colonias individuales utilizando pipetas P2. Con la misma punta se realizó un pase sobre una placa LB para conservar el

clon y, posteriormente, se inoculó en un tubo de PCR. Se numeraron las colonias para su identificación posterior. Se analizaron entre 3 y 10 colonias por ensayo. Como controles de PCR de colonias se emplearon el vector con inserto y el vector sin inserto. Se preparó la mezcla de PCR y se distribuyeron 10 µl en cada tubo. El programa de PCR se realizó bajo condiciones previamente optimizadas. Los productos se analizaron mediante geles de agarosa como se describió en el acápite 5.1.1.2.

5.1.1.5 Purificación y secuenciación de colonias positivas

Las colonias positivas se cultivaron y el ADN plasmídico se purificó mediante minipreparaciones (QIAprep spin Miniprep Kit, Qiagen). Las muestras se secuenciaron (Eurofins), empleando los cebadores apropiados para la verificación de la inserción.

5.1.1.5 Obtención de células electrocompetentes de *Corynebacterium glutamicum*

Para la obtención de células competentes de *Corynebacterium glutamicum*, se seleccionó una única colonia y se cultivó toda la noche (ON, del inglés, Over Night) en 4 ml de medio BHI suplementado con sorbitol (0.9%) y glucosa (1%) (BHI-SG) a 30 °C. A partir de 1 ml de este precultivo, se inocularon 100 ml de BHI-SG suplementado con Tween-80 al 0.1% y glicina al 0.4%. Las células se incubaron a 30 °C hasta alcanzar una Densidad Óptica (DO) 600 nm de 1 (aproximadamente de 6 a 7 h). Una vez alcanzada la DO deseada, las células se enfriaron en hielo durante 20 min y se recolectaron por centrifugación a 2600 g y 4 °C durante 10 min. Posteriormente, el sedimento celular se lavó dos veces con un volumen total de 100 ml de glicerol al 10%, resuspendiendo cuidadosamente el sedimento en cada paso. Para finalizar, las células se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10%, se prepararon alícuotas de 50 µl y se almacenaron a –80 °C hasta su uso.

5.1.1.6 Transformación en células competentes de *Corynebacterium glutamicum*

Se mezcló 1 µl de ADN con 50 µl de células competentes mantenidas en hielo. La mezcla se homogenizó y se sometió a electroporación con los siguientes parámetros: 25 mF, 200 Ω y 2.5 kV. Inmediatamente después, las células se resuspendieron con 1 ml de medio BHI-SG y se sometieron a un tratamiento térmico a 46 °C durante 6 minutos. La recuperación se realizó incubando a 30 °C con agitación a 120 rpm durante 45 minutos. Luego, se centrifugó 1 ml de cultivo a 23 °C y 5200 g durante 5 minutos, se descartó el

sobrenadante y el pellet se resuspendió en aproximadamente 100 µl del medio residual. Finalmente, se sembraron las células en placas de BHI-SG suplementado con 25 µg/µl del antibiótico correspondiente, incubando a 30 °C durante 48 horas.

5.2 Cultivos celulares

Para los cultivos celulares, se prepararon placas en medio BHI-Agar (del inglés, Brain Heart Infusion) y se complementaron con Kanamicina 25 µg/ml cuando fue necesario. Se utilizaron cepas mantenidas a -80°C y se incubaron a 30°C ON. En cada caso, se seleccionó una colonia individual de una placa BHI-Agar fresca para realizar un pre-cultivo en 4 ml de medio BHI, suplementado con Kanamicina. Estos pre-cultivos se incubaron a 30°C y 120 rpm ON.

Posteriormente, se realizó un segundo pre-cultivo para la adaptación de los mismos en Medio Mínimo CGXII (MM) ²⁶³, con sacarosa 4% (p/v) como fuente de carbono. Para ello, se eliminó el BHI de los pre-cultivos, centrifugando a 5200 g por 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Después se inocularon en 10 ml de MM y Kanamicina, manteniendo las mismas condiciones de incubación descritas antes.

Al día siguiente, se inocularon 30 ml de MM complementado con sacarosa 4% y el inductor gluconato (concentración según experimento) a partir de los cultivos ON. Los cultivos se ajustaron para tener una DO 600 nm inicial de 1, utilizando un espectrofotómetro/fluorómetro (DeNovix DS-11FX +). Estos cultivos finales se incubaron a 30°C y 120 rpm durante 6 horas hasta alcanzar una DO 600 nm de aproximadamente 5.

5.3 Morfología celular y número de septos por microscopía confocal

El largo celular y el número de septos de la cepa control C.glu y la cepa C.glu_apex2_ftsZ se evaluaron por microscopía confocal. Para ello se usaron distintas concentraciones del inductor gluconato (0.05, 0.25 y 1% (máxima inducción)). Se hicieron 3 experimentos independientes para cada condición con el fin de evaluar las diferencias estadísticas. Se tomaron 500 µl de los cultivos, incubados durante 6 horas y con una DO 600 nm final de aproximadamente 5. Las muestras se centrifugaron a 3000 g por 5 minutos a 4°C y se lavaron 2 veces con 700 µl de PBS pH 7.5. Los sedimentos se resuspendieron en 50 µl de PBS.

Las células se incubaron con la sonda fluorescente: Laurdan (0.05 mM) a 30°C con agitación por 45 minutos. La preparación final de las muestras se realizó mediante el método agar pads para la obtención de imágenes de células vivas de bacterias. Las imágenes (entre 10 y 15 campos para cada réplica) se adquirieron en el microscopio confocal de barrido láser espectral Zeiss LSM 880, equipado con un objetivo de inmersión en aceite plan-apocromático de 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.

Las imágenes se procesaron y analizaron utilizando el programa Image J²⁶⁴. En cada una de ellas se seleccionaron células aisladas para el análisis (267 células para la cepa C.glu, 310 y 113 para la cepa C.glu_apex2_ftsZ con 0.05% y 0.25%, respectivamente). Se realizó un conteo del número de septos presentes en cada una (0/1, 2 y >2), además de medir su largo. Posteriormente, para evaluar las diferencias estadísticas entre el número de septos, se calculó el porcentaje de células con 0/1, 2 y >2 septos para cada uno de los 3 experimentos y se determinó la media y la Desviación Estándar (DE). Una vez comprobada la normalidad de los datos ($p > 0.05$) se evaluaron las diferencias estadísticas utilizando una prueba T de Student (T-Test) (bilateral para muestras independientes) y se marcaron los niveles de significancia (* para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ y *** para $p < 0.001$).

Para el análisis del largo celular también se determinó la media y la DE; pero en este caso el análisis estadístico se realizó a través del test de Cohen's d. Cohen's d nos permitió describir el tamaño del efecto entre las diferentes cepas independientemente del número de células analizadas. Los valores se interpretaron según los intervalos de referencia sugeridos por Cohen²⁶⁵ y ampliados por Sawilowsky²⁶⁶ de la siguiente manera: pequeño (ns), $d < 0.50$; mediano (*), $0.50 < d < 0.80$; grande (**), $0.80 < d < 1.20$; muy grande (***), $1.20 < d < 2.0$; enorme (****), $d > 2.0$.

5.4 Curvas de crecimiento

Para la construcción de las curvas de crecimiento, las cepas C.glu y C.glu_apex2_ftsZ se cultivaron sin y con el inductor gluconato (0.05%) en MM y Kanamicina (25 µg/ml), por triplicado. Se midió la DO 600 nm cada 3 horas durante un total de 18 horas, tiempo en el cual se alcanzó la fase estacionaria. Las mediciones se realizaron utilizando el espectrofotómetro (Spectrophotometer/Fluorometer, DeNovix DS-11FX +). Los datos de la DO 600 nm se registraron y se graficaron (logaritmo (LOG) de la DO 600 nm) en

función del tiempo para generar las curvas de crecimiento. Para cada tiempo de medición, se promediaron los valores de DO 600 nm de los triplicados biológicos, y se calcularon las DE para reflejar la variabilidad experimental.

5.5 Obtención de extractos proteicos y cuantificación de proteínas totales

Luego, las células se lisaron utilizando la sonicación como método de ruptura. Para ello, los sedimentos se resuspendieron en tampón de lisis (solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés Phosphate-Buffered Saline) pH 7.5, Tritón 0.1%, Lisozima 1 mg/ml, Cóctel de Inhibidores de Proteasas 1X (cOmplete™ EDTA-free, Roche), DNAasa 0.005 mg/ml y RNAasa 0.01 mg/ml) y se incubaron durante 15 minutos en hielo. Pasado este tiempo, las muestras se sonicaron (Branson Digital Sonifier) 3 minutos a 10% de amplitud y 10 minutos a 15% de amplitud, con secuencias 1 min ON, 1 minuto OFF. Después los extractos se centrifugaron a 16000 g por 45 minutos a 4°C y los sobrenadantes se recuperaron y conservaron a -20°C hasta su uso.

La cuantificación de proteínas totales de todos los extractos obtenidos, se realizó mediante electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, del inglés, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) al 12%. Usando un Patrón de Peso Molecular (PPM) de amplio rango (Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker-Full range), de concentración conocida, las muestras a cuantificar, se incubaron a 100°C durante 5 minutos en un tampón de carga 1X [(Tris/HCl) 2.5 mM pH 6.86, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.01%, β mercaptoetanol 2.5%].

Las condiciones de corrida que se utilizaron fueron: 10 mA hasta que las proteínas migraron completamente a través del gel concentrador y 20 mA durante la migración a través del gel separador. Luego los geles se fijaron en la solución etanol:ácido acético:H₂O 4:1:5 durante 30 minutos y se tiñeron con azul de Coomassie G-250 Coloidal en etanol por 1 hora.

Tras la tinción, los geles se destiñeron con abundante agua ultrapura ON y las imágenes de los geles se adquirieron en un scanner UMAX Power-LOOK 2100XL. La cuantificación de los lisados se realizó por un análisis densitométrico en el software Image QuantTL V2005, calibrando los resultados con un marcador de bajo peso molecular (Low

Molecular Weight Calibration Kit for electrophoresis, Amersham), cuyas concentraciones proteicas eran conocidas.

5.6 Western blot

Para los análisis por western blot, se prepararon geles de poliacrilamida al 12%; en los cuales se cargaron 20 µg de las muestras previamente cuantificadas. Se utilizó un PPM preteñido de amplio rango (Thermo SCIENTIFIC PageRuler Prestained Protein Ladder). Luego de finalizar la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y la transferencia transcurrió con corriente constante a 400 mA por 1 hora y 20 minutos, utilizando una solución de transferencia compuesta por tampón de Tris-Glicina-SDS, etanol 2% y agua ultrapura.

Posteriormente, las membranas se bloquearon a 4°C con agitación suave ON, utilizando leche descremada 5% en solución salina tamponada con Tris (TBS, del inglés, Tris-Buffered Saline) (Tris 5 mM pH 8.0, NaCl 15 mM) y polioxietileno sorbitán monolaurato (Tween 20) 0.2%. Luego del bloqueo, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con Tween 20 0.2% en TBS.

Para los experimentos dirigidos a corroborar la expresión de APEX2 y FtsZ, las membranas se incubaron a 4°C con agitación suave ON, en presencia de un anticuerpo monoclonal (mAb, del inglés, monoclonal antibody) anti-FLAG M2 (SIGMA-ALDRICH, F1804), diluido 1/5000 en albúmina sérica bovina 2% (BSA, del inglés Bovine Serum Albumin), Tween 20 0.005% y azida de sodio en TBS. Al día siguiente, las membranas se lavaron nuevamente y se incubaron a TA con agitación suave por 1 hora, usando un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (SIGMA-ALDRICH, A9044), diluido 1/10000 en el mismo tampón.

En los experimentos destinados a verificar la actividad de APEX2, las membranas se incubaron con estreptavidina conjugada con HRP (abcam, ab7403), diluido 1/10000 a TA con agitación suave durante 3 horas. Las membranas se lavaron y la detección se hizo usando un sustrato quimioluminiscente (Kit Super signal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Thermo), revelado en el equipo automático ImageQuant 800 (Amersham).

5.7 Análisis de los proteomas totales por MS

Para la determinación de los proteomas totales, los extractos de proteínas se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12.5%, cargando 20 µg de proteínas. La corrida se detuvo cuando el frente migró aproximadamente 1 cm después del gel concentrador. El gel fue fijado y teñido. Cada carril (correspondiente a una muestra) se cortó en piezas pequeñas, que se introdujeron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se conservaron a 4°C hasta su uso.

Las piezas de gel de cada muestra se destiñeron con 200 µL bicarbonato de amonio (Ambic) 0.2 M/acetonitrilo (ACN) (1:1, v/v) e incubaron a 1000 rpm durante 30 minutos a 30 °C (este paso se repitió hasta que las muestras resultaron completamente desteñidas). Luego, se añadió ACN puro para deshidratar las bandas, se retiró la solución y se dejó secar en la cámara de flujo laminar. La reducción y alquilación de las Cys en el gel se llevó a cabo incubando las piezas a 1000 rpm por 1 hora a 56°C con Ditioneitol (DTT) 10 mM y luego con Iodoacetamida (IAM) 55 mM, durante 45 minutos a TA. Las bandas se deshidrataron nuevamente siguiendo el mismo procedimiento.

La digestión en gel se llevó a cabo utilizando tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin, (Promega)) diluida en Ambic 50 mM, relación proteasa: proteína 1:50 (m:m) y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos obtenidos se extrajeron 2 veces consecutivas por 1 hora, utilizando una solución 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA, del inglés, trifluoroacetic acid) en 60% de ACN y se secaron utilizando una centrífuga de vacío (SpeedVac, Thermo) hasta evaporar completamente el ACN presente en la muestra. Luego, los péptidos se resuspendieron en 0.1% ácido fórmico (FA, del inglés, formic acid) y se sonicaron en 3 ciclos de 5 minutos cada uno.

5.7.1 Nano-HPLC-MS/MS

Los péptidos trípticos se analizaron utilizando un nano-HPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masa Q Exactive Plus con una fuente Easy-Spray (Thermo Scientific). Las mezclas de péptidos se cargaron en una precolumna (Acclaim PepMap™ 100, C18, 75 µm X 2 cm, tamaño de partícula de 3 µm, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) y se separaron con una columna analítica Easy-Spray (PepMap™ RSLC, C18, 75 µm X 50 cm, tamaño de partícula de 2 µm (Thermo

Scientific) a 40 °C usando un sistema de dos disolventes: (A) 0.1% de FA en agua y (B) 0.1% de FA en ACN (LiChrosolv®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a un flujo de 200 nL/min. La temperatura del capilar fue establecida en 250°C y el voltaje de ionización osciló entre 1.7 y 2 kV. Los escaneos de MS se adquirieron en un rango de 200-2000 m/z con una resolución de 70 000 a 200 m/z, un valor objetivo de AGC (del inglés, automatic gain control) de 1E6 y un tiempo máximo de inyección de iones de 100 ms. La fragmentación de los precursores ocurrió en una celda HCD (del inglés, higher-energy C-trap dissociation) con una resolución de 17 500 a 200 m/z, un valor objetivo de AGC de 1E4 y un tiempo máximo de inyección de iones de 50 ms. La energía de colisión normalizada se utilizó en pasos de 25, 30 y 35. El análisis en línea por MS se realizó en modo dependiente de los datos (MS seguido de MS/MS de los 12 iones más abundantes), utilizando exclusión dinámica. El espectrómetro de masa operó en modo positivo. Para el análisis del proteoma total, la columna se equilibró a 4% de B durante 15 minutos, seguido de una elución en gradiente realizada de la siguiente manera: 4% a 35% de B durante 150 min, 35% a 99% de B durante 15 min. Para el análisis de los péptidos purificados por la estrategia APEX2, la columna se equilibró a 1% de B durante 15 minutos, seguido de una elución en gradiente realizada de la siguiente manera: 1% a 35% de B durante 90 min, 35% a 99% de B durante 20 min. En ambos casos, a un flujo constante de 200 nL/min.

5.7.2 Análisis bioinformático de datos proteómicos

Para el análisis de los datos obtenidos por MS se utilizó el software libre PatternLab for Proteomics V²⁶⁷. Primero, se generó una base de datos y su reversa a partir del proteoma de *C. glutamicum* ATCC 13032 (descargado de UniProt) (21/07/2020), agregando las secuencias aminoacídicas de las construcciones sobreexpresadas cuando corresponda y los contaminantes más comunes en los experimentos de proteómica. Para la identificación de los péptidos, se definió como modificación variable, la oxidación de Met y como modificación fija, la carbamidometilación de cisteína. La tolerancia del precursor m/z se fijó inicialmente en 40 ppm y se permitió un máximo de 2 cortes saltados y 2 modificaciones variables por péptido. Los resultados de la búsqueda fueron filtrados por el algoritmo PatternLab Search Engine Processor (SEPro) con un valor máximo de FDR $\leq 1\%$ a nivel de proteína y una tolerancia de 10 ppm para iones precursores. Los análisis se realizaron por el método SC. Se utilizó el módulo estadístico diagrama de venn (VD, del inglés, venn diagrams) para determinar las proteínas exclusivas en cada condición

biológica utilizando un valor de p menor a 0.05²⁶⁸. El módulo T Fold permitió cuantificar los péptidos y/o proteínas sobrerrepresentados en una u otra condición. Este módulo utiliza el estimador teórico de Benjamini-Hochberg para manejar múltiples pruebas de t y maximiza el número de identificaciones que satisfacen un límite de tasa de cambio variable de acuerdo con los valores p ajustado ($qBH < 0.05$). Para este análisis, se usaron los siguientes parámetros: L-stringency: 0.4, valor p ajustado < 0.05 y el valor de F-stringency determinado por el software.

Para la comparación de los péptidos oxidados en la cepa C.glu_apex2-ftsZ (0.05% de gluconato) cuando se añadió el quenching antes o después de la corta exposición a H_2O_2 , se utilizó el módulo VD para identificar los péptidos exclusivos a cada una de las condiciones evaluadas, así como los péptidos presentes en ambas condiciones. A continuación, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de los péptidos oxidados (+15.9949 Da). Para ello, se promedió el número de espectros de los péptidos oxidados para cada réplica biológica en cada condición, y se calculó el porcentaje de espectros y las respectivas DE. En este análisis específico se realizó un análisis estadístico adicional mediante Cohen's d .

5.8 Marcaje con fenol biotina en las células vivas

Para el marcaje con FB, 30 ml de cultivos crecidos durante 6 horas hasta alcanzar una DO 600 nm aproximada de 5, se centrifugaron a 5000 rpm, 10 minutos, 4°C. Las células se resuspendieron en 1 ml de MM fresco y se transfirieron a tubos de microcentrífuga. Las suspensiones celulares se incubaron con FB 1 o 5 mM a 30°C (concentraciones probadas para la optimización del método) y 500 rpm durante 1 hora. Para iniciar el marcado, las suspensiones celulares se trataron con H_2O_2 1 mM durante 1 minuto. La reacción se detuvo añadiendo 1 ml de solución de quenching 2X que contiene ascorbato de sodio 20 mM, azida de sodio 20 mM y ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Trolox) 10 mM en PBS con Tween 80 al 0.05% (PBS-Tween 80).

Posteriormente, las células se lavaron mediante sucesivas centrifugaciones a 3000 g por 10 minutos a 4°C, en los siguientes pasos: 1 ml de solución de quenching 1X, 2 ml de PBS-Tween 80, 1 ml de solución de quenching 1X por segunda vez, 1.5 ml de PBS-Tween 80 y 1.5 ml de PBS (sin Tween 80). Luego, las células se lisaron utilizando la sonicación como método de ruptura. Para ello, los sedimentos se resuspendieron en

tampón de lisis, compuesto por: PBS, Tritón 0.1%, Lisozima 1 mg/ml, Cóctel de Inhibidor de Proteasas 1X, DNAasa 0.005 mg/ml yRNAasa 0.01 mg/ml) y se incubaron durante 15 minutos en hielo.

Pasado este tiempo, las muestras se sonicaron (Branson Digital Sonifier) 3 minutos a 10% de amplitud y 10 minutos a 15% de amplitud, con secuencias de 1 min ON y 1 minuto OFF. Los extractos se centrifugaron a 16000 g por 45 minutos a 4°C y los sobrenadantes se recuperaron y conservaron a -20 °C hasta su uso.

5.9 Digestión de proteínas y purificación de péptidos biotinilados

Para obtener los péptidos biotinilados, se empleó el sistema de preparación de muestras FASP (del inglés, Filter-Aided Sample Preparation) ²⁶⁹. Se utilizó una unidad de filtrado por cada muestra a evaluar y se pasivaron en 500 ml de la solución Tween 20 5% en agua ultra pura a 25 °C, 120 rpm, durante 3 horas. Luego, las unidades de filtrado fueron lavadas sucesivas veces con abundante agua ultrapura.

Previo al procesamiento de las muestras, se verificó cada unidad de filtrado, añadiendo 200 µL de tampón de desnaturalización (urea 8 M, Tris 100 mM, pH 7.5) y centrifugando a 14 000 g durante 1 minuto a 25 °C, asegurando que el volumen no atravesara completamente el filtro. Se añadieron 2 mg de los extractos de proteínas en las unidades de filtrado y se centrifugaron a 14000 g por 15 minutos a 25 °C hasta un volumen final de 200 µL (condiciones mantenidas durante todo el procedimiento). A cada filtro se adicionaron 200 µL de tampón de desnaturalización.

Para el proceso de reducción, se añadieron 200 µL de DTT 10 mM en tampón de desnaturalización y se incubó a 25 °C y 1000 rpm por 30 minutos. La alquilación se llevó a cabo con 200 µL de IAM 55 mM en tampón de desnaturalización (urea 8 M, Tris 100 mM, pH 7.5) e incubando a 25°C sin agitación por 30 minutos en la oscuridad. Luego, se realizaron 2 lavados con 200 µL de Ambic 50 mM en agua ultrapura.

Posteriormente, se cambiaron los tubos colectores y se añadió tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin, (Promega)) en Ambic 50 mM relación 1/50 (m:m). La digestión enzimática se llevó a cabo en una cámara húmeda y oscura a 25 °C y 1000 rpm ON. Posteriormente, al día siguiente, se recuperaron los péptidos, adicionando dos veces 200 µL de Fase A (FA al 0.1% en agua ultrapura grado MS), y centrifugando bajo las mismas

condiciones. Las muestras se secaron en una centrífuga de vacío, SpeedVac, en nuevos tubos de 1.5 ml.

Los péptidos obtenidos se solubilizaron en 200 μ L de PBS y se incubaron con 100 μ L de perlas de Streptactin Sepharosa (IBA), previamente lavadas, con agitación suave durante 1 hora a TA. Las perlas se separaron durante todo el procedimiento por centrifugación a 1000 g durante 5 minutos. Luego, se lavaron 3 veces con 500 μ L de PBS, ACN al 5% en PBS 1X y agua ultrapura.

La elución de los péptidos biotinilados se realizó añadiendo 0.15 ml de TFA al 0.2%, 0.1% de FA y 80% de ACN en agua. Se realizaron 7 eluciones, y en el último paso se llevó la resina a 90 °C durante 5 minutos para maximizar la elución de los péptidos de las perlas, y luego se unieron todas las fracciones. Las muestras se llevaron a sequedad en el SpeedVac, se resuspendieron en 20 μ L de Fase A y se sonicaron 3 veces por 5 minutos. Posteriormente, se desalaron en columnas de fase reversa C18 Zip Tip® (Merck, Millipore), eluyendo los péptidos en Fase B (FA 0.1% en ACN). Los péptidos se secaron nuevamente, resuspendiéndolos en 20 μ L de Fase A y repitiendo los 3 ciclos de sonicado. Los péptidos tripticos se analizaron utilizando un nano-HPLC UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masa Q Exactive Plus con una fuente Easy-Spray (Thermo Fisher Scientific, EE. UU).

5.10 Análisis bioinformático de datos proteómicos obtenidos por la estrategia APEX

La validación de los péptidos modificados con FB se llevó a cabo utilizando el módulo APEX recientemente incorporado en PatternLab V ²⁷⁰. Para este análisis, se realizó una búsqueda en bases de datos y se consideró como modificación variable la adición de FB en residuos de Tyr (+361.1460 Da). Los resultados se filtraron aplicando un criterio de FDR del 1%. Posteriormente, el módulo APEX permitió seleccionar únicamente aquellos espectros MS/MS que presentaban al menos uno de los dos iones diagnósticos más intensos de esta modificación: m/z 480.19 (FB-Tyr con pérdida de NH₃) y m/z 497.22 (FB-Tyr intacto). Este paso aseguró la validación de los péptidos y de las proteínas que los contienen. A partir de este conjunto de datos filtrados, se procedió a realizar los análisis de SC mediante los módulos estadísticos VD y T-fold, tal como se indicó previamente, pero restringiendo el análisis exclusivamente a los péptidos modificados.

5.11 Localización subcelular de las proteínas seleccionadas por microscopía confocal

La localización subcelular de las proteínas candidatas para validar como integrantes del divisoma se evaluó por microscopía confocal. Cada una de estas proteínas se sobreexpresan en *C. glutamicum* fusionadas a la proteína verde fluorescente mNeon (acápite 5.1). Se usó la concentración máxima de inducción (1% de gluconato). La obtención de los cultivos celulares y preparación final de las muestras se realizó como se indica en el acápite 5.3, con la diferencia del fluoróforo usado. Se hicieron 3 experimentos independientes y las células se incubaron con Rojo Nilo (del inglés, Nile Red), que es un fluoróforo que se une a la membrana y es un control que nos permitió normalizar y confirmar la localización celular de estas proteínas en el septo. Se utilizó una concentración de Rojo Nilo de 2 µg/ml.

Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio confocal de barrido láser espectral Zeiss LSM 880, equipado con un objetivo de inmersión en aceite plan-apocromático de 63x/1.4. La excitación para ambos fluoróforos, mNeon y Rojo Nilo se hizo con un láser de 488 y 561 nm, respectivamente, y la emisión se registró en el rango de 502-540 nm y 620-690, respectivamente.

Las imágenes se procesaron y analizaron en el programa Image J (4). Para cada una de las células seleccionadas, se trazó una línea de un polo al otro. El programa exporta la intensidad de fluorescencia en cada punto para ambos fluoróforos, y tomamos el valor del septo (es decir, máximo valor de intensidad) y los polos (el máximo valor de los 3 primeros y últimos puntos). Posteriormente, obtuvimos el cociente de la intensidad de fluorescencia del septo y la intensidad promedio de los polos para ambos fluoróforos.

El análisis estadístico para comparar este cociente entre ambos fluoróforos se realizó a través del test de Cohen's d. Los valores se interpretaron como se describió en el acápite 5.3.

5.12 Morfología celular de la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* por microscopía confocal

La morfología celular de la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* se evaluó por microscopía confocal. Se usó la concentración máxima de inducción (1% de gluconato). La obtención de los cultivos celulares y preparación final de las muestras se realizó como se indica en el acápite 5.3, con la diferencia del fluoróforo usado. Se utilizó una concentración de Rojo

Nilo de 2 $\mu\text{g/ml}$. Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio confocal de barrido láser espectral Zeiss LSM 880, equipado con un objetivo de inmersión en aceite plan-apocromático de 63x/1.4. La excitación para el fluoróforo Rojo Nilo se hizo con un láser de 561 nm para y la emisión se obtuvo en el rango de 620-690 nm. Las imágenes se procesaron y analizaron también en el programa Image J ²⁶⁴.

6. RESULTADOS

6.1 Desarrollo y validación de una estrategia de marcado por proximidad en las células vivas en *C. glutamicum*

Para identificar los vecinos de FtsZ en las células vivas, se desarrolló y optimizó una estrategia de marcado por proximidad basada en APEX2, utilizando a *C. glutamicum* como representante de este grupo de bacterias.

En un primer paso se obtuvo una cepa de *C. glutamicum* que expresa FtsZ fusionada a APEX2 y a dos etiquetas: Histag y FLAG. La misma se obtuvo con la colaboración de Mariano Martínez, quien además supervisó el trabajo de biología molecular durante mis estadias en el Institut Pasteur de París. Con base en resultados previos que mostraron que los fluoróforos fusionados al extremo N-terminal de FtsZ no perjudicaban su función normal, se decidió introducir APEX2 en esta posición ¹⁵⁵. La fusión de APEX2 y FtsZ se expresó bajo el control del promotor inducible de baja actividad transcripcional PgntK ²⁶². Esto permitió una regulación fina de los niveles de expresión, lo que es de vital importancia en el caso de proteínas involucradas en procesos esenciales como la división celular.

Para llevar a cabo el marcado por proximidad esta cepa se incubó con FB seguida de una corta exposición a H₂O₂. APEX2 en presencia de FB y H₂O₂ genera un radical fenoxilo de vida media muy corta capaz de modificar aminoácidos en las proteínas del entorno cercano e introducir una molécula de biotina. Luego del quenching de la reacción, las bacterias se lisaron, las proteínas se digirieron con tripsina y los péptidos biotinilados se purificaron por afinidad, se identificaron y cuantificaron utilizando un nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masa. Para obtener una lista confiable de vecinos de FtsZ, la lista de péptidos identificados se comparó con los obtenidos a partir de una cepa control que solamente expresa APEX2. En la Figura 29 se resume la estrategia experimental.

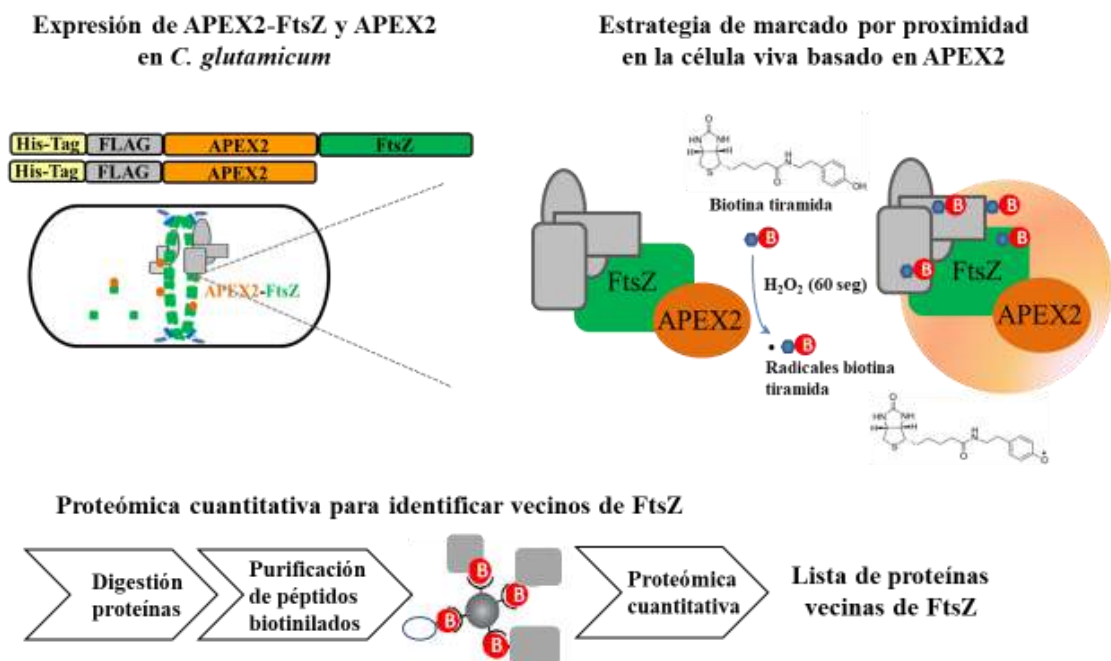


Figura 29: Esquema de la estrategia de marcado de proximidad basada en APEX2 para explorar el entorno proteómico de FtsZ. La cepa *C.glu_apex2-ftsZ* de *C. glutamicum* expresa FtsZ fusionada a APEX2, bajo el control de un promotor de baja actividad transcripcional (PgntK). APEX2 en presencia de FB y un pulso corto de H_2O_2 1 mM (1 minuto) genera radicales biotina-fenoxilo altamente reactivos que modifican aminoácidos en proteínas cercanas, principalmente residuos de Tyr. Como control, se utilizó una cepa que expresa únicamente APEX2. Los péptidos marcados se purificaron utilizando columnas de afinidad y se identificaron mediante nano LC-MS/MS. Un análisis cuantitativo usando el software PatternLab V permitió obtener la lista confiable de vecinos de FtsZ.

El desarrollo y optimización de la estrategia conllevó la realización de diversos y estrictos controles para optimizar el marcado y garantizar la identificación de vecinos fisiológicamente relevantes.

6.1.1 Caracterización de la cepa que sobreexpresa FtsZ

Como parte de la optimización de la estrategia APEX2 en *C. glutamicum*, se evaluaron los cambios funcionales provocados por la sobreexpresión de APEX2-FtsZ. Para ello se evaluó la morfología celular y el crecimiento de la cepa en estudio.

6.1.1.1 La morfología celular de la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* depende de los niveles de expresión de FtsZ

Inicialmente y con el objetivo de seleccionar la concentración adecuada de gluconato para inducir la sobreexpresión de FtsZ en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* sin provocar cambios morfológicos significativos respecto a la cepa control *C.glu*, se evaluó el largo celular y el número de septos presentes en ambas cepas mediante microscopía confocal. Para ello,

se utilizaron distintas concentraciones del inductor gluconato (0.05%, 0.25% y 1% (máxima inducción)) y se usó la sonda fluorescente Laurdan, la cual se une específicamente a las membranas y resulta muy útil para detectar la formación de septos.

En la Figura 30A se muestran imágenes representativas (de entre 10 y 15 imágenes adquiridas por condición) de las diferentes condiciones ensayadas (C.glu_apex2-ftsZ con 0.05, 0.25 y 1% de gluconato y la cepa C.glu como control). Como se puede observar, el incremento en los niveles de expresión de la proteína FtsZ afectó la morfología celular, observándose un fenotipo de células más alargadas y con aumento del número de septos (células multiseptadas) en comparación con las de la cepa C.glu, en forma dependiente de la concentración del inductor. Este efecto de la sobreexpresión de FtsZ fue previamente reportado por Letek y cols. 2007²⁶². Además, con la máxima inducción (1% de gluconato) se observan células con una fuerte alteración de la morfología celular.

Las imágenes obtenidas se analizaron en el programa Image J para cuantificar tanto el número de septos como el largo celular. Se seleccionaron aquellas células que se distinguían de forma clara e independiente: 267 células para la cepa C.glu, 310 células para la cepa C.glu_apex2-ftsZ con 0.05% de gluconato y 115 células para la cepa C.glu_apex2-ftsZ con 0.25%.

Las Figuras 30B y 30C corroboran las observaciones previas y muestran las diferencias estadísticas entre las condiciones evaluadas. Para este análisis no se incluyó la cepa C.glu_apex2-ftsZ con 1% de gluconato debido a que, como se mencionó anteriormente, la morfología se alteró fuertemente, haciendo imposible realizar el conteo confiable de células individuales.

En el gráfico de barras de la Figura 30B, se representa el porcentaje de células con 0/1, 2 y >2 septos. Se observa que la mayoría de las células de la cepa WT presentan 0/1 septo 93%, mientras que la proporción de células con 2 y >2 septos es mucho menor: 4.0% y 2.9%, respectivamente. A medida que aumenta la concentración de gluconato, disminuyó el porcentaje de células con 0/1 septo: 83.5% y 47.9% para C.glu_apex2-ftsZ con 0.05% y 0.25% de gluconato, respectivamente. A su vez se incrementó el porcentaje de células con 2 y >2 septos: 6.5% y 10%; y 15.2% y 39.9% para C.glu_apex2-ftsZ con 0.05% y 0.25% de gluconato, respectivamente. A partir de estos resultados, se seleccionó una concentración de inducción de 0.05% de gluconato para los niveles de expresión de FtsZ,

ya que en estas condiciones el número de células con 0/1 septo presenta una disminución menor del 10% y por lo tanto permite realizar los experimentos en condiciones similares a las fisiológicas.

En la Figura 30C se muestran los gráficos de cajas que ilustran el largo de las células. En estos gráficos se ve que las células se alargan de manera dependiente de la concentración de gluconato, pasando de 2.4 μm a 2.8 μm en promedio para la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.05% y a 3.3 μm para *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.25%.

Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó 0.05% de gluconato para el posterior desarrollo de la estrategia APEX2 en estas bacterias.

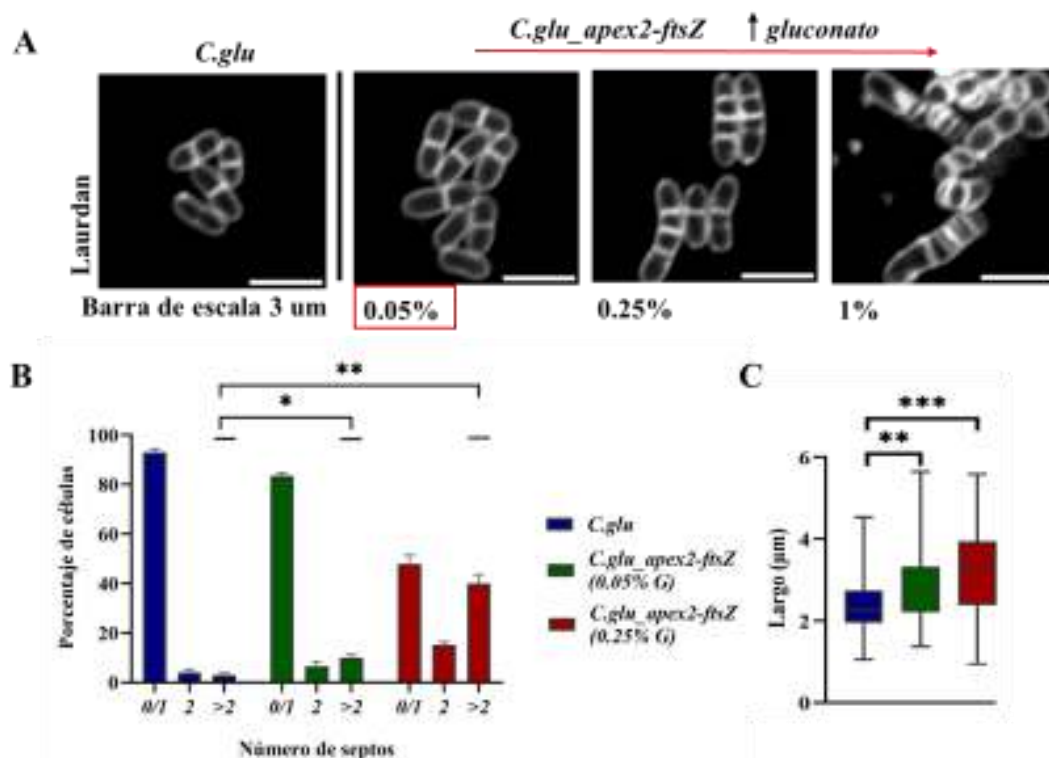


Figura 30: Morfología celular, número de septos y largo de las células de la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* utilizando diferentes concentraciones de gluconato (0.05%, 0.25% y 1%) y de la cepa *C.glu* como control. **A)** Imágenes representativas obtenidas utilizando Laurdan como sonda fluorescente. Barras de escala de 3 μm . **B)** Gráfico de barras donde se muestra el número de células con 0/1, 2 y >2 septos para cada condición: *C.glu* 0/1 (93 ± 2.6), 2 (4.0 ± 2.5), >2 (2.9 ± 1.5); *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.05% de gluconato 0/1 (83.5 ± 2.4), 2 (6.5 ± 4.2), >2 (10.0 ± 2.4) y *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.25% de gluconato 0/1 (47.9 ± 7.0), 2 (15.2 ± 2.4), >2 (39.9 ± 7.3). El análisis para determinar las diferencias estadísticas se hizo mediante un t-test (bilateral para muestras independientes) comparando la cepa *C.glu-apex2-ftsZ* con 0.05% y 0.25% de gluconato con la cepa *C.glu*: *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.05% de gluconato 0/1 (***, $p=0.009$), 2 (ns, $p=0.43$) y >2 (*, $p=0.01$) y *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.25% de gluconato 0/1 (*, $p=0.0004$), 2 (**, $p=0.005$) y >2 (**, $p=0.001$). **C)** Gráficos de cajas mostrando el largo celular de las cepas evaluadas: *C.glu* (promedio 2.4 ± 0.7 μm), *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.05% de gluconato (promedio 2.8 ± 0.8 μm) y *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.25% de gluconato (promedio 3.3 ± 1.0 μm). La significancia indicada corresponde a los valores de Cohen's d, donde se comparó la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* a las 2

concentraciones de gluconato evaluadas con la cepa *C.glu*: *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.05% de gluconato (**, $d = 0.53$) y *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.25% de gluconato (***, $d = 0.98$). Para los análisis estadísticos que se muestran en B y C se contaron: 267 células para la cepa *C.glu*, 310 células para la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.05% de gluconato y 115 células para la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.25%.

6.1.1.2 La sobreexpresión de FtsZ no afectó la curva de crecimiento

Con el fin de determinar si la sobreexpresión de FtsZ afecta el patrón de crecimiento de *C.glu_apex2-ftsZ* se cultivaron 3 réplicas biológicas de esta cepa y de la cepa control *C.glu* en ausencia y presencia del inductor de la sobreexpresión de FtsZ (gluconato 0.05%).

Como se ve en la Figura 31, ambas cepas mostraron una curva típica de crecimiento microbiano en las 2 condiciones testeadas (sin y con el inductor gluconato). Inicialmente hubo una corta fase de latencia (aproximadamente 3 horas) seguida por un crecimiento exponencial rápido y una fase estacionaria. A las 15 horas se observó una disminución en la DO 600 nm en todas las condiciones, lo que refleja el comienzo de la fase de muerte celular.

Además, las curvas de crecimiento obtenidas para todas las condiciones mostraron que el comportamiento de la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* es similar al de la cepa control *C.glu*, indicando que la sobreexpresión de FtsZ (usando 0.05% del inductor gluconato) no afectó el crecimiento en el tiempo.

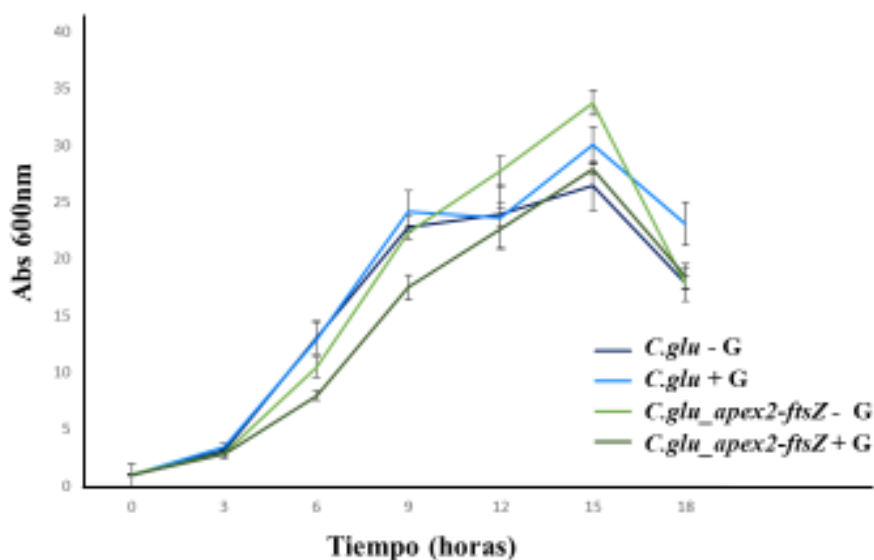


Figura 31: Curvas de crecimiento de las cepas *C.glu_apex2-ftsZ* y la cepa control *C.glu* en ausencia y presencia del inductor gluconato (0.05%). Las células se cultivaron en MM CGXII suplementado con sacarosa (4%) y gluconato (0.05%) según correspondió, a 30°C con agitación a 120 rpm. La DO 600 nm se midió cada 3 horas durante 18 horas. Los valores representan la

media de tres réplicas biológicas $\pm$ DE (barras de error). Las curvas de crecimiento obtenidas para todas las condiciones mostraron que el crecimiento de C.glu_apex2-ftsZ es similar al de la cepa control C.glu.

6.1.1.3 APEX2-FtsZ y APEX2 se expresan correctamente

Un control necesario para continuar con el desarrollo de la estrategia APEX2 es comprobar la correcta expresión de la construcción. Para esto, se cultivó la cepa C.glu_apex2-ftsZ con 0.05% de gluconato, la concentración seleccionada anteriormente para el desarrollo de la estrategia APEX2. Además, se cultivó una cepa de C. glutamicum que sobreexpresa solamente APEX2 bajo el control del mismo promotor (cepa control C.glu_apex2) (Figura 32A).

En la Figura 32B, se muestra el análisis de western blot que se realizó para verificar la correcta expresión de las proteínas APEX2-FtsZ y APEX2, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG (teniendo en cuenta que ambas proteínas contienen una etiqueta FLAG) y un revelado quimioluminiscente.

Como se observa en la figura 32B, la cepa C.glu_apex2 cultivada con 0.05% de gluconato mostró una banda principal a la altura de aproximadamente 80 kDa, que corresponde al peso molecular esperado para la proteína de fusión (77 kDa). Por otro lado, la cepa C.glu_apex2 cultivada también con 0.05% de gluconato, presentó una única banda ligeramente por encima de 30 kDa, coherente con el peso molecular esperado para esta construcción (masa molecular teórica de la construcción: 30.2 kDa). No se detectaron bandas adicionales de menor peso molecular que pudieran sugerir degradación proteica en ninguna de las cepas analizadas.

Estos resultados apuntan que las cepas expresan correctamente las proteínas de interés APEX2-FtsZ y APEX2, permitiendo continuar con los experimentos posteriores para desarrollar la estrategia de marcado usando la enzima APEX2.

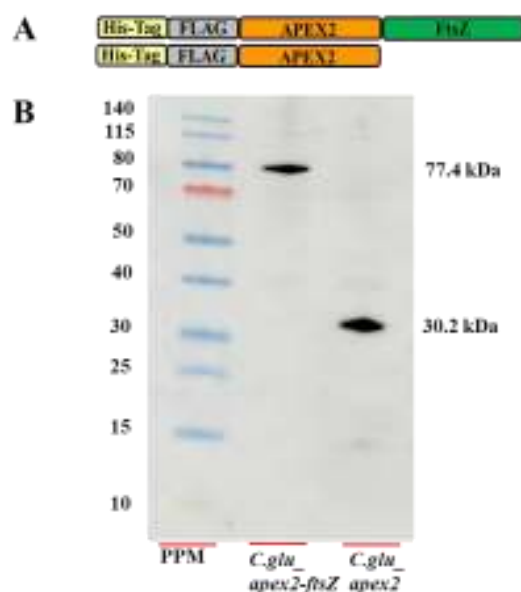


Figura 32: A) Esquema de las construcciones expresadas en las cepas *C.glu_apex2-ftsZ* y *C.glu_apex2*. B) Western blot de un extracto de proteínas de las cepas *C.glu_apex2-ftsZ* y *C.glu_apex2* crecidas en presencia de 0.05% de gluconato. A la izquierda se indican los pesos moleculares del marcador utilizado (Thermo). Los extractos de proteínas de ambas cepas se separaron en una electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida al 12%. Se aplicaron 20 ug de proteínas y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la membrana se incubó con el mAb anti-FLAG diluido 1/5000, seguido de una incubación con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa diluido 1/10000. El revelado se hizo usando el sustrato quimioluminiscente (Kit Super signal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Thermo) en el equipo automático ImageQuant 800 (Amersham). Estos resultados muestran que las cepas expresan correctamente las proteínas APEX2-FtsZ y APEX2.

6.1.1.4 La sobreexpresión de FtsZ no produce grandes cambios proteómicos

Como parte de la caracterización de la cepa, se evaluó si la sobreexpresión de FtsZ afectaba la expresión global de proteínas, lo que podría introducir un sesgo en la estrategia de proteómica de proximidad, y en consecuencia, en la identificación de interactores. Para ello, se comparó el proteoma de *C.glu_apex2-ftsZ* (0.05% gluconato) con la cepa control *C.glu*, utilizando 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas de cada condición.

Como se muestra en la Figura 33A, se identificaron 1100 y 1061 proteínas en las cepas *C.glu_apex2-ftsZ* y *C.glu*, respectivamente. La mayoría de estas proteínas están presentes en ambas cepas y solo se detectan 66 proteínas únicamente en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* y 27 proteínas en la cepa control *C.glu*. La mayoría de las proteínas exclusivas muestran un número total de espectros relativamente bajo (menos de 20 espectros entre las 3 réplicas), lo que sugiere que estas proteínas podrían no haberse detectado en la otra condición debido a los problemas de muestreo asociados a las estrategias shotgun. La

única proteína detectada con un número considerable de espectros es la Chaperonin GroEL 1, presente únicamente en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* (160 espectros totales entre todas las réplicas) (Tabla Suplementaria 1).

Por otro lado, el análisis cuantitativo de las proteínas detectadas en ambas cepas mostró que sólo 19 proteínas presentaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión considerando una tasa de cambio > 2 (9 sobreexpresadas y 10 subexpresadas en *C.glu_apex2-ftsZ*; valor p ajustado ≤ 0.05) (Tabla Suplementaria 2). En este análisis cuantitativo se observó que la proteína FtsZ estaba sobreexpresada estadísticamente en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* con una tasa de cambio de 1.85 (valor p : 0.01406) (Figura 33B).

Estos resultados en su conjunto, nos sugieren que hay un efecto muy modesto en el proteoma total cuando la expresión de *C.glu_apex2-ftsZ* se induce con 0.05% de gluconato.

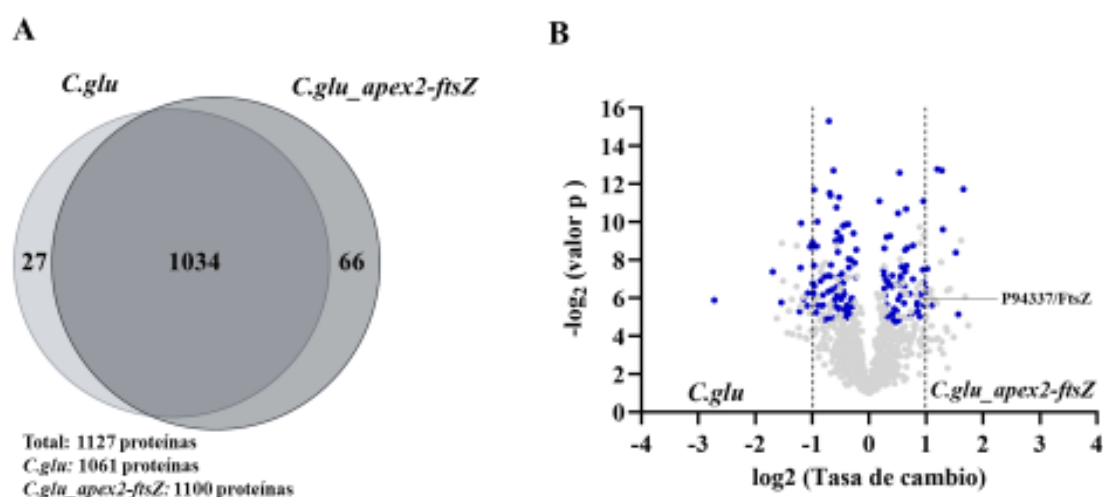


Figura 33: Análisis proteómico comparativo de la cepa *C.glu-apex2-ftsZ* con 0.05% de gluconato y la cepa control *C.glu*. Se analizaron 3 réplicas biológicas y 2 inyecciones técnicas por réplica biológica. En **A**) se muestra el número de proteínas detectadas exclusivamente en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* (66) y en la cepa *C.glu* (27) mediante el análisis del módulo estadístico VD ($p < 0.05$). Se identificaron un total de 1100 proteínas en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* y 1061 en la cepa *C.glu* (Tabla Suplementaria 1). En **B**) se muestra un gráfico de volcán con las proteínas encontradas en ambas cepas. Para el análisis del conteo de espectros se tomaron en cuenta las proteínas presentes en al menos 4 de las 6 réplicas biológicas consideradas (F-stringency: 0.04; L-stringency: 0.6, valor p ajustado < 0.05). En el gráfico de volcán se representa el $\log_2(\text{valor } p)$ en el eje Y y el $\log_2(\text{tasa de cambio})$ en el eje X. Los puntos azules corresponden a proteínas con niveles estadísticamente diferentes entre ambas condiciones (la información de cada una se muestra en la Tabla Suplementaria 2). Las líneas punteadas indican una tasa de cambio de 2. Los puntos grises oscuros representan proteínas que no presentan cambios estadísticamente significativos.

Además, a partir de los datos proteómicos pudimos corroborar la presencia de péptidos correspondientes a la secuencia de la proteína de fusión APEX2-FtsZ, identificando 550 espectros en total, que se asignan a 44 péptidos, 134 de los cuales correspondieron a la secuencia de APEX2 y 416 a la secuencia de FtsZ (Tabla 6 y Figura 34).

Tabla 6: Cobertura de secuencia de APEX2-FtsZ

Secuencia de los péptidos	# de espectros	Dominio
GSDHLRDVFGK	7	APEX
GFIAEKR	29	APEX
AMGLTDQDIVALSGGHTIGAAHK	4	APEX
YAADEDAFFADYAEAHQK	1	APEX
SYPTVSADYQDAVEK	17	APEX
GFIAEK	8	APEX
ALLSDPVFRPLVDKYAADEDAFFADYAEAHQK	5	APEX
AMGLTDQDIVALSGGHTIGAAHKEK	3	APEX
LAFHSAGTFDKGTK	3	APEX
TGGPFGTIKHPAELAHSANGLDIIVR	2	APEX
LAFHSAGTFDK	16	APEX
EGLLQLPSDK	7	APEX
TGGPFGTIK	3	APEX
CAPMLLR	17	APEX
LPDPTK	11	APEX
VPFHPGREDKPEPPPEGR	1	APEX
VTVIATGFDAAR	24	FtsZ
KMGALTIGVVTKPFEFEGR	5	FtsZ
GLGAGANPEVGR	38	FtsZ
ASAEDHKNEIEEIKGADMVFVTAGEGGGTGTGAAPVVAGIAK	4	FtsZ
SGGGLFTTGNDRDYR	29	FtsZ
MGALTIGVVTKPFEFEGR	9	FtsZ
TRQAEEGIAALKEVCDTLIVIPNDR	2	FtsZ
SVMSEAGSALMGVGSAR	30	FtsZ
EVCNTLIVIPNDR	5	FtsZ
EATRGLGAGANPEVGR	2	FtsZ
AADEVLHNGVQGITNLITIPGVINVDFAVDR	23	FtsZ
ERSDEDVNLIFGTIIDDNLGDEVDR	21	FtsZ
QAEEGIAALKEVCDTLIVIPNDR	26	FtsZ
IKVVGVGGGGVNAVNR	45	FtsZ
RDDRGGDDLVDPSFLQ	16	FtsZ
LLELGDANLSIMEAFR	1	FtsZ
MIEEGLK	3	FtsZ
SGGGLFTTGNDRDYRR	8	FtsZ
ASAEDHKNEIEETIK	6	FtsZ
VVGVGGGGGVNAVNR	22	FtsZ

SGGGLFTTGNDR	6	FtsZ
HRIEETR	34	FtsZ
ESIFGGAREENDPYLSR	9	FtsZ
AGISAAPAAEPVQQVPTTNATLPPEKESIFGGAREENDPYLSR	20	FtsZ
DDRGGDDLDPVSFLQ	7	FtsZ
QAEEGIAALK	2	FtsZ
SVMSEAGSALMGVGSARGDNR	1	FtsZ
EENDPYLSR	18	FtsZ

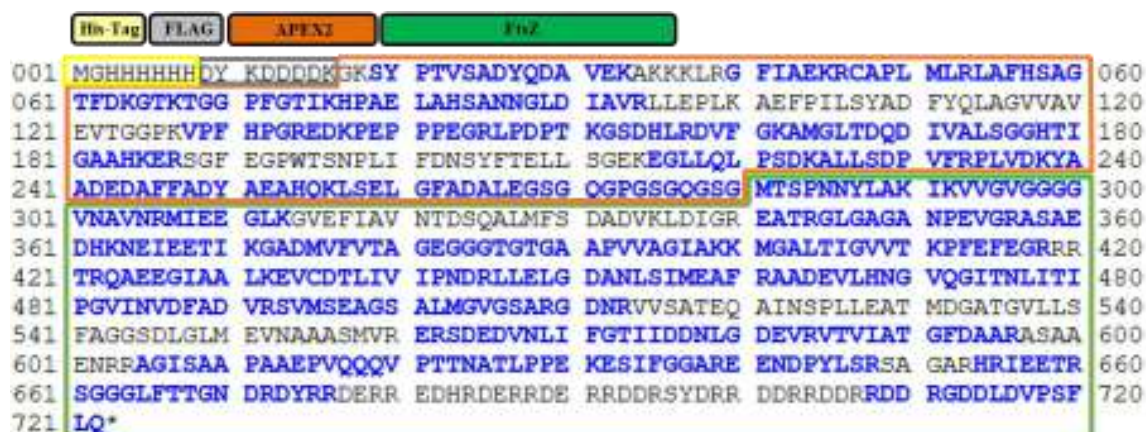


Figura 34: Cobertura de secuencia obtenida a partir de la evaluación del proteoma total de C.glu_apex2-ftsZ. Se muestra la secuencia de la construcción y en azul los péptidos detectados que representan un 72% de toda la secuencia. Las secuencias correspondientes a His-Tag, FLAG, APEX2 y FtsZ se marcan con recuadros a colores, amarillo, gris, naranja y verde, respectivamente.

Todos los resultados anteriores apuntan a que la proteína de fusión APEX2-FtsZ se expresa correctamente y que los niveles de expresión utilizando gluconato al 0.05% no alteran el crecimiento celular, producen cambios mínimos en el proteoma y una leve alteración morfológica. Por ello, seleccionamos esta condición para la identificación de vecinos fisiológicos de FtsZ.

6.1.2 Caracterización del marcado de proteínas en las cepas que expresan APEX2

A continuación, se procedió a evaluar el marcado de proteínas mediado por APEX2 en las células vivas en las dos cepas en estudio. Las mismas se incubaron con FB, seguido de una corta exposición a H₂O₂. Luego de realizar el quenching, las bacterias se lisaron y las proteínas biotiniladas se analizaron por western blot. Por otro lado, los péptidos biotinilados obtenidos luego de una digestión con tripsina se purificaron por afinidad para su identificación y cuantificación por MS en un nano LC-MS/MS.

6.1.2.1 APEX2 es activa en el contexto bioquímico de *C. glutamicum*

En un primer experimento, se evaluaron las proteínas biotiniladas en las cepas *C.glu* y *C.glu_apex2-ftsZ* (inducción máxima) en presencia y/o en ausencia de los sustratos de APEX2: FB y H₂O₂. Como se observa en la Figura 35A, en ambas cepas y en ausencia de FB y/o H₂O₂, se detectaron pocas bandas, lo cual indica que la modificación con biotina está acotada en estas bacterias. También, la cepa *C.glu* en presencia de ambos sustratos no mostró un claro incremento en el número de bandas biotiniladas, lo que sugiere que la actividad de las peroxidasas endógenas en esas condiciones no es muy importante en *C. glutamicum*. Un aumento claro en las proteínas biotiniladas se observó únicamente cuando la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* se incubó con FB y H₂O₂. Esto confirma la correcta actividad de APEX2 en el contexto bioquímico de *C. glutamicum* y permite concluir que es posible llevar a cabo el marcado in vivo por proximidad bajo nuestras condiciones experimentales.

Para optimizar este proceso de marcado, se evaluó el efecto de la concentración de FB en la biotinilación de proteínas. Para ellos se realizaron western blots y se comparó el marcado utilizando 1mM de FB (Figura 35A) y 5mM FB (Figura 35B). Como se observa en la figura 35B, una concentración mayor de FB (5 mM) resultó en un aumento en el número de proteínas biotiniladas, reflejado en un mayor número de bandas de mayor intensidad.

Finalmente, se evaluó el marcado en la célula viva utilizando las concentraciones de inductor seleccionadas previamente (0.05% gluconato) para la *C.glu_apex2-ftsZ* y se compararon con el marcado obtenido para la cepa *C.glu_apex2*, usando distintos niveles de inductor, con el fin de seleccionar la mejor condición para filtrar el marcado inespecífico en los análisis posteriores por MS.

Como se puede ver en la Figura 35C, la actividad de APEX2 se corroboró en ambas cepas *C.glu_apex2* y *C.glu_apex2-ftsZ*. La cepa *C.glu_apex2* con 0.05% y 0.025% de gluconato mostró una mayor actividad de marcado que *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.05% de gluconato, lo que fue evidenciado por la mayor intensidad de las bandas biotiniladas. La cepa *C.glu_apex2* con 0.01% de gluconato produjo un patrón de biotinilación similar al de *C.glu_apex2-ftsZ* (0.05% de gluconato).

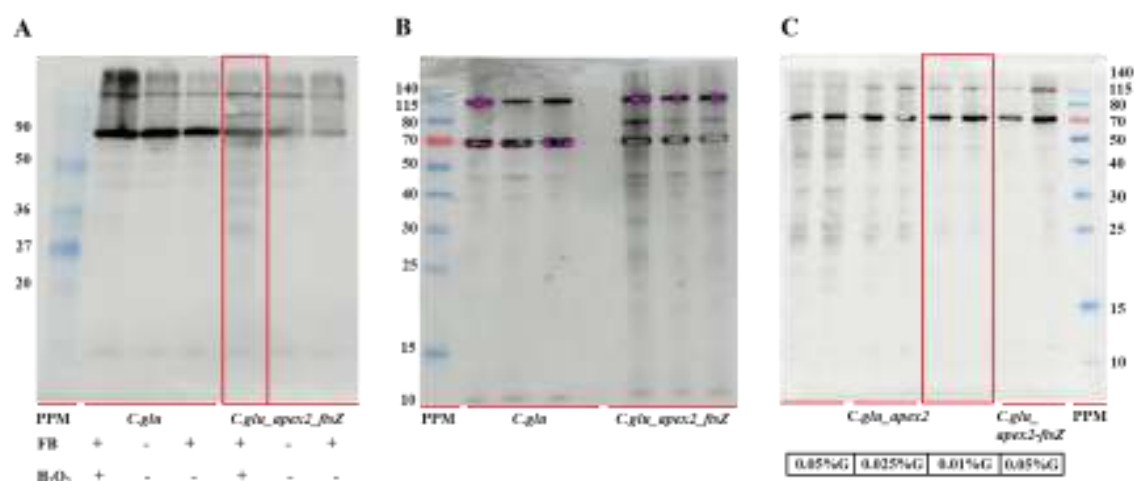


Figura 35: Evaluación de la actividad de APEX2 mediante western blot. Los extractos de proteínas de ambas cepas se separaron en una electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida al 12%. Se aplicaron 20 ug de proteínas previamente marcadas en la bacteria intacta en cada una de las condiciones mencionadas y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la membrana se incubó con un anticuerpo de estreptavidina conjugado con peroxidasa diluido 1/10000. El revelado se hizo usando el sustrato quimioluminiscente (Kit Super signal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Thermo) en el equipo automático ImageQuant 800 (Amersham). Se muestran 3 membranas: En **A)** se evaluaron 3 réplicas de las cepas C.glu y C.glu_apex2-ftsZ con gluconato 1%, en presencia o ausencia de los sustratos de APEX2 y usando una concentración de FB de 1mM (FB+/H₂O₂+, FB-/H₂O₂- y FB+/H₂O₂-). En **B)** se evaluaron 3 réplicas de C.glu y C.glu_apex2-ftsZ con gluconato 1%, en presencia de FB y H₂O₂, utilizando una concentración de FB 5 mM. En **C)** se evaluó el marcado usando FB 5mM para 2 réplicas de C.glu_apex2 con gluconato 0.05%, 0.025% y 0.01% y 2 réplicas de C.glu_apex2-ftsZ con gluconato 0.05%. A la izquierda (**A y B)** y derecha (**C)**, se indican los pesos moleculares del marcador utilizado (Thermo). Estos resultados confirman la correcta actividad de APEX2 en el contexto bioquímico de *C. glutamicum*.

En línea con estos resultados, el análisis proteómico comparativo por LC-MS/MS muestra que la inducción con gluconato 0.05% de la cepa C.glu_apex2-ftsZ produce niveles significativamente más bajos de APEX2 que la cepa C.glu_apex2 en las mismas condiciones de inducción (Tasa de cambio = 2.7; $p=0.0003$); pero comparables a los niveles obtenidos cuando se usa gluconato 0.01% para inducir la expresión de APEX2 en la cepa C.glu_apex2 (Tabla 7).

Tabla 7: Comparación de los niveles de APEX2 en la cepa la cepa C.glu_apex2-ftsZ y la cepa C.glu_apex2 con diferentes concentraciones de gluconato.

Condiciones	Tasa de cambio	Valor p
C.glu_apex2-ftsZ (0.05% gluconato) y C.glu_apex2 (0.05% gluconato)	2.73	3.86E-04
C.glu_apex2-ftsZ (0.05% gluconato) y C.glu_apex2 (0.01% gluconato)	1.33	6.01E-02

* La tasa de cambio corresponde al valor de (C.glu_apex2-ftsZ/C.glu_apex2). La inducción con 0.05% de gluconato genera casi 3 veces más APEX2 en la cepa C.glu_apex2 que en la cepa C.glu_apex2-ftsZ.

Por lo tanto, en función de la actividad de APEX2 y los niveles de expresión de proteínas, se seleccionó la cepa *C.glu_apex2* con gluconato 0.01% como control para la sustracción del marcado inespecífico.

6.1.2.2 La biotinilación por APEX2 ocurre en las células vivas

Como parte del desarrollo de esta estrategia de marcado por proximidad en las células vivas, se evaluó la eficiencia del quenching de la reacción de marcado. Para ello, se compararon los patrones de biotinilación de proteínas en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* cuando el quenching se realiza antes o después de la exposición a H_2O_2 (es decir, antes o después del marcado). Además, se incluyó un control sin H_2O_2 (no se inicia el marcado). Específicamente, se evaluaron 3 réplicas biológicas de las 3 condiciones con gluconato 0.05% y FB 5 mM, concentraciones antes seleccionadas; y se realizó un western blot usando estreptavidina conjugado con peroxidasa.

En la Figura 36 se observa la ausencia de actividad de APEX2 en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*, tanto en las muestras sin H_2O_2 como en aquellas en las que se añadió la solución de quenching antes de la exposición al H_2O_2 . Solo se detectó un aumento de proteínas biotiniladas en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* donde se realizó el quenching después del marcado. Este resultado confirma que la inhibición de la reacción funciona correctamente y por lo tanto que los eventos de biotinilación detectados ocurren en las células vivas y no durante las etapas posteriores de procesamiento.

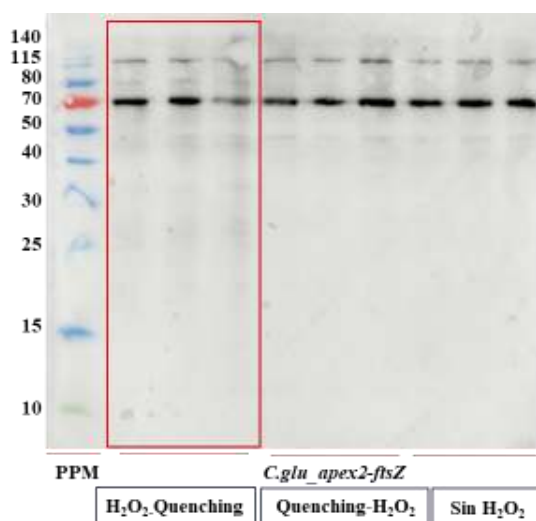


Figura 36: Evaluación de la eficiencia del quenching de la reacción por western blot. Los extractos de proteínas de la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* se separaron en una electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida al 12%. Se aplicaron 20 ug de proteínas y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la membrana se incubó con estreptavidina conjugado con

peroxidasa diluido 1/10000. El revelado se hizo usando el sustrato quimioluminiscente (Kit Super signal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Thermo) en el equipo automático ImageQuant 800 (Amersham). Se evaluaron 3 réplicas biológicas de la cepa C.glu_apex2-ftsZ con gluconato 0.05% y FB 5 mM. Se testearon 3 condiciones; cuando se realizó el quenching antes (quenching- H₂O₂) o después del marcado (exposición a H₂O₂ y FB) (H₂O₂-quenching) y un control sin H₂O₂ (sin H₂O₂). En la membrana se muestran 3 réplicas biológicas de cada condición. A la izquierda se indican los pesos moleculares del marcador utilizado (Thermo). Este resultado confirma que el marcado ocurre en las células vivas y no después de la lisis.

6.1.2.3 El pulso de H₂O₂ no afectó la oxidación de metioninas

Se evaluó si la corta exposición a H₂O₂ producía cambios en los niveles de péptidos oxidados que pudiesen alterar la identificación de vecinos a posteriori. Para ello, se compararon los péptidos identificados en la cepa C.glu_apex2-ftsZ (0.05% de gluconato) cuando se realizó el quenching antes o después de la exposición a H₂O₂, evaluando 3 réplicas biológicas de cada condición. Los aminoácidos con grupos funcionales que contienen azufre presentan mayor susceptibilidad a la oxidación ²⁷¹. Dado que, en nuestro caso las Cys están alquiladas con IAM, el análisis se centró en los péptidos que contienen Met, ya que son los más sensibles a la exposición al H₂O₂ en estas condiciones. La Met sulfóxido es el principal producto de la oxidación de Met, con un aumento de masa de +15.9949 Da.

Por tanto, se evaluó el porcentaje de espectros de los péptidos con Met oxidadas (+15.9949 Da), respecto al total de espectros asignados a los péptidos totales. El resultado mostró que $1.76\% \pm 0.58$ y $1.87\% \pm 0.17$ de los espectros contenían Met oxidada, cuando el quenching se realiza después o antes del H₂O₂. Mediante el estadístico Cohen's d se comprobó que en nuestras condiciones experimentales la exposición a H₂O₂ no produce un incremento estadísticamente significativo en la oxidación de Met (d=0.24) (Figura 37).

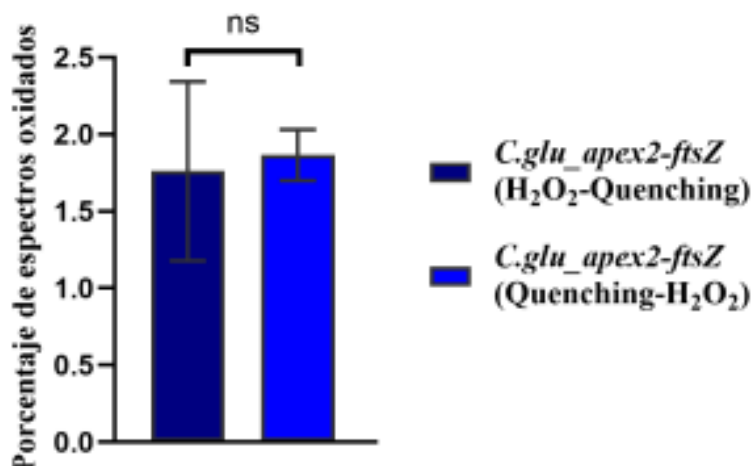


Figura 37: Efecto de la exposición al H₂O₂ en la oxidación de Met. Se evaluaron dos condiciones: cuando se realizó el quenching antes o después de la exposición a H₂O₂. Se promediaron los espectros de los péptidos conteniendo Met oxidadas para las 3 réplicas biológicas en ambas condiciones. El gráfico de barras muestra el porcentaje de espectros asignados a péptidos con Met oxidadas respecto al total de espectros asignados a los péptidos totales para cada condición ± DE: 1.76% ± 0.58 cuando se realizó el quenching después de la exposición a H₂O₂; y 1.87% ± 0.17 cuando se realizó el quenching antes del H₂O₂. Estos resultados muestran que la corta exposición al H₂O₂ no produce un incremento significativo en la oxidación de Met.

6.1.2.4 Detección y confirmación de péptidos biotinilados

Después de seleccionar las condiciones de marcado, se procedió a identificar proteínas y péptidos modificados con FB por MS.

Para esto, 3 réplicas biológicas de la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* y de la cepa *C.glu_apex2* se sometieron al procedimiento de marcado. Luego de la digestión enzimática, los péptidos biotinilados se recuperaron mediante cromatografía de afinidad y se analizaron en un sistema de nano LC-MS/MS. Esta estrategia, en comparación con la que se basa en la purificación de proteínas después del marcado, tiene la ventaja de maximizar la detección de péptidos modificados con FB, lo que constituye una huella de que la proteína estuvo en las proximidades de APEX2 y además proporciona información topológica acerca de las regiones que interaccionan ²²⁹.

Se analizó el número total de péptidos y espectros identificados luego de la purificación, y aquellos que estaban modificados con FB (detectados al permitir considerar la modificación +361.1460 Da en péptidos conteniendo Tyr o Trp en la búsqueda en bases de datos). Como se observa en la Figura 38 A y B, la mayoría de los péptidos y de los espectros (promedio en las tres réplicas, 13669 ± 1218 y 66115 ± 5582, respectivamente),

identificados a partir del enriquecimiento de péptidos biotinilados en la cepa C.glu_apex2-ftsZ, no están modificados con FB. Es decir, estamos obteniendo una gran cantidad de péptidos que o bien están endógenamente biotinilados o se pegan inespecíficamente a la columna. Solo 600 ± 144 péptidos y 3545 ± 945 espectros (promedio de las 3 réplicas evaluadas) se identificaron como modificados con FB cuando se realizó la búsqueda en bases de datos considerando que la modificación puede involucrar los residuos de Tyr o Trp.



Figura 38: Identificación de péptidos recuperados por cromatografía de afinidad luego del marcado por APEX2 en la cepa C.glu_apex2-ftsZ. Los datos se procesaron en PatternLab for Proteomics V. Se calculó el promedio de péptidos y espectros no modificados y modificados con FB (detectados al permitir considerar la modificación +361.1460 Da en péptidos conteniendo Tyr o Trp en la búsqueda en bases de datos) y su DE a partir de las 3 réplicas biológicas evaluadas. En **A)** Análisis de los péptidos no modificados con FB y modificados con FB: 13669 ± 1218 péptidos no modificados y 600 ± 144 péptidos modificados con FB. En **B)** Análisis de los espectros: 66115 ± 5582 no modificados y 3545 ± 945 modificados con FB.

Para eliminar los péptidos no marcados presentes en las muestras y obtener así resultados confiables, se aplicó un primer filtro y se seleccionaron los péptidos que contenían específicamente la modificación con FB; de ahí la importancia de purificar péptidos y no proteínas. El gráfico de barras de la Figura 39 muestra el promedio del porcentaje de péptidos y espectros modificados en Tyr y Trp $\pm$ DE. En concordancia con lo previamente reportado, la Tyr es el aminoácido modificado con mayor frecuencia²⁷². En promedio, el $98.9\% \pm 0.7$ de todos los espectros asignados a péptidos modificados con FB correspondieron a modificaciones en Tyr ($96.7\% \pm 0.7$ de péptidos modificados), mientras que sólo el $1.1\% \pm 0.2$ de los espectros estaban modificados en residuos de Trp ($3.3\% \pm 0.2$ de péptidos modificados).

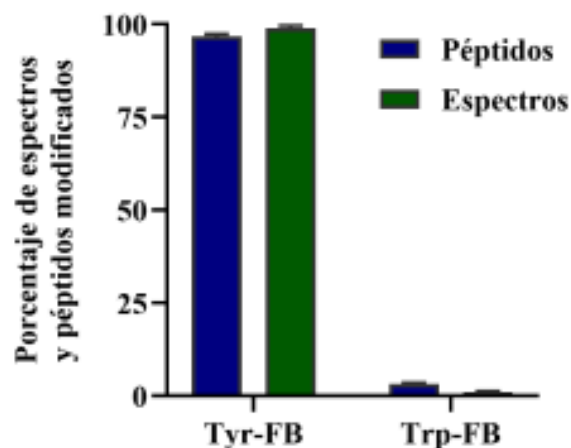
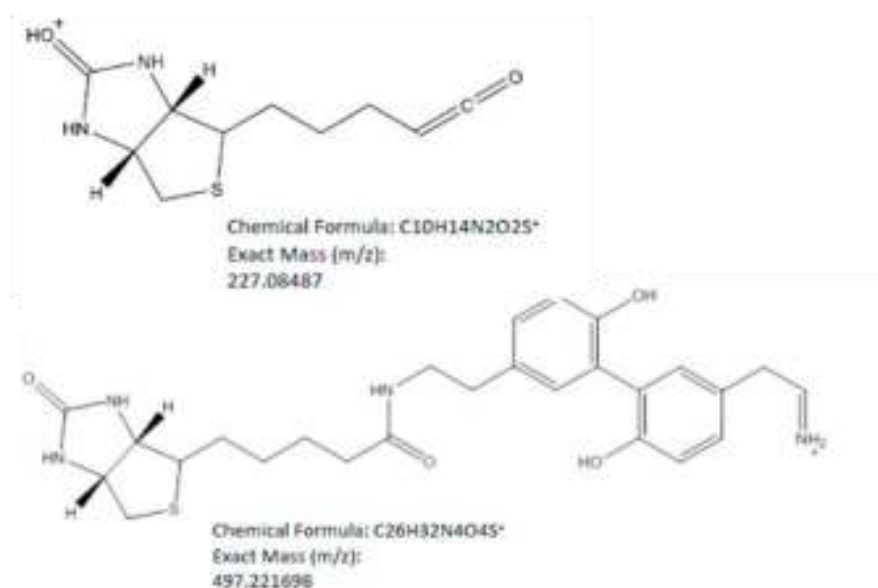


Figura 39: Análisis de los péptidos modificados con FB. Se evaluaron 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas de la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*; y las mismas se marcaron incubando con FB y un corto pulso de H_2O_2 . Los datos se procesaron en PatternLab for Proteomics V. A partir de los péptidos y espectros modificados con FB, se calculó el porcentaje de los que se modificaron en Tyr y en Trp. En Tyr, se modificaron con FB $96.7\% \pm 0.7$ péptidos que corresponden al $98.9\% \pm 0.7$ de los espectros. En Trp, se modificaron con FB $3.3\% \pm 0.2$ péptidos lo que representa el $1.1\% \pm 0.2$ del total de espectros modificados. Se muestra el promedio $\pm$ DE.

Posteriormente, se analizaron los espectros de fragmentación de los péptidos que contenían Tyr modificada con FB. El espectro MS/MS de estos péptidos mostró sistemáticamente la presencia de dos iones diagnósticos intensos: $m/z=480.19$ (ión imonio de FB-Tyr-NH₃) y $m/z=497.22$ (ión imonio de FB-Tyr) además del ión dehidrobiotina ($m/z=227.08$). Las estructuras químicas de los iones diagnósticos ²⁷² se muestran en la Figura 40.

A



B



Figura 40: A) Estructuras químicas de los iones diagnósticos de $m/z=497.22$ (ion imonio de FB-Tyr) y de $m/z=227.08$ (ion dehidrobiotina). El ión de m/z 480.19 corresponde al ión imonio de FB-Tyr-NH₃. Adaptada de Udeshi y cols. 2017 ²⁷². **B)** Espectro de masa representativo de un péptido presente en la proteína SepF, que contiene residuos de Tyr modificados con FB. Se muestra la presencia de los 2 iones diagnósticos más intensos.

Para calcular la distribución relativa de los tres iones diagnósticos en nuestro conjunto de datos, se seleccionaron los péptidos y espectros detectados con la modificación +361.1460 Da y que contenían al menos uno de los iones diagnósticos, aceptando un error de 20 ppm. Se calculó el porcentaje de espectros con los iones diagnósticos respecto al total de modificados (+361.1460 Da) para cada réplica y luego se determinó el promedio. El porcentaje de espectros modificados que presentaban los diferentes iones fue del 5.71%

para $m/z=227.08$, 81.01% para m/z 497.22 y 87.01% para m/z 480.19 (Tabla 8). Por lo tanto, para disminuir las identificaciones de falsos positivos y seleccionar las asignaciones correctas, además de identificar automáticamente los escaneos asignados a la modificación de FB (+361.1460 Da), se seleccionaron los que contienen también cualquiera de los dos iones diagnósticos más intensos en los espectros MS/MS (m/z 480.19 o m/z 497.22).

Tabla 8: Distribución relativa de los iones diagnósticos

Iones diagnósticos		% Espectros
480.19	Tyr-FB-NH3	87.01
497.22	Tyr-FB	81.01
227.08	Dehidrobiotina	5.71

La confirmación de los péptidos y espectros etiquetados con FB que contienen iones diagnósticos en su espectro de MS/MS, es una tarea laboriosa y requirió una validación manual, la cual puede dar lugar a errores y limitar la reproducibilidad. Teniendo en cuenta esto, en colaboración con el Dr Marlon dos Santos, desarrollamos un nuevo módulo en el programa de análisis PatternLab V que permite automatizar la detección de espectros modificados que contienen los iones diagnósticos ²⁷⁰. Este nuevo módulo, denominado APEX, mejora esta metodología porque incorpora un sistema automatizado en la etapa de validación. Inicialmente se realiza la búsqueda en bases de datos, donde se incluye la modificación variable de residuos de Tyr por FB (+361.1460 Da) y se filtran los resultados con una estricta Tasa de Descubrimientos Falsos (FDR) del 1%. Posteriormente, se usa el módulo APEX para filtrar los espectros que contienen los iones diagnósticos, lo que permite validar la modificación de los péptidos y de las proteínas que los contienen. A partir de estos resultados, se realizan los análisis de SC y/o XIC a través de los módulos estadísticos VD y T-fold como se describió anteriormente, pero enfocándose ahora solamente en péptidos modificados. Esta herramienta bioinformática no solo fue útil en el marco de nuestro proyecto, sino que permitirá mejorar los análisis de grandes datos proteómicos en experimentos de marcado por proximidad, dando mayor robustez a los resultados obtenidos a partir de esta metodología. Por tanto, recientemente

publicamos la descripción de este nuevo módulo APEX, junto con un protocolo para su uso²⁷⁰.

6.2 Identificación de proteínas vecinas de FtsZ en *C. glutamicum*

Una vez optimizada la metodología de marcado por proximidad y la estrategia bioinformática para el análisis de datos, se procedió a identificar proteínas ubicadas en las cercanías de FtsZ en las células vivas. Para ello, se realizó el marcado en presencia de FB y H₂O₂ en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* y la cepa control *C.glu_apex2*, utilizando 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas para cada condición. El uso de la cepa que solamente expresa la peroxidasa APEX2 es de vital importancia no sólo para remover las proteínas retenidas inespecíficamente en la cromatografía de afinidad y aquellas endógenamente biotiniladas, sino también para sustraer proteínas que se marcan con FB en forma inespecífica (proteínas ribosomales durante la síntesis de APEX, proteínas citosólicas abundantes, etc). Luego, se digirieron las proteínas obtenidas de cada cepa y los péptidos biotinilados se enriquecieron mediante cromatografía de afinidad y se analizaron en un nano LC-MS/MS.

El análisis se realizó considerando la modificación con FB (+361.1460 Da) en los residuos de Tyr y utilizando el nuevo módulo APEX del software Patternlab V para realizar las comparaciones de péptidos y espectros modificados que presentaron al menos uno de los 2 iones diagnósticos más intensos de dicha modificación en los espectros MS/MS: $m/z=480.19$ y $m/z=497.22$. En la Figura 41 se muestra la distribución de los péptidos modificados con FB, y cuántos de esos péptidos contienen al menos uno de los 2 iones diagnósticos, para cada una de las réplicas.

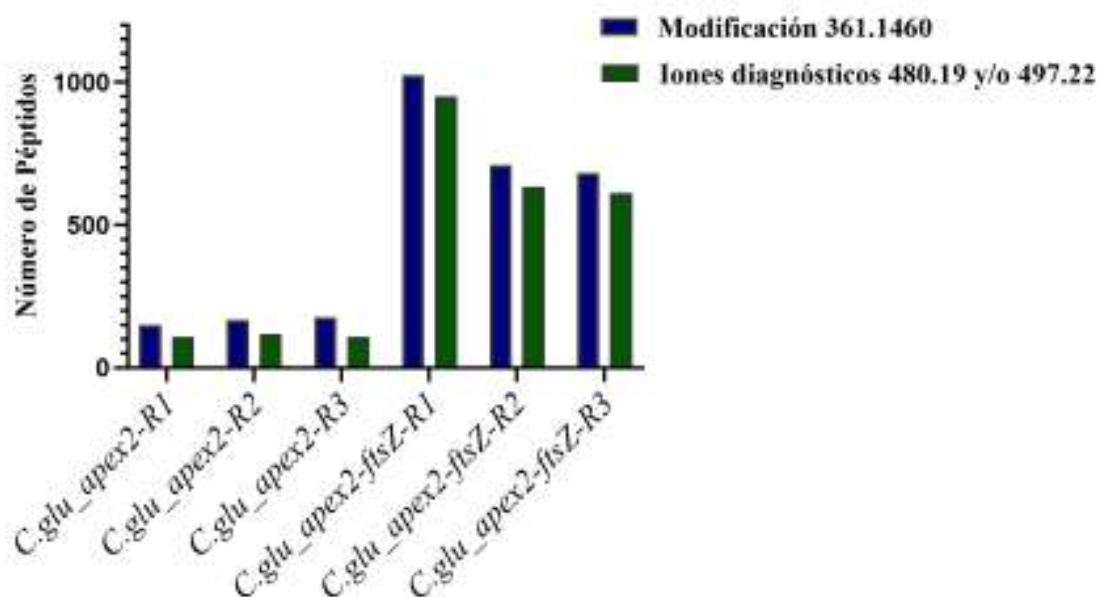


Figura 41: Análisis de los péptidos modificados con FB en las cepas *C.glu-apex2-ftsZ* y *C.glu-apex2*. El análisis se realizó con el módulo APEX del PatternLab for proteomics. Se usó como tolerancia de error en la masa de los fragmentos: 20 ppm y un umbral para la intensidad de iones diagnósticos del 5%. Las barras azules indican la cantidad de péptidos modificados con FB en Tyr (+361.1460 Da) identificados por búsqueda en base de datos. Se identificaron 150, 167 y 175 péptidos modificados con FB en cada una de las réplicas de *C.glu-apex2*, y, 1024, 710 y 683 péptidos en las 3 réplicas de *C.glu-apex2-ftsZ*. Las barras verdes indican la cantidad de estos péptidos modificados que fueron confirmados por la presencia de al menos uno de los 2 iones diagnósticos más intensos de esta modificación: $m/z=480.19$, $m/z=497.22$. En las 3 réplicas de *C.glu-apex2* se confirmaron 108, 118 y 108 péptidos y 950, 633 y 612 en las 3 réplicas de *C.glu-apex2-ftsZ*.

Posteriormente, para la identificación de las proteínas vecinas de FtsZ, se realizó un análisis cuantitativo libre de marca basado en el conteo de espectros para comparar los péptidos y proteínas recuperadas a partir de las cepas *C.glu_apex2-ftsZ* y *C.glu_apex2*. Se utilizó el módulo VD para identificar los péptidos y proteínas que solo se detectan marcados en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*. Como se ve en la Figura 42A, se identificaron un total de 619 péptidos modificados con FB y confirmados con los iones diagnósticos. Como es de esperar, la mayoría de estos péptidos sólo se detectan en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* (472), mientras que los restantes 147 péptidos se detectaron en ambas cepas. No se detectan péptidos modificados con FB exclusivos de la situación control. Se consideraron los péptidos detectados en 3 y 2 réplicas, y el número de espectros con el que se detecta cada péptido oscilan entre 3 a 82 (Tabla Suplementaria 3).

Para el análisis comparativo de los niveles de estos 147 péptidos modificados comunes en ambas cepas, se usó el módulo T-fold. Como se ve en la Figura 42B y en la Tabla

Suplementaria 4, se encontró que sólo 46 de estos péptidos están aumentados significativamente en una de las dos condiciones, y 22 de ellos específicamente en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*. Estos 22 péptidos tienen una tasa de cambio entre 1.3 y 13.

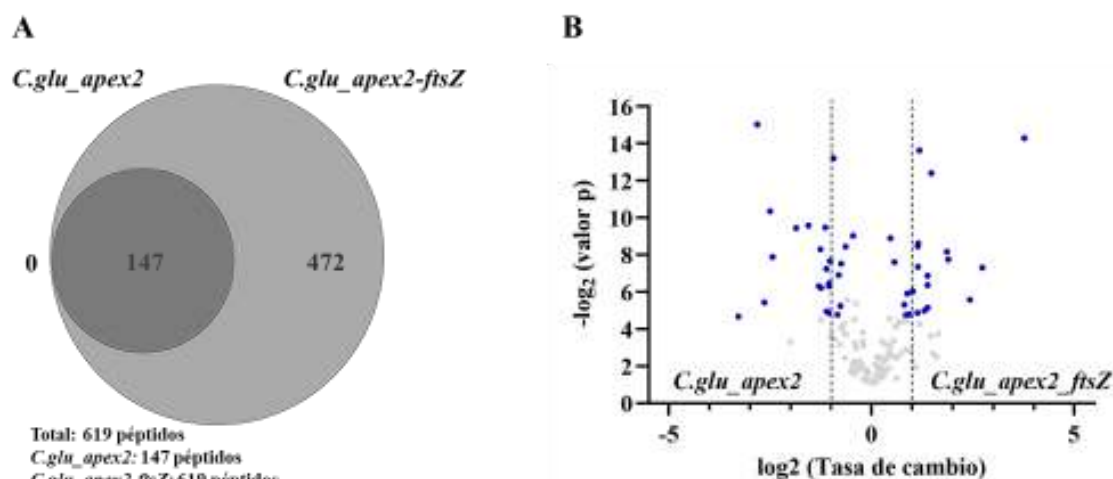


Figura 42: Análisis proteómico cuantitativo y comparativo de los péptidos identificados con la modificación de FB (+361.1460 Da) y confirmados con al menos uno de los iones diagnósticos ($m/z=480.19$ y $m/z=497.22$), en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* y la cepa control *C.glu_apex2*, utilizando nano LC-MS/MS. Se analizaron 3 réplicas biológicas y 2 inyecciones técnicas por réplica biológica. En **A**) se muestran los péptidos detectados exclusivamente en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* (472) y en la cepa *C.glu_apex2* (0) mediante el análisis del módulo estadístico VD ($p < 0.05$). Se identificaron un total de 619 péptidos en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* y 147 en la cepa *C.glu_apex2* (Tabla Suplementaria 3). En **B**) se representan los péptidos identificados en ambas cepas (cada péptido se representa con un círculo), y en azul se marcan aquellos que muestran una diferencia estadística en sus niveles, mediante el análisis del módulo T-Fold. Para el análisis del conteo de espectros se tomaron en cuenta los péptidos presentes en al menos 4 de las 6 réplicas biológicas consideradas (F-stringency: 0.08; L-stringency: 0.4, valor p ajustado < 0.05). En el gráfico de volcán se representa el $\log_2(\text{valor } p)$ en el eje Y y el $\log_2(\text{tasa de cambio})$ en el eje X. Se detectaron 46 péptidos con niveles estadísticamente diferentes entre ambas condiciones (la información de cada una se muestra en la Tabla Suplementaria 4). Los puntos grises representan péptidos que no presentan cambios estadísticamente significativos.

Para definir la lista final de vecinos de FtsZ, se infirieron las proteínas a partir de los péptidos modificados. Se consideró una proteína como exclusiva de una condición cuando todos sus péptidos modificados fueron solamente detectados en esa condición y se cumplen los parámetros estadísticos. Las proteínas sobrerrepresentadas serán aquellas para las cuales se identificaron péptidos modificados en ambas condiciones, pero con niveles estadísticamente diferentes entre condiciones. Como muestra la Figura 43A y en la Tabla Suplementaria 5, se identificaron un total de 292 proteínas en las cepas *C.glu_apex2-ftsZ* y *C.glu_apex2*. De ellas, 198 se detectaron exclusivamente en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*, mientras que en la cepa *C.glu_apex2* no se detectó ninguna proteína exclusiva, y 94 restantes aparecen en ambas condiciones. La distribución de los espectros

por proteína fue variable, con algunas proteínas representadas por tan solo 3 espectros, mientras que otras alcanzaron hasta 447 espectros. Estas diferencias pueden deberse a la abundancia relativa de las proteínas, pero también a su cercanía a la proteína FtsZ en la célula.

El análisis estadístico de las proteínas comunes a ambas cepas, usando el módulo T-fold, mostró que, de las 94 proteínas, 28 de ellas están enriquecidas, estadísticamente, en una de las dos condiciones, y 13 de ellas específicamente en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*. De estas 13 proteínas, 10 tienen una tasa de cambio mayor a 2 (Figura 43B y Tabla Suplementaria 6) y por tanto se incluyen en la lista de vecinos de FtsZ.

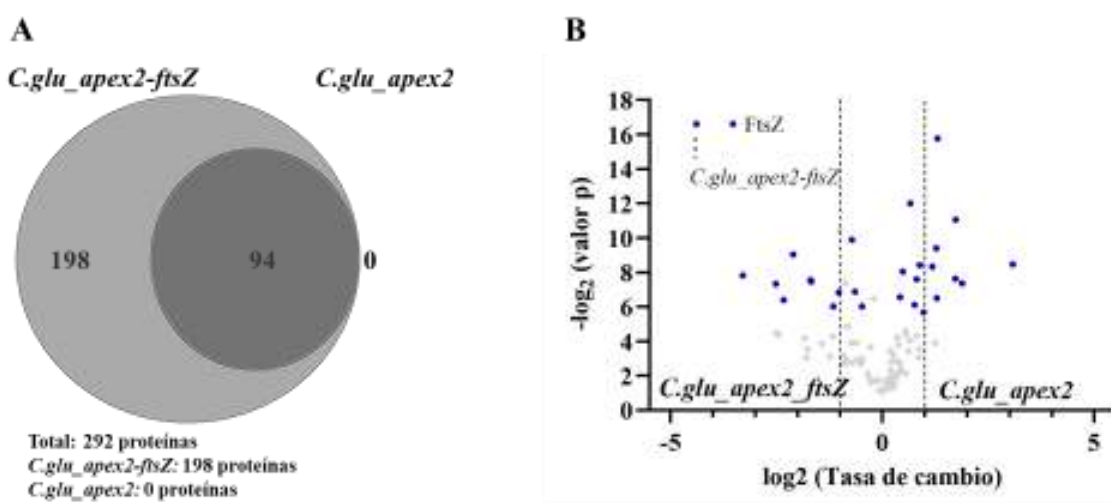


Figura 43: Análisis proteómico cuantitativo y comparativo de las proteínas identificadas (a partir del análisis de péptidos) con la modificación de FB (+361.1460 Da) y confirmados con uno de los iones diagnósticos, en las cepas *C.glu_apex2-ftsZ* y *C.glu_apex2*. Se analizaron 3 réplicas biológicas y 2 inyecciones técnicas por réplica biológica. En **A**) se muestran las proteínas detectadas exclusivamente en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* (198) y en la cepa *C.glu_apex2* (0) mediante el análisis del módulo estadístico VD ($p < 0.05$). Se identificaron 292 proteínas modificadas en total (Tabla Suplementaria 3). En **B**) se representan las proteínas modificadas con FB en ambas cepas. Para el análisis cuantitativo se realizó el conteo de espectros tomando en cuenta las proteínas presentes en al menos 4 de las 6 réplicas biológicas consideradas (F-stringency: 0.01; L-stringency: 0.4, valor p ajustado < 0.05). En el gráfico de volcán se representa el $\log_2(\text{valor } p)$ en el eje Y y el $\log_2(\text{tasa de cambio})$ en el eje X. Los puntos azules corresponden a las 28 proteínas con niveles estadísticamente diferentes entre ambas condiciones (la información de cada una se muestra en la Tabla Suplementaria 4). Los puntos grises representan proteínas que no presentan cambios estadísticamente significativos.

Teniendo en cuenta, tanto las proteínas presentes exclusivamente en *C.glu_apex2-ftsZ* como las que están aumentadas estadísticamente, se identificaron un total de 211 proteínas que representan posibles vecinos de FtsZ en células vivas. Como era de esperarse, APEX2-FtsZ fue una de las proteínas más marcadas en nuestro conjunto de datos, con 161 espectros modificados asignados a su secuencia y una alta tasa de cambio.

En la lista de proteínas obtenidas de forma exclusiva en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*, se encontró que la proteína identificada con mayor número de espectros, presente en las 3 réplicas biológicas evaluadas, es la proteína de membrana SepF (447 espectros). SepF es una proteína conocida del divisoma y, hasta ahora, la única proteína de anclaje de FtsZ a la membrana en *C. glutamicum*. También recuperamos a Wag31, la proteína de andamiaje del elongasoma en *Mycobacteriales* y a la proteína recientemente reportada por nuestro grupo como integrante del divisoma e interactor de FtsZ; Glp (MoeA1) ¹⁶⁸. La presencia de estas proteínas, que se sabe que forman parte del divisoma y se localizan en el septo, en nuestra lista de vecinos de FtsZ, valida nuestra estrategia experimental y refuerza la relevancia del resto de las proteínas identificadas.

Cabe destacar que la lista de vecinos de FtsZ contiene un número importante de proteínas hipotéticas y/o no caracterizadas, muchas de ellas proteínas de membrana, las cuales representan posibles nuevos miembros del divisoma de los *Mycobacteriales*. Una de las principales lagunas en nuestro conocimiento actual es cómo el anillo Z de este grupo de bacterias se ancla en la membrana ya que con la clara excepción de SepF, las proteínas que son responsables de este anclaje en los bacilos modelo no están codificadas en el genoma de los *Mycobacteriales* ^{151,273}. Por lo tanto, se seleccionaron las siete proteínas de membrana hipotéticas en esta lista de vecinos de FtsZ para su posterior validación como componentes del divisoma (Tabla 9).

Tabla 9: Proteínas de división celular y proteínas hipotéticas de membrana identificadas como vecinos de FtsZ

Descripción de las proteínas	Gen	Identificador uniprot	Número de espectros modificados con FB	Número de péptidos modificados con FB	Número de réplicas
Proteína de división celular SepF	sepF	Q8NNN6	447	17	3
Molybdopterin molybdenumtransferase (Glp)	Cgl0883	Q8NS03	26	3	3
Proteína de síntesis de la pared celular Wag31	Cgl2150	Q8NNN8	43	1	3
Proteína de membrana hipotética	Cgl1266	Q8NR01	51	3	3
Proteína de membrana hipotética	Cgl0298	Q8NTK9	18	1	3
Proteína de membrana hipotética	Cgl2210	Q8NNI9	13	1	3
Proteína de membrana hipotética	Cgl2198	Q8NNK0	9	1	3
Proteína de membrana hipotética	Cgl2839	Q8NLU7	7	1	3
Proteína de membrana hipotética	Cgl2374	Q8NN39	6	1	2
Proteína de membrana hipotética	Cgl2990	Q8NLF2	5	1	2

De estas 7 proteínas, 6 están conservadas en las Mycobacteriales, lo cual sugiere que puedan estar desempeñando el mismo rol en el proceso de división celular (Figura Suplementaria 1, análisis realizado por Daniela Megrian).

En la Figura 45 se muestra la estructura y topología predicha para cada una de las 7 proteínas, y se indican los residuos de Tyr modificados experimentalmente durante el marcado por proximidad. Como se puede ver, todos estos residuos modificados se encuentran efectivamente en los dominios citosólicos de las proteínas, lo que refuerza la posibilidad que la modificación encontrada se deba a su cercanía con FtsZ.

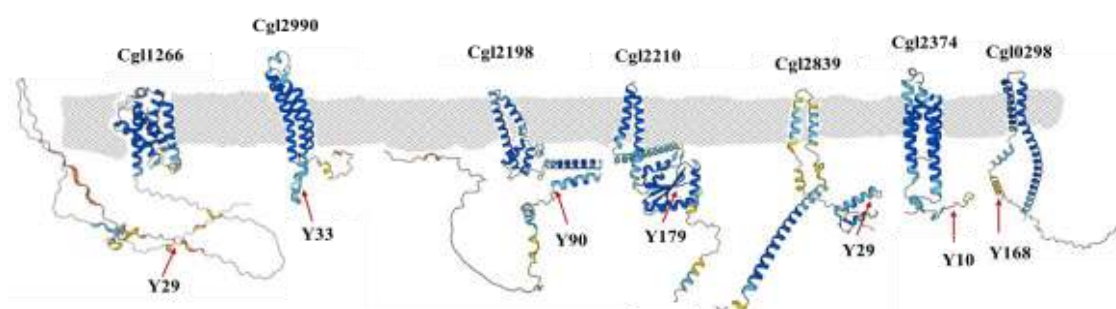


Figura 45: Estructura y topología de las 7 proteínas seleccionadas a validar como componentes del divisoma. Las estructuras de las proteínas se obtuvieron mediante AlphaFold. La topología de las mismas se predijo a través del algoritmo DeepTMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepTMHMM-1.0/>). Los residuos modificados identificados experimentalmente se indican con una flecha.

6.3 Validación de la localización subcelular de las proteínas candidatas: localización en el septo

Para evaluar si estas 7 proteínas hipotéticas de membrana podrían representar nuevos componentes del divisoma, se estudió su localización subcelular.

Los 7 candidatos seleccionados se sobreexpresaron en *C. glutamicum* y se fusionaron a la proteína verde fluorescente mNeon, con el objetivo de evaluar su localización subcelular por microscopía confocal de fluorescencia. Estos experimentos y análisis se hicieron en colaboración con la Dra Jessica Rossello. En la Figura 46A se muestra una imagen representativa de cada cepa y como se puede ver, para todos los candidatos, la intensidad del fluoróforo mNeon se acumula y localiza en el septo. Sin embargo, dado que estos candidatos son proteínas de membrana y en el septo se forma una doble membrana, quisimos corroborar que ese aumento de la intensidad está relacionado con su localización específica en el septo y no a una distribución a lo largo de toda la membrana.

Con este objetivo, se usó también la tinción con Rojo Nilo, que se une a la membrana, como control para normalizar y confirmar la localización (Figura 46B).

En la Figura 46C se muestra la superposición de ambos fluoróforos.

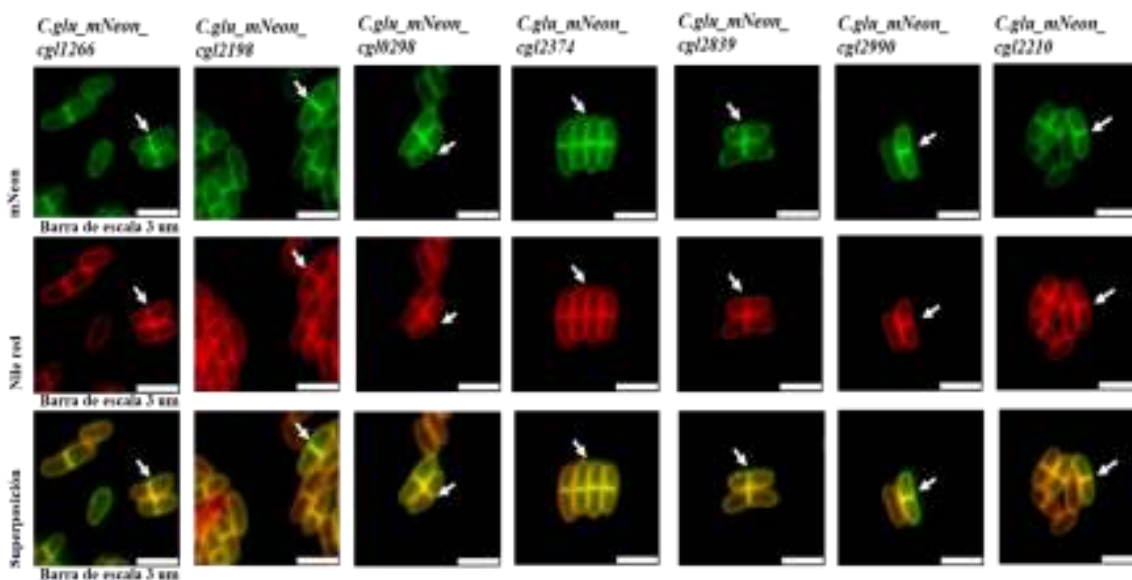


Figura 46: Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia con mNeon y Rojo Nilo, que muestran que las 7 proteínas seleccionadas se localizan en el septo. Estas imágenes se obtuvieron por microscopía confocal. Barras de escala de 3 μ m. Se muestran las células con los 2 fluoróforos usados: mNeon, Rojo Nilo y la superposición de ambos fluoróforos.

Para confirmar de manera estadística esta localización subcelular de las proteínas candidatas, se obtuvo la intensidad de fluorescencia del septo y los polos en aproximadamente 300 células con el programa Imaje J. Para este análisis, se comparó el cociente de la intensidad de fluorescencia del septo y la intensidad promedio de los polos del mNeon con la del Rojo Nilo. En la Figura 47A se muestra un ejemplo con una célula de cómo se realizó este análisis.

En la Figura 47B se muestra el cociente de la intensidad de fluorescencia del septo y la intensidad promedio de los polos del mNeon y del Rojo Nilo para todas las cepas a través de gráficos de cajas. El análisis estadístico se muestra con los valores de Cohen's d. Como se ve, la relación de intensidad septo/polos es mayor y estadísticamente significativa para el mNeon en las cepas que sobreexpresan las 7 proteínas candidatas. Este resultado confirma la localización de estas proteínas en el septo, y junto con su identificación, consistente como vecinos de FtsZ, nos permite postular que representan nuevos integrantes del divisoma de los Mycobacteriales.

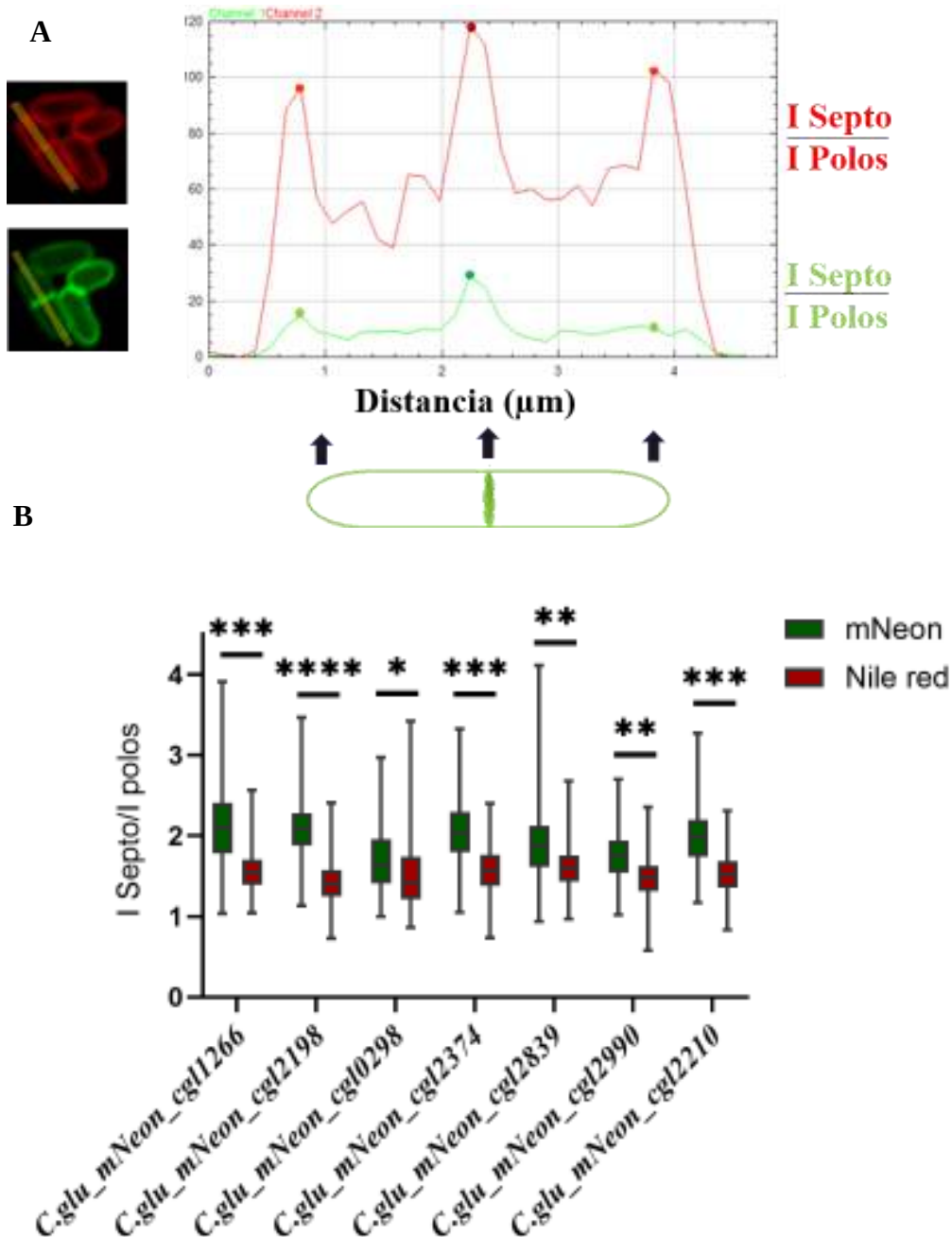


Figura 47: A) Gráfico de intensidad de fluorescencia en función de la distancia (μm) para una célula representativa. El gráfico muestra la señal de mNeon (verde) y Rojo Nilo (rojo); los puntos destacados corresponden a la localización en los polos y en el septo de la célula, como se indica en el esquema inferior. **B)** Gráficos de cajas mostrando el cociente de la intensidad de fluorescencia del septo y los polos para las cepas expresando las 7 proteínas candidatas. El verde corresponde al cociente de Intensidades de mNeon y el rojo de Rojo Nilo. La significancia indicada corresponde a los valores de Cohen's d, donde se comparó la intensidad de fluorescencia de ambos fluóforos: Cgl1266 (***, $d = 1.40$), Cgl2198 (****, $d = 2.17$), Cgl0298 (*, $d = 0.53$), Cgl2374 (***, $d = 1.46$), Cgl2839 (**, $d = 0.88$), Cgl2990 (**, $d = 0.99$) y Cgl2210 (***, $d = 1.56$). Para estos análisis estadísticos se contaron: 315 células para la Cgl1266, 311 células para la Cgl2198, 349 células para la Cgl0298, 301 células para la Cgl2374, 315 células para la Cgl2839, 306 células para la Cgl2990 y 301 células para la Cgl2210.

6.4 Exploración del rol de la fosforilación de proteínas en el ensamblaje del divisoma de *C. glutamicum*

Diversas evidencias apuntan a que la fosforilación de proteínas podría jugar un papel importante en la división celular y el ensamblaje del divisoma, en este grupo de bacterias. De hecho, la proteína FtsZ está fosforilada en los Mycobacteriales como lo muestran varios estudios fosfoproteómicos ^{177,178}. Además, estudios in vitro corroboran que FtsZ es sustrato de varias Ser/Thr quinasas de proteínas, incluida PknA, que se ha postulado como la principal quinasa responsable de la fosforilación de FtsZ de acuerdo a evidencias in vivo e in vitro ¹⁵¹. Con el objetivo de evaluar si la ausencia de PknA modifica la composición del divisoma, se transformó una cepa de *C. glutamicum* KO para PknA con el plásmido correspondiente a la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*. A esta cepa la denominamos *C.glu_ΔpknA_apex2-ftsZ*.

6.4.1 APEX2_FtsZ se expresa correctamente en la cepa *C.glu_ΔpknA_apex2-ftsZ*

Para explorar el entorno proteómico de FtsZ en esta cepa deficiente de PknA, primeramente, se hicieron varios controles, como ya se mostró para la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*. Uno de ellos, es evaluar la correcta expresión de esta construcción. Se cultivó la cepa *C.glu_ΔpknA_apex2-ftsZ* con 0.05% de gluconato, concentración seleccionada y usada para el experimento en el cual se identificaron las proteínas vecinas de FtsZ en *C. glutamicum*. Además, como controles de este experimento, se cultivó también la cepa control *C.glu_apex2* con 0.01% y 0.05% de gluconato y la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* con 0.05% de gluconato.

En la Figura 48 se muestra el western blot para comprobar la expresión de las proteínas APEX2-FtsZ y APEX2 en las cepas evaluadas. Tanto la cepa *C.glu_ΔpknA_apex2-ftsZ* como la cepa control *C.glu_apex2-ftsZ*, tienen una única banda con un PM de aproximadamente 77 kDa, y la otra cepa control *C.glu_apex2* con 0.01% y 0.05% de gluconato, también presentan una banda principal de aproximadamente 30 kDa, como es de esperar en todos los casos. Además, se puede ver, que la banda correspondiente a la cepa *C.glu_apex2* con 0.05% de gluconato es mucho más intensa, respecto a las otras bandas, y este resultado refuerza la selección de la concentración 0.01% de gluconato para esta cepa control.

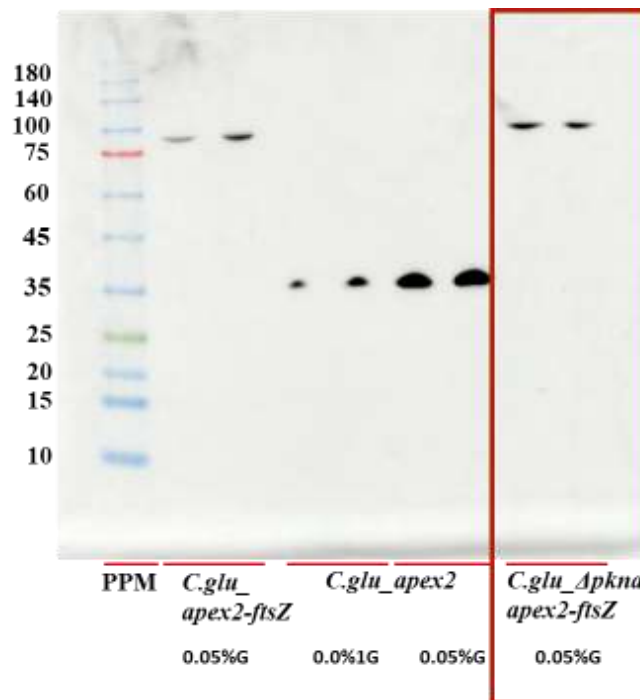


Figura 48: Análisis de la expresión de las proteínas APEX2-FtsZ y APEX2 por western blot usando un mAb anti-FLAG. Los extractos de proteínas de todas las cepas se separaron en una electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida al 12% y cargando 20 ug de proteínas por carril. Posteriormente, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el anticuerpo anti-FLAG a una dilución de 1/5000, seguida de una incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa, diluido 1/10000. El revelado se hizo usando el sustrato quimioluminiscente (Kit Super signal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Thermo) y la imagen fue capturada utilizando el equipo automatizado ImageQuant 800 (Amersham). A la izquierda se indican los pesos moleculares del marcador utilizado (Thermo). Los resultados indican que las cepas expresan de manera efectiva las proteínas APEX2_FtsZ y APEX2

6.4.2 APEX2 es activa en la cepa *C.glu_Apkna_apex2-ftsZ*

Por otro lado, se evaluó si APEX2 es activa en la cepa *C.glu_Apkna_apex2-ftsZ*. En este caso, se procedió directamente a detectar su actividad a través de la detección de proteínas biotiniladas por western blot utilizando estreptavidina conjugada con peroxidasa, posterior a la incubación con FB y H₂O₂. Se utilizó el mismo procedimiento ya estandarizado en los acápite anteriores y la misma concentración seleccionada para la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* (0.05% de gluconato).

En la Figura 49, se muestra el resultado que corrobora la actividad de APEX2 en esta cepa.

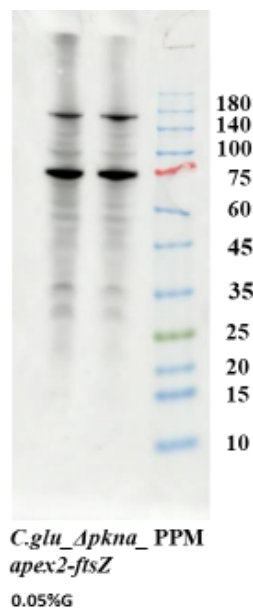


Figura 49: Evaluación de la actividad de APEX2 en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* por western blot. La actividad de APEX2 en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* se evaluó utilizando extractos de proteínas de dos réplicas, las cuales fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%. Se aplicaron 20 μ g de proteínas en cada carril y se procedió a transferirlas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la membrana se incubó con un anticuerpo de estreptavidina conjugado con peroxidasa, diluido 1/10000. La detección se llevó a cabo usando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo), y las imágenes fueron capturadas con el sistema automatizado ImageQuant 800 (Amersham). A la izquierda se indican los pesos moleculares del marcador utilizado (Thermo). Este resultado confirma la correcta actividad de APEX2 en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ*.

6.4.3 Morfología celular de la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* por microscopía confocal

La morfología celular de la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ*, utilizando 0.05% de gluconato, se evaluó por microscopía confocal y se usó Rojo Nilo como sonda fluorescente que se une a la membrana.

Como se puede ver en la Figura 50, las células son alargadas y presentan múltiples septos, a diferencia de lo que observamos con la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*, que, con la misma concentración de gluconato, presenta una morfología de células más cortas y mayoritariamente monoseptadas (Figura 30 del acápite 6.1.1). Este resultado apunta a que en ausencia de PknA las bacterias son menos tolerantes a niveles aumentados de FtsZ. Es posible postular que estas células multiseptadas y largas presentan un defecto en las etapas finales de la división y/o generan septos disfuncionales, y esto se podría ver reflejado en una composición alterada del divisoma.

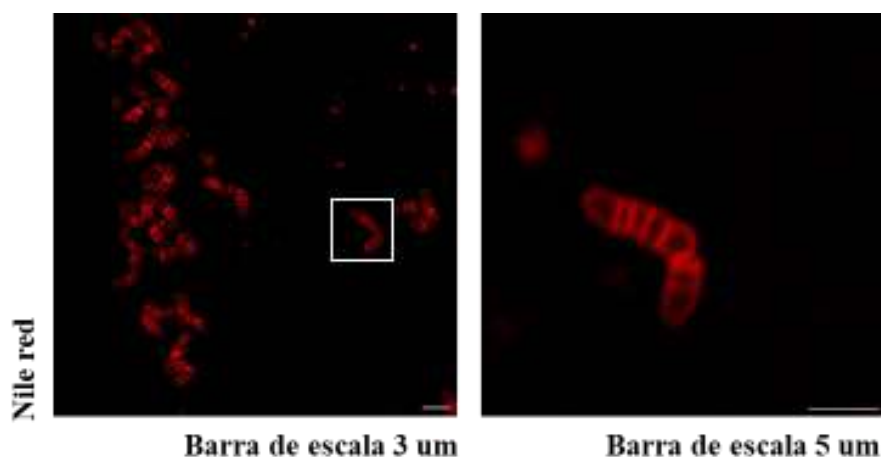


Figura 50: Imagen representativa obtenida por microscopía confocal de fluorescencia de la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ*, utilizando 0.05% de gluconato y el fluoróforo Rojo Nilo. BarraS de escala de 3 y 5 μ m.

6.4.4 Análisis proteómico comparativo de los niveles de FtsZ en las cepas *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* y *C.glu_apex2-ftsZ*

Reportes previos, así como resultados obtenidos en esta tesis, mostraron que niveles aumentados de FtsZ generan alteraciones morfológicas similares a las observadas en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ*, de manera dependiente de los niveles de expresión. Sin embargo, usando la cepa que expresa PknA y la misma concentración de gluconato no se observó el mismo fenotipo. Para descartar que el morfolito multiseptado observado en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* se deba a que los niveles de FtsZ no son comparables con la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* se realizó un análisis proteómico por LC-MS/MS, comparando 3 réplicas biológicas de las cepas *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* y *C.glu_apex2-ftsZ* con los mismos niveles de inducción (gluconato 0.05%). Como se observa en la Tabla 10, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de FtsZ en ambas cepas. Este resultado sugiere que el fenotipo de células multiseptadas observado para *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* por microscopía confocal no se debe a diferencias en los niveles de sobreexpresión de FtsZ; lo que nos permite postular que estas diferencias están asociadas a diferencias en la fosforilación de proteínas.

Tabla 10: Niveles de FtsZ en las cepas *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* y *C.glu_apex2-ftsZ*

Condiciones	Tasa de cambio	Valor p
<i>C.glu_apex2-ftsZ</i> (0.05% gluconato) y <i>C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ</i> (0.05% gluconato)	1.16	0.29316

* La tasa de cambio corresponde al valor de (*C.glu_apex2-ftsZ*/*C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ*). No hay cambios estadísticamente significativos en los niveles de FtsZ entre ambas cepas.

6.4.5 Evaluación del entorno proteómico de FtsZ en la cepa C.glu deficiente en PknA

Para evaluar cómo podría estar afectada la composición del divisoma en ausencia de PknA, se realizó el marcado por proximidad en la cepa C.glu_ΔpknA_apex2-ftsZ y la cepa C.glu_apex2-ftsZ (como control) usando 0.05% de gluconato como inductor. Se usaron 5 réplicas biológicas de cada condición. El análisis de los péptidos modificados con FB se realizó utilizando el módulo APEX del Patternlab V, considerando la modificación con FB en residuos de Tyr y que presentasen al menos uno de los dos iones diagnósticos más intensos. La distribución de los péptidos modificados con FB y con los iones diagnósticos para todas las réplicas ensayadas se muestra en la Figura 51.

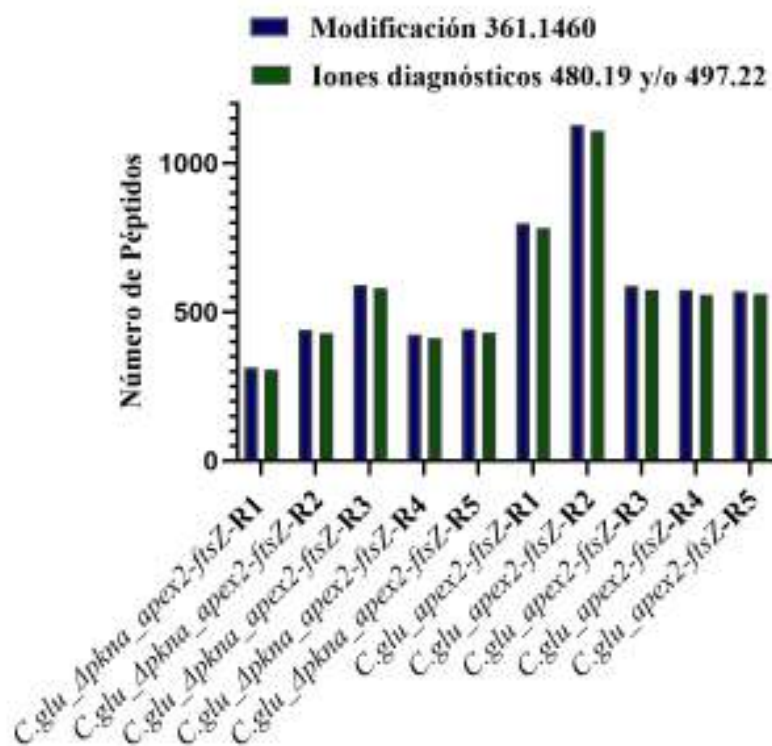


Figura 51: Identificación de péptidos modificados con FB e iones diagnósticos en 5 réplicas de las cepas C.glu_ΔpknA_apex2-ftsZ y C.glu_apex2-ftsZ. El análisis fue realizado con el módulo APEX de PatternLab for Proteomics, utilizando una tolerancia al error de fragmento de 20 ppm y un umbral de intensidad de los iones del 5%. Las barras azules indican la cantidad total de péptidos modificados con FB, identificados por búsqueda en bases de datos, considerando un incremento de masa de 361.1460 Da. Por su parte, las barras verdes representan el subgrupo de estos péptidos identificados que presentan uno de los dos iones diagnósticos más intensos y específicos para esta modificación: $m/z = 480.19$ y $m/z = 497.22$, en su espectro de fragmentación. Se modificaron 799, 1128, 588, 575 y 571 péptidos en C.glu_apex2-ftsZ, de los cuales se confirmaron 783, 1109, 575, 559 y 561. En C.glu_ΔpknA_apex2-ftsZ se modificaron 315, 441, 590, 425 y 442, y fueron confirmados 307, 428, 580, 413 y 430.

Luego, se procedió, a realizar el análisis proteómico cuantitativo de los péptidos y proteínas correspondientes, usando SC y comparando las cepas, *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* y *C.glu_apex2-ftsZ*. En la Figura 52A se muestra el análisis utilizando el módulo VD, que permitió identificar cuáles péptidos modificados con FB y confirmados con los iones diagnósticos fueron detectados exclusivamente en cada una de las cepas. Después de aplicar un filtro de probabilidad < 0.05 , se detectaron 219 péptidos exclusivos en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* y 16 en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ*, mientras 709 son comunes en ambas. En la Tabla Suplementaria 7 se muestran estos resultados y vemos que los péptidos exclusivos detectados para *C.glu_apex2-ftsZ* se identificaron con un número de espectros entre 2 y 33, presentes en 2, 3, 4 y 5 réplicas. La sobrerrepresentación de los 709 péptidos comunes en ambas cepas se analizó por el módulo T-fold. En la Figura 52B y la Tabla Suplementaria 8, se ve que sólo 87 de estos péptidos están aumentados en una de las dos cepas, y específicamente sólo 23 de ellos en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*, con una tasa de cambio entre 1.6 y 4.5.

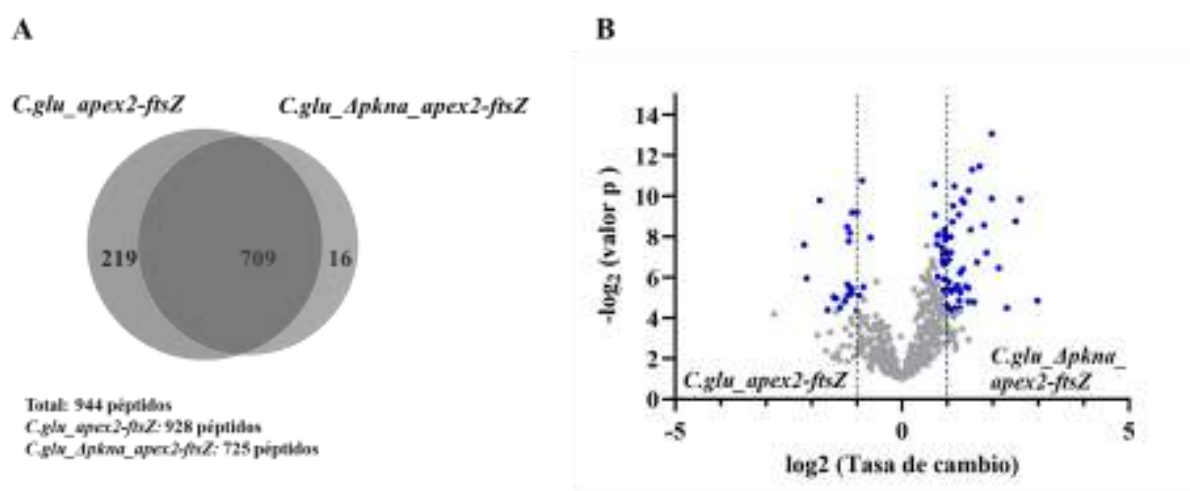


Figura 52: Análisis cuantitativo comparativo de los péptidos identificados con la modificación de FB (+361.1460 Da) y confirmados con al menos uno de los iones diagnósticos ($m/z=480.19$ (ión imonio de la Tyr-FB-NH₃) y $m/z=497.22$ (ión imonio de Tyr-FB)), en las cepas *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* y la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*, utilizando nano LC-MS/MS. Se analizaron 5 réplicas biológicas. La validación de los péptidos marcados se llevó a cabo con el módulo APEX de PatternLab for Proteomics. En **A**) se muestra el número de péptidos exclusivos para cada cepa utilizando el análisis estadístico del módulo VD ($p < 0.05$). Se identificaron 928 péptidos en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* y 725 en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* (Tabla Suplementaria 7). En **B**) se presentan los péptidos comunes a ambas cepas. El análisis por conteo de espectros se basó en los péptidos presentes en al menos 4 réplicas biológicas, con los siguientes criterios: F-stringency = 0.11; L-stringency = 0.4, y un valor p ajustado < 0.05 . En el gráfico de volcán, el eje Y representa el $\text{Log}_2(\text{valor } p)$ y el eje X el $\text{Log}_2(\text{tasa de cambio})$. Los puntos azules indican los 87 péptidos con diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones, cuya información detallada se muestra en la Tabla Suplementaria 8. Los puntos grises corresponden a péptidos sin cambios estadísticamente significativos en sus niveles entre ambas condiciones.

También se realizó un análisis similar con las proteínas inferidas a partir de los péptidos modificados. Como se observa en la Figura 53A y en la Tabla Suplementaria 9, 47 proteínas modificadas con FB que se detectaron exclusivamente en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*, mientras que en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* sólo se detectaron 3 proteínas exclusivas, y 347 proteínas fueron comunes a ambas condiciones. Las 47 proteínas exclusivamente detectadas en *C.glu_apex2-ftsZ* se identificaron con un total de 232 espectros, con una distribución variable: algunas proteínas estuvieron representadas por sólo 2 espectros, mientras que otras alcanzaron 14 espectros. Algunas de estas proteínas exclusivas se detectaron sólo en 2 de las 5 réplicas, mientras que otras se detectaron en todas las réplicas. El análisis estadístico de las proteínas comunes en ambas cepas, realizado con el módulo T-fold, reveló que, de las 347 proteínas, 37 están significativamente enriquecidas en una de las dos condiciones, siendo 25 de ellas específicas de la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*. De estas 25 proteínas, 10 presentaron una tasa de cambio superior a 2 (Figura 53B y Tabla Suplementaria 10).

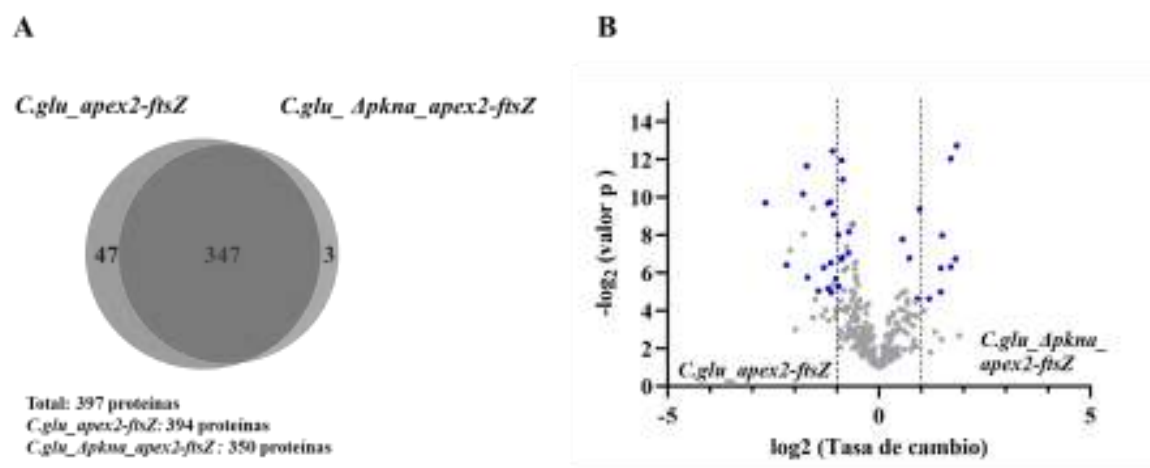


Figura 53: Análisis cuantitativo comparativo de las proteínas identificadas (a partir del análisis de péptidos) con la modificación de FB (+361.1460 Da) y confirmados con uno de los iones diagnósticos en las cepas *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* y la cepa *C.glu_apex2-ftsZ*. Se analizaron 5 réplicas biológicas. En **A)** Diagramas de Venn mostrando que hay 47 proteínas exclusivamente detectadas en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* y 3 en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* ($p < 0.05$). Se identificaron 394 proteínas marcadas en la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* y 350 en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ* (Tabla Suplementaria 9). En **B)** se representan las proteínas marcadas comunes a ambas cepas. El análisis de conteo de espectros se basó en los péptidos presentes en al menos 4 réplicas biológicas, con los siguientes criterios: F-stringency = 0.11; L-stringency = 0.4, y un valor p ajustado < 0.05 . En el gráfico de volcán, el eje Y representa el Log_2 (valor p) y el eje X el Log_2 (tasa de cambio). Los puntos azules indican las 37 proteínas con diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones, cuya información detallada se muestra en la Tabla Suplementaria 10. Los puntos grises corresponden a proteínas sin cambios estadísticamente relevantes.

Con este análisis, se identificaron un total de 72 proteínas detectadas como vecinas de FtsZ en la cepa C.glu_apex2-ftsZ, que no se detectan o están subrepresentadas cuando se analiza la cepa deficiente en PknA. Este resultado apunta a un rol importante de la fosforilación por PknA en el reclutamiento de proteínas de división celular a las cercanías de FtsZ. Esta lista incluye dos de las proteínas hipotéticas de membrana identificadas previamente como vecinas de FtsZ y caracterizadas en este trabajo: Cgl2210 y Cgl2839 (Tabla 11). Este resultado sugiere que la fosforilación por PknA es necesaria para que estas proteínas sean reclutadas al septo. Nuestros datos confirman que la fosforilación por PknA tiene un impacto en la composición del divisoma, y aporta información preliminar a nivel molecular de cuáles serían los cambios que estarían ocurriendo en las condiciones analizadas.

Tabla 11: Proteínas hipotéticas de membrana identificadas como vecinas de FtsZ sólo en presencia de PknA

Descripción de las proteínas	Identificador 1	Identificador 2	Número de espectros	Número de péptidos	Número de réplicas
Proteína de membrana hipotética	Cgl2210	Q8NNI9	13	1	4
Proteína de membrana hipotética	Cgl2839	Q8NLU7	7	3	3
Proteína de membrana hipotética	Cgl2883	Q8NLQ6	6	1	2

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

FtsZ es la proteína central del divisoma bacteriano, y la responsable de la formación del anillo Z y el reclutamiento de las proteínas que conforman el divisoma y constituyen la maquinaria funcional de la división celular. Muchos componentes del divisoma han sido caracterizados en los bacilos modelo *E. coli* y *B. subtilis*. Sin embargo, el orden de los *Mycobacteriales*, carece de homólogos para muchas de estas proteínas, y aún se desconocen cuáles son los integrantes del divisoma que cumplen las funciones de estos componentes faltantes. En este trabajo nos propusimos contribuir a la identificación de nuevos integrantes del divisoma de los *Mycobacteriales*. Para ello, se desarrolló una estrategia proteómica basada en la biotinylation por proximidad en células vivas usando la enzima APEX2 y utilizando a *C. glutamicum* como organismo modelo para este orden de bacterias.

La elección de esta metodología se basó en que las estrategias clásicas, basadas en purificación por afinidad acoplada a MS, tienen algunas limitaciones importantes que no las hacen aplicables al problema en estudio. Por un lado, la estrategia clásica no permite identificar interacciones lábiles o transitorias, las cuales se pierden al diluir y lisar las bacterias. Además, muchas veces llevan a la identificación de falsos positivos ya que la lisis celular promueve la interacción entre proteínas que no estaban en contacto dentro de la célula. También, estas estrategias utilizan condiciones durante la lisis y purificación que permiten conservar las interacciones, lo que frecuentemente resulta en una baja recuperación de proteínas de membrana ²¹¹. A nivel del análisis, dada la alta sensibilidad de la técnica, las estrategias basadas en AP-MS identifican numerosas proteínas inespecíficamente unidas a la columna, y estas proteínas que no son de interés tienden a dominar muchos de los interactomas publicados ^{211,274}. Por tanto, para abordar la identificación de integrantes del divisoma, y en particular de las proteínas que anclan el anillo a la membrana, es necesario recurrir a aproximaciones que permitan marcar proteínas vecinas en la célula viva, lo que nos permite sobreponernos a estas limitaciones y a su vez identificar interactores fisiológicamente relevantes.

El desarrollo y optimización de la estrategia de marcado por proximidad en *C. glutamicum* para la identificación de vecinos de FtsZ fue una parte central de este trabajo, así como la inclusión de numerosos controles que nos permitieran afirmar la relevancia

fisiológica de los vecinos de FtsZ identificados. Además, el método desarrollado, incluyó características distintivas que no suelen encontrarse en muchos de los estudios reportados en la bibliografía. En primer lugar, nuestro método se basó en la purificación de péptidos biotinilados en lugar de proteínas biotiniladas. En la mayoría de los estudios publicados luego del marcado, se purifican las proteínas biotiniladas, las cuales luego se digieren y se identifican, mayoritariamente a partir de sus péptidos nativos. En nuestra estrategia, luego del marcado, se digieren las proteínas y se purifican los péptidos biotinilados, lo que permite diferenciar entre proteínas endógenamente biotiniladas de las marcadas con FB, y confirmar que efectivamente el péptido está modificado y no resulta del pegado inespecífico a la matriz de afinidad. Además, ofrece una ventaja adicional, aporta información topológica, dado que la localización del sitio biotinilado revela qué región de la proteína estuvo realmente en proximidad al cebo. Existen métodos reportados que se basan en el análisis de péptidos, como BioSITE y DiDBiT, que han demostrado estas ventajas frente a la purificación clásica a nivel de proteínas ^{229,230}. Nuestro trabajo constituye una validación independiente en un sistema bacteriano con características particulares, y aporta evidencia adicional de que la purificación de péptidos es capaz de recuperar interactores que de otro modo se pierden. En efecto, durante las primeras etapas de este trabajo se realizó también una purificación de proteínas biotiniladas y se obtuvo una lista de interactores que se solapa parcialmente con la derivada de péptidos (resultados no mostrados). Sin embargo, observamos que en la lista de proteínas se pierden interactores reales, en especial, asociados a membranas. Esta observación es consistente con lo reportado en el estado del arte, ya que demuestra con datos experimentales propios, que la purificación de péptidos no solo incrementa la especificidad y la resolución espacial, sino que constituye una estrategia más robusta, sensible y confiable para la identificación de interactores en contextos biológicos.

Un segundo aspecto a destacar fue la aplicación de un filtro de confianza adicional basado en la detección de iones diagnósticos, característicos de péptidos modificados con FB. Aunque la literatura ha descrito la presencia de estos iones diagnósticos específicos de esta modificación ^{272,275}; los protocolos de referencia de las estrategias de marcado por proximidad (APEX2) no los incluyen como un paso estrictamente necesario, por lo que su aplicación no es todavía sistemática en los estudios de marcado por proximidad publicados. También, los artículos que lo han aplicado señalan que aún es necesario avanzar en el desarrollo de herramientas computacionales que integren estas firmas de

iones, con el objetivo de facilitar una detección automatizada y precisa de péptidos marcados con biotina ²⁷⁵. Es de destacar, que, precisamente, en el marco de esta tesis se generó una herramienta informática para automatizar la detección de dichos iones. El análisis manual para verificar los péptidos biotinilados no es un proceso sencillo, es proclive a errores y limita la reproducibilidad, sin mencionar que, muchas veces es incluso inviable debido a la cantidad de datos que deben ser analizados. Durante las etapas de optimización realizamos una validación manual de los espectros asignados a péptidos modificados con FB constatando que, si bien la mayoría incluía los iones diagnósticos, otros no lo hacían, lo que llevó al desarrollo de una herramienta que permitiera automatizar el proceso y excluir falsos positivos. El nuevo módulo APEX ²⁷⁰, incorporado en el software PatternLab V, ofrece una solución que agiliza considerablemente este análisis, que no sólo facilita su implementación en futuros estudios interactómicos en esta línea de investigación, sino que amplía su aplicabilidad a otros sistemas biológicos y usuarios de la estrategia de marcado por proximidad, ya que es de libre disponibilidad.

También, se realizó un ajuste fino de los niveles de expresión de APEX en las cepas en estudio, algo que no se incluye usualmente en los estudios de marcado por proximidad, pero que resultó importante en nuestro sistema. Un control/blanco bien diseñado no sólo permite sustraer péptidos que se unen inespecíficamente a la matriz o que se biotinilan de forma endógena, sino que también debe permitir sustraer péptidos modificados con FB en la célula pero que no están relacionados al proceso que estamos estudiando. Este marcado inespecífico puede ocurrir durante procesos celulares comunes a todas las proteínas, como su síntesis, plegamiento o degradación. Por ejemplo, es esperable que proteínas ribosomales o asociadas a sistemas de degradación aparezcan biotiniladas en todos los proteomas de proximidad. Si bien, existen algunos estudios como el de Jiang y col. 2025 ²⁷⁶, en el que se igualan los niveles de expresión de TurboID entre controles y cebos, este control es poco utilizado y validado en los protocolos estándar. En nuestro caso, el uso de niveles más bajos de inductor para generar niveles equivalentes de actividad APEX (corroborados por análisis de su capacidad de biotinilar proteínas y los niveles de proteínas tanto por ensayos proteómicos como de western blots) fue extremadamente útil para no perder interactores relevantes.

Otro control importante y poco frecuente es la validación experimental de que no se produce marcado de proteínas después de la lisis celular, lo cual es importante para asegurar que los resultados representan la proteómica espacial in vivo.

En conjunto, la estrategia que desarrollamos representa un avance metodológico significativo para el estudio de complejos multiproteicos en bacterias del orden Mycobacteriales. El uso combinado de la purificación de péptidos biotinilados, la identificación de los iones diagnósticos como criterio de validación adicional, el ajuste riguroso de los controles de expresión y la confirmación de la ausencia de marcado post-lisis, confiere a nuestro método, un nivel de robustez y precisión superior al utilizado frecuentemente en estas metodologías. Esta aproximación no sólo incrementa la especificidad en la detección de interactores, particularmente aquellos asociados a membranas o con interacciones transitorias, sino que también aporta información topológica relevante acerca de las superficies expuestas a APEX en las proteínas interactoras. Esta información es útil para comenzar a comprender la organización estructural del divisoma. De este modo, nuestro método se consolida como una herramienta sensible, confiable y versátil, capaz de superar las limitaciones de la interactómica convencional y de ampliar las posibilidades de exploración de redes proteicas en sistemas biológicos.

Un control que sí se usa frecuentemente en los ensayos de marcado por proximidad, y que en nuestro caso no pudimos completar, es la corroboración de la correcta localización subcelular de la construcción que incluye a APEX2. Una estrategia posible sería emplear la técnica basada en la actividad de APEX2 con diaminobencidina (DAB) ²⁷⁷, en la cual las células fijadas se incuban con DAB y H₂O₂, generando un precipitado insoluble que se deposita en el sitio de la proteína fusionada a APEX2. Este precipitado, tras su tratamiento con tetróxido de osmio, se vuelve electrodenso y puede observarse con alta resolución en cortes ultrafinos por microscopía electrónica de transmisión, revelando la localización de la proteína de interés en estructuras como el septo o los polos celulares ²⁵⁴. Si bien nos planteamos realizar esta aproximación, no fue tan fácil la implementación o el acceso a la instrumentación necesaria. Como alternativa, generamos una cepa que expresa FtsZ fusionada a mNeon para evaluar bajo las mismas condiciones, su localización en el septo por microscopía confocal, lo cual sería otra aproximación para demostrar su localización. Aún cuando no se ha completado este análisis, la lista de

interactores con conocida ubicación septal, las validaciones subsiguientes y la confirmación de que las proteínas hipotéticas de membrana seleccionadas efectivamente, localizan en el septo, permiten concluir con confianza que la construcción se acumula en el septo, aún sin contar todavía con la prueba subcelular definitiva.

La optimización de la estrategia APEX con controles exhaustivos permitió, en una segunda etapa, identificar un conjunto confiable de proteínas candidatas a interactuar con FtsZ en la célula viva. En esta lista emergen varias proteínas con funciones ya caracterizadas, lo cual constituye una validación sólida a nuestro enfoque. Es relevante, que la proteína SepF se ubique entre los principales candidatos. En *C. glutamicum*, esta proteína se ha descrito como esencial para la división celular, ya que junto con FtsZ son responsables de la formación de un anillo Z funcional anclado en la membrana. Estudios estructurales identificaron un bolsillo de unión a FtsZ que define al homodímero de SepF como unidad activa. La interacción con filamentos de FtsZ y con membranas lipídicas regula de manera opuesta la polimerización de SepF, confiriéndole un papel dinámico en el agrupamiento de filamentos, el anclaje del anillo a la membrana y la remodelación de la bicapa durante la formación del septo ¹⁵⁵. En conjunto, estos hallazgos sustentan un modelo en el que SepF coordina la organización y activación del anillo Z, funcionando como punto de control en las etapas iniciales de la constricción celular.

En nuestra lista también se identificaron Glp y Wag31, dos proteínas centrales en la coordinación entre divisoma y elongasoma en *Mycobacteriales*. Nuestro grupo de trabajo identificó recientemente a Glp como un nuevo integrante del divisoma y confirmó su interacción directa con FtsZ *in vitro*. Por tanto, su identificación en nuestra lista de vecinos de FtsZ resulta un control positivo que refuerza la lista de interactores. Mientras que Glp interacciona con FtsZ, su receptor de membrana GlpR interacciona con Wag31. La interacción entre Glp y GlpR entonces funciona como un puente entre las proteínas centrales de división y elongación celular a nivel del septo. Este sistema controlaría la acumulación de Wag31 en el septo para evitar la formación prematura de polos y asegurar su liberación una vez completada la citocinesis ¹⁶⁸. La presencia de estas proteínas en nuestros resultados no sólo valida experimentalmente la estrategia APEX, sino que además aporta evidencia de la capacidad del método para detectar componentes claves y dinámicamente regulados de la maquinaria de división celular.

Un aspecto particularmente importante de nuestros resultados es la aparición de varias proteínas hipotéticas de membrana entre los candidatos identificados y los cuales seleccionamos para validar. La importancia de estas proteínas radica en que, a diferencia de factores bien caracterizados como SepF, Glp o Wag31, sobre ellas no existe prácticamente información funcional, lo que abre la posibilidad de descubrir componentes hasta ahora desconocidos de la maquinaria de división o elongación en *C. glutamicum*. Además, como mencionamos anteriormente, las proteínas que anclan el anillo Z a la membrana en las bacterias modelo, con la clara excepción de SepF, no están presentes en los *Mycobacteriales*. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que alguna de estos vecinos de FtsZ podría representar un nuevo componente del divisoma con un rol importante es su estabilización e interacción con la membrana.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, se seleccionaron las 7 proteínas hipotéticas de membrana presentes en la lista de posibles interactores de FtsZ para su validación. Cabe destacar que 6 de ellas están conservadas en *Mycobacteriales*, a excepción de la proteína Cgl2990, lo que es interesante ya que podrían representar integrantes de una maquinaria de división celular central y conservada en estas bacterias. Las proteínas Cgl2198, Cgl2210 y Cgl2374 tienen una distribución muy similar a Glp y GlpR; mientras que las proteínas Cgl0298, Cgl1266 y Cgl2839 parecen tener varios parálogos en los genomas de *Actinobacterias*, es decir, copias de un mismo gen originadas por duplicación. Esta paralogía, si bien pudiera aportar una complejidad para definir la función específica de cada una, también ofrece la oportunidad de explorar posibles procesos de diversificación funcional.

Por otro lado, el hecho de que los residuos de Tyr modificados se localicen en los dominios citosólicos de las proteínas concuerda con la hipótesis de que interactúan directamente con FtsZ u otros componentes citoplasmáticos del divisoma, ya que los bucles extracelulares no serían accesibles a este tipo de interacciones. La predicción estructural mediante AlphaFold, complementada con la topología generada por DeepTMHMM, muestra que todas ellas poseen segmentos transmembrana que las anclan a la bicapa lipídica, dejando expuestas regiones citosólicas donde se ubican los sitios modificados. Este patrón, junto con su conservación en *Mycobacteriales*, refuerza la posibilidad de que estas proteínas funcionen como nuevos factores de anclaje o regulación

del divisoma, actuando desde la membrana como plataformas de interacción para FtsZ y otras proteínas de la maquinaria de división.

Los análisis de imágenes por microscopía confocal validaron estas proteínas como proteínas que se localizan en el septo y con esto su posible participación en la maquinaria de división celular.

En trabajos futuros, nos proponemos realizar experimentos adicionales para complementar estos resultados y validar la interacción de estas proteínas con FtsZ. Una estrategia posible es la co-inmunoprecipitación a partir de las cepas que expresan las proteínas candidatas fusionadas a mNeon, utilizando anticuerpos anti-mNeon. Los complejos recuperados se analizarán por Western blot con anticuerpos anti-mNeon, anti-FtsZ y otros específicos y por LC-MS/MS. Como controles se incluirán las cepas que expresan mNeon-Glp como control positivo (su interacción directa con FtsZ fue reportada por nuestro grupo ¹⁶⁸) y la que expresa mNeon como control negativo. Este enfoque permitiría confirmar la interacción directa o indirecta entre FtsZ y las proteínas candidatas en las células.

Otra estrategia complementaria que consideramos es la aplicación de XL in vitro, también para corroborar las interacciones entre las proteínas candidatas y FtsZ, pero en este caso interacciones directas. Para ello, usaremos las proteínas candidatas purificadas a partir de sus etiquetas en las cepas que las sobreexpresan y FtsZ purificada de la cepa *C.glu_apex2-ftsZ* y las incubaremos in vitro en presencia de agentes entrecruzantes. El posterior análisis por MS permitirá identificar la interacción directa y los sitios de interacción a través de la asignación de las secuencias entrecruzadas. Para aquellos candidatos validados en los pasos previos sería importante caracterizar su interacción con FtsZ mediante ensayos biofísicos y estructurales como realizamos anteriormente para Glp y GlpR ¹⁶⁸. En particular, se podría confirmar la interacción y evaluar su afinidad mediante interferometría de bicapa usando proteínas recombinantes, y analizar la estructura de los complejos mediante cristalografía de rayos X.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que las proteínas de membrana estudiadas son muy probablemente nuevos integrantes del divisoma de *C. glutamicum* y se necesitarán trabajos futuros para poder establecer su posible rol funcional. Inicialmente especulamos que su sobreexpresión en *C. glutamicum* pudiese resultar en algún cambio

fenotípico que estuviese asociado a la división celular. Sin embargo, no encontramos grandes cambios en la morfología de las cepas que sobreexpresaban cada uno de estos candidatos. De todas formas, si estas proteínas cumpliesen un rol fundamental en el anclaje del anillo como hipotetizamos sería esperable encontrar cambios importantes cuando se depletan y no cuando se sobreexpresan las mismas. En este sentido, tenemos en curso la generación de cepas KO para algunas de estas proteínas de membrana, lo que pensamos que podría aportar información relevante sobre su rol funcional. En estas cepas evaluaremos el crecimiento y la división celular, la correcta formación del anillo y la composición proteómica del vecindario de FtsZ como formas de aproximarnos a su rol funcional.

Uno de los aspectos distintivos de la división celular en los *Mycobacteriales* es la participación de las quinasas de proteínas en Ser y Thr en su regulación. Si bien existen múltiples evidencias que demuestran que la fosforilación de proteínas mediada por estas quinasas, cumple un rol importante en este proceso, el mecanismo molecular involucrado es aún poco comprendido ¹⁷⁰. Se ha demostrado que niveles alterados de dos quinasas conservadas, PknA y PknB, generan un fenotipo compatible con defectos en la síntesis de pared y división celular tanto en micobacterias como corinebacterias ^{173,278}. Además, muchas de las proteínas claves de la división celular se han identificado como fosforiladas *in vivo*. En particular la proteína central del divisoma, FtsZ puede ser fosforilada *in vitro* por las quinasas PknA, PknB y PknL ¹⁷⁴. Se identificaron cuatro fosforesiduos que se ubican en regiones claves de la proteína. Uno de ellos se ubica en la región de unión e hidrólisis de GTP en el dominio GTPasa (Thr108), mientras que otro de los residuos fosforilados se ubica en la interfase de oligomerización (Thr63). Finalmente, dos sitios de fosforilación se ubican en la región C-terminal de la proteína que cumple un rol fundamental en el reclutamiento de integrantes del divisoma ²⁷⁹. Se ha demostrado además que PknA es la principal quinasa que fosforila FtsZ *in vivo* ¹⁵¹ y que esta fosforilación tiene consecuencias funcionales, ya que modifica tanto la actividad GTPasa como la capacidad de polimerizar de FtsZ ²⁸⁰.

En este contexto, nos planteamos investigar el efecto de PknA sobre la composición del divisoma. Para ello, realizamos los experimentos de marcado por proximidad en una cepa deficiente en PknA. Nuestros resultados indican que la ausencia de PknA afecta el entorno proteómico de FtsZ con una lista de vecinos detectados en la cepa nativa que no pudieron

detectarse próximos a FtsZ en la cepa KO para pknA. En particular, la fosforilación mediada por PknA constituiría un requisito clave para el reclutamiento al septo de varias de las proteínas de membrana previamente identificadas y validadas como vecinas de FtsZ en la cepa nativa, lo que resalta el papel central de esta PTM en la regulación del ensamblaje del divisoma en *C. glutamicum*. Una limitación de esta aproximación es que estas enzimas suelen ser muy promiscuas y presentan una especificidad de sustratos solapada, lo que puede atenuar el fenotipo observado. Sin embargo, el hecho de que aún en esas condiciones se observen diferencias a nivel de los vecinos de FtsZ, refuerza la importancia de la fosforilación de proteínas mediadas por PknA para el correcto ensamblaje de la maquinaria de división celular. Nos resta aún identificar los cambios en fosfoproteínas en ambas condiciones para poder profundizar en los mecanismos que subyacen a los cambios observados. Estos estudios fosfoproteómicos conllevan ciertas dificultades analíticas que necesitarán ser optimizadas.

En conjunto, esta tesis aporta una herramienta metodológica robusta y versátil para el estudio del divisoma en *C. glutamicum*, capaz de superar las limitaciones de la interactómica convencional y extender su aplicabilidad a bacterias del orden Mycobacteriales. La estrategia implementada permitió generar una lista confiable de posibles nuevos integrantes del divisoma, incluyendo varias proteínas hipotéticas de membrana con localización septal. Asimismo, se aporta evidencia molecular que vincula la fosforilación de proteínas con la dinámica de ensamblaje del divisoma, subrayando la importancia de este tipo de modificaciones en la coordinación de la división celular. De este modo, el trabajo no sólo contribuye al conocimiento sobre la biología fundamental de Mycobacteriales, sino que también sienta las bases para futuras investigaciones orientadas a dilucidar la arquitectura molecular de la maquinaria de división celular.

Si bien el artículo con los resultados principales de esta tesis se encuentra en preparación, durante su desarrollo he colaborado en las siguientes publicaciones, relacionadas con el tema central de la tesis y/o enmarcadas dentro de la misma línea general de investigación:

1. D. M. Santos, M., C. Camillo-Andrade, A., **Rodríguez, A.** & Durán, R. A Module for Analyzing Interactomes via APEX-MS Integrated into PatternLab for Proteomics. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 35, 1055–1058 (2024).

2. Martinez, M., Julianne Petit, Alejandro Leyva, Adrià Sogues, Daniela Megrian, **Azalia Rodríguez**, Quentin Gaday, Mathilde Ben Assaya, Maria Magdalena Portela, Ahmed Haouz, Adrien Ducret, Christophe Grangeasse, Pedro M. Alzari, Rosario Durán & Anne Marie Wehenkel. Eukaryotic-like gephyrin and cognate membrane receptor coordinate corynebacterial cell division and polar elongation. **Nature Microbiol.** 8, 1896–1910 (2023).
3. Rossello, J., Bernardina Rivera, Maximiliano Anzibar Fialho, Ingrid Augusto, Magdalena Gil, Marina Andrea Forrellad, Fabiana Bigi, **Azalia Rodríguez Taño**, Estefanía Urdániz, Mariana Piuri, Kildare Miranda, Anne Marie Wehenkel, Pedro M. Alzari, Leonel Malacrida, Rosario Durán. FhaA plays a key role in mycobacterial polar elongation and asymmetric growth. **mBio** 16, e0252624 (2025).

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Margolin, W. Binary Fission in Bacteria. in eLS (John Wiley & Sons, Ltd, 2014). doi:10.1002/9780470015902.a0001420.pub2.
2. Mahone, C. R. & Goley, E. D. Bacterial cell division at a glance. *J. Cell Sci.* **133**, jcs237057 (2020).
3. Barrows, J. M. & Goley, E. D. FtsZ dynamics in bacterial division: What, how, and why? *Curr. Opin. Cell Biol.* **68**, 163–172 (2021).
4. Reyes-Lamothe, R. & Sherratt, D. J. The bacterial cell cycle, chromosome inheritance and cell growth. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 467–478 (2019).
5. Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A. & Vollmer, W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 123–136 (2012).
6. Domínguez-Escobar, J. et al. Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science* **333**, 225–228 (2011).
7. Shih, Y.-L. & Rothfield, L. The bacterial cytoskeleton. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 729–754 (2006).
8. Garner, E. C. et al. Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science* **333**, 222–225 (2011).
9. Eraso, J. M. & Margolin, W. Bacterial cell wall: thinking globally, actin locally. *Curr. Biol.* **21**, R628–R630 (2011).
10. Shi, H., Bratton, B. P., Gitai, Z. & Huang, K. C. How to build a bacterial cell: MreB as the foreman of *E. coli* construction. *Cell* **172**, 1294–1305 (2018).
11. Jones, L. J., Carballido-López, R. & Errington, J. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**, 913–922 (2001).
12. Hirota, Y., Ryter, A. & Jacob, F. Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. in vol. 33 677–693 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1968).
13. Pla, J., Sanchez, M., Patacios, P., Vicente, M. & Aldea, M. Preferential cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for *Escherichia coli* septation. *Mol. Microbiol.* **5**, 1681–1686 (1991).
14. Bi, E. & Lutkenhaus, J. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**, 161–164 (1991).
15. Löwe, J. & Amos, L. A. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**, 203–206 (1998).
16. Silber, N., Matos de Opitz, C. L., Mayer, C. & Sass, P. Cell division protein FtsZ: from structure and mechanism to antibiotic target. *Future Microbiol.* **15**, 801–831 (2020).
17. Cameron, T. A. & Margolin, W. Insights into the assembly and regulation of the bacterial divisome. *Nat. Rev. Microbiol.* **22**, 33–45 (2024).
18. Vicente, M. & Rico, A. I. The order of the ring: assembly of *Escherichia coli* cell division components. *Mol. Microbiol.* **61**, 5–8 (2006).
19. Margolin, W. FTSZ AND THE DIVISION OF PROKARYOTIC CELLS AND ORGANELLES. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 862–871 (2005).
20. Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A. & Löwe, J. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 451–458 (1998).
21. Erickson, H. P. FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell* **80**, 367–370 (1995).
22. Mukherjee, A. & Lutkenhaus, J. Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J. Bacteriol.* **176**, 2754–2758 (1994).
23. Dai, K., Mukherjee, A., Xu, Y. & Lutkenhaus, J. Mutations in *ftsZ* that confer resistance to SulA affect the interaction of FtsZ with GTP. *J. Bacteriol.* **176**, 130–136 (1994).
24. Löwe, J. Crystal Structure Determination of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. *J. Struct. Biol.* **124**, 235–243 (1998).
25. Ma, X., Ehrhardt, D. W. & Margolin, W. Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 12998–13003 (1996).

26. Ma, X. & Margolin, W. Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J. Bacteriol.* **181**, 7531–7544 (1999).
27. Buske, P. J. & Levin, P. A. Extreme C terminus of bacterial cytoskeletal protein FtsZ plays fundamental role in assembly independent of modulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **287**, 10945–10957 (2012).
28. Vaughan, S., Wickstead, B., Gull, K. & Addinall, S. G. Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J. Mol. Evol.* **58**, 19–29 (2004).
29. Casiraghi, A., Suigo, L., Valoti, E. & Straniero, V. Targeting Bacterial Cell Division: A Binding Site-Centered Approach to the Most Promising Inhibitors of the Essential Protein FtsZ. *Antibiotics* **9**, 69 (2020).
30. Haeusser, D. P. & Margolin, W. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 305–319 (2016).
31. Delano, W. The PyMOL Molecular Graphics System. in (2002).
32. Khan, R. & Ray, S. Bacterial Cell Division Machinery: An Insight for Development of New Antibacterial Agent. *Phytochem. -Silico -Vitro Update Adv. Phytochem. Res.* 109–132 (2019).
33. Mukherjee, A., Dai, K. & Lutkenhaus, J. *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 1053–1057 (1993).
34. RayChaudhuri, D. & Park, J. T. *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* **359**, 251–254 (1992).
35. Oliva, M. A., Cordell, S. C. & Löwe, J. Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1243–1250 (2004).
36. Oliva, M. A. et al. Assembly of archaeal cell division protein FtsZ and a GTPase-inactive mutant into double-stranded filaments. *J. Biol. Chem.* **278**, 33562–33570 (2003).
37. Löwe, J. & Amos, L. A. Tubulin-like protofilaments in Ca²⁺-induced FtsZ sheets. *EMBO J.* (1999).
38. Lindås, A.-C., Karlsson, E. A., Lindgren, M. T., Ettema, T. J. & Bernander, R. A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 18942–18946 (2008).
39. Li, Z., Trimble, M. J., Brun, Y. V. & Jensen, G. J. The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J.* **26**, 4694–4708 (2007).
40. Perez, A. J. et al. Movement dynamics of divisome proteins and PBP2x: FtsW in cells of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 3211–3220 (2019).
41. Yang, X. et al. GTPase activity-coupled treadmilling of the bacterial tubulin FtsZ organizes septal cell wall synthesis. *Science* **355**, 744–747 (2017).
42. Bisson-Filho, A. W. et al. Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science* **355**, 739–743 (2017).
43. Monteiro, J. M. et al. Peptidoglycan synthesis drives an FtsZ-treadmilling-independent step of cytokinesis. *Nature* **554**, 528–532 (2018).
44. Santra, M. K., Beuria, T. K., Banerjee, A. & Panda, D. Ruthenium red-induced bundling of bacterial cell division protein, FtsZ. *J. Biol. Chem.* **279**, 25959–25965 (2004).
45. Beuria, T. K. et al. Glutamate-induced assembly of bacterial cell division protein FtsZ. *J. Biol. Chem.* **278**, 3735–3741 (2003).
46. Santra, M. K., Dasgupta, D. & Panda, D. Deuterium oxide promotes assembly and bundling of FtsZ protofilaments. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **61**, 1101–1110 (2005).
47. Yang, X. & Liu, R. How does FtsZ's treadmilling help bacterial cells divide? *BIOCELL* **46**, 2343–2351 (2022).
48. Cabeen, M. T. & Jacobs-Wagner, C. The Bacterial Cytoskeleton. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 365–392 (2010).
49. Hale, C. A. & de Boer, P. A. J. Recruitment of ZipA to the Septal Ring of *Escherichia coli* Is Dependent on FtsZ and Independent of FtsA. *J. Bacteriol.* **181**, 167–176 (1999).
50. Pichoff, S. & Lutkenhaus, J. Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol. Microbiol.* **55**, 1722–1734 (2005).
51. Loose, M. & Mitchison, T. J. The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-organize into dynamic cytoskeletal patterns. *Nat. Cell Biol.* **16**, 38–46 (2014).

52. Ortiz, C., Casanova, M., Palacios, P. & Vicente, M. The hypermorph FtsA* protein has an in vivo role in relieving the Escherichia coli proto-ring block caused by excess ZapC+. *PLOS ONE* **12**, e0184184 (2017).
53. Bork, P., Sander, C. & Valencia, A. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 7290–7294 (1992).
54. Schoenemann, K. M. et al. Gain-of-function variants of FtsA form diverse oligomeric structures on lipids and enhance FtsZ protofilament bundling. *Mol. Microbiol.* **109**, 676–693 (2018).
55. Yao, Q. et al. Short FtsZ filaments can drive asymmetric cell envelope constriction at the onset of bacterial cytokinesis. *EMBO J.* **36**, 1577–1589 (2017).
56. Khanna, K., Lopez-Garrido, J., Sugie, J., Pogliano, K. & Villa, E. Asymmetric localization of the cell division machinery during Bacillus subtilis sporulation. *eLife* **10**, e62204 (2021).
57. Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M. D. & Errington, J. Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of Bacillus subtilis. *Mol. Microbiol.* **40**, 115–125 (2001).
58. Mateos-Gil, P. et al. FtsZ polymers bound to lipid bilayers through ZipA form dynamic two dimensional networks. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818**, 806–813 (2012).
59. García-Soriano, D. A., Heermann, T., Raso, A., Rivas, G. & Schwill, P. The speed of FtsZ treadmilling is tightly regulated by membrane binding. *Sci. Rep.* **10**, 10447 (2020).
60. Krupka, M., Sobrinos-Sanguino, M., Jiménez, M., Rivas, G. & Margolin, W. Escherichia coli ZipA Organizes FtsZ Polymers into Dynamic Ring-Like Protofilament Structures. *mBio* **9**, 10.1128/mbio.01008-18 (2018).
61. Hernández-Rocamora, V. M. et al. Dynamic Interaction of the Escherichia coli Cell Division ZipA and FtsZ Proteins Evidenced in Nanodiscs *. *J. Biol. Chem.* **287**, 30097–30104 (2012).
62. Gueiros-Filho, F. J. & Losick, R. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* **16**, 2544–2556 (2002).
63. Ebersbach, G., Galli, E., Møller-Jensen, J., Löwe, J. & Gerdes, K. Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division. *Mol. Microbiol.* **68**, 720–735 (2008).
64. Bhattacharya, A., Ray, S., Singh, D., Dhaked, H. P. S. & Panda, D. ZapC promotes assembly and stability of FtsZ filaments by binding at a different site on FtsZ than ZipA. *Int. J. Biol. Macromol.* **81**, 435–442 (2015).
65. Durand-Heredia, J. M., Yu, H. H., De Carlo, S., Lesser, C. F. & Janakiraman, A. Identification and Characterization of ZapC, a Stabilizer of the FtsZ Ring in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **193**, 1405–1413 (2011).
66. Roach, E. J. et al. Structure and Mutational Analyses of Escherichia coli ZapD Reveal Charged Residues Involved in FtsZ Filament Bundling. *J. Bacteriol.* **198**, 1683–1693 (2016).
67. Durand-Heredia, J., Rivkin, E., Fan, G., Morales, J. & Janakiraman, A. Identification of ZapD as a Cell Division Factor That Promotes the Assembly of FtsZ in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **194**, 3189–3198 (2012).
68. Cendrowicz, E. et al. Bacillus subtilis SepF Binds to the C-Terminus of FtsZ. *PLOS ONE* **7**, e43293 (2012).
69. Ishikawa, S., Kawai, Y., Hiramatsu, K., Kuwano, M. & Ogasawara, N. A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in Bacillus subtilis. *Mol. Microbiol.* **60**, 1364–1380 (2006).
70. Singh, J. K., Makde, R. D., Kumar, V. & Panda, D. SepF Increases the Assembly and Bundling of FtsZ Polymers and Stabilizes FtsZ Protofilaments by Binding along Its Length *. *J. Biol. Chem.* **283**, 31116–31124 (2008).
71. Gulsoy, I. C. et al. Minimization of the Bacillus subtilis divisome suggests FtsZ and SepF can form an active Z-ring, and reveals the amino acid transporter BraB as a new cell division influencing factor. *PLoS Genet.* **21**, e1011567 (2025).

72. Huang, K.-H., Durand-Heredia, J. & Janakiraman, A. FtsZ Ring Stability: of Bundles, Tubules, Crosslinks, and Curves. *J. Bacteriol.* **195**, 1859–1868 (2013).
73. Huang, J., Cao, C. & Lutkenhaus, J. Interaction between FtsZ and inhibitors of cell division. *J. Bacteriol.* **178**, 5080–5085 (1996).
74. Hu, Z., Mukherjee, A., Pichoff, S. & Lutkenhaus, J. The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 14819–14824 (1999).
75. Pichoff, S. & Lutkenhaus, J. *Escherichia coli* division inhibitor MinCD blocks septation by preventing Z-ring formation. *J. Bacteriol.* **183**, 6630–6635 (2001).
76. Taviti, A. C. & Beuria, T. K. MinD directly interacting with FtsZ at the H10 helix suggests a model for robust activation of MinC to destabilize FtsZ polymers. *Biochem. J.* **474**, 3189–3205 (2017).
77. Shiomi, D. & Margolin, W. The C-terminal domain of MinC inhibits assembly of the Z ring in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 236–243 (2007).
78. Raskin, D. M. & de Boer, P. A. Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4971–4976 (1999).
79. Woldringh, C. L., Mulder, E., Huls, P. G. & Vischer, N. Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. *Res. Microbiol.* **142**, 309–320 (1991).
80. Bernhardt, T. G. & de Boer, P. A. J. SlnA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol. Cell* **18**, 555–564 (2005).
81. Wu, L. J. & Errington, J. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* **117**, 915–925 (2004).
82. Liu, X., Biboy, J., Consoli, E., Vollmer, W. & den Blaauwen, T. MreC and MreD balance the interaction between the elongasome proteins PBP2 and RodA. *PLoS Genet.* **16**, e1009276 (2020).
83. Goehring, N. W. & Beckwith, J. Diverse Paths to Midcell: Assembly of the Bacterial Cell Division Machinery. *Curr. Biol.* **15**, R514–R526 (2005).
84. Levin, P. A., Kurtser, I. G. & Grossman, A. D. Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 9642–9647 (1999).
85. Land, A. D., Luo, Q. & Levin, P. A. Functional domain analysis of the cell division inhibitor EzrA. *PloS One* **9**, e102616 (2014).
86. Trusca, D., Scott, S., Thompson, C. & Bramhill, D. Bacterial SOS checkpoint protein Sula inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. *J. Bacteriol.* **180**, 3946–3953 (1998).
87. Fernández De Henestrosa, A. R. et al. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **35**, 1560–1572 (2000).
88. Weart, R. B. et al. A metabolic sensor governing cell size in bacteria. *Cell* **130**, 335–347 (2007).
89. Araújo-Bazán, L., Ruiz-Avila, L. B., Andreu, D., Huecas, S. & Andreu, J. M. Cytological Profile of Antibacterial FtsZ Inhibitors and Synthetic Peptide MciZ. *Front. Microbiol.* **7**, 1558 (2016).
90. Handler, A. A., Lim, J. E. & Losick, R. Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **68**, 588–599 (2008).
91. Camberg, J. L., Hoskins, J. R. & Wickner, S. ClpXP protease degrades the cytoskeletal protein, FtsZ, and modulates FtsZ polymer dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 10614–10619 (2009).
92. Middlemiss, S. et al. Molecular motor tug-of-war regulates elongasome cell wall synthesis dynamics in *Bacillus subtilis*. *Nat. Commun.* **15**, 5411 (2024).
93. Cho, H. et al. Bacterial cell wall biogenesis is mediated by SEDS and PBP polymerase families functioning semi-autonomously. *Nat. Microbiol.* **1**, 16172 (2016).
94. van den Ent, F. et al. Dimeric structure of the cell shape protein MreC and its functional implications. *Mol. Microbiol.* **62**, 1631–1642 (2006).

95. Alyahya, S. A. et al. RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1239–1244 (2009).
96. Moutaoufik, M. T. et al. Rewiring of the human mitochondrial interactome during neuronal reprogramming reveals regulators of the respirasome and neurogenesis. *Iscience* **19**, 1114–1132 (2019).
97. van den Ent, F., Johnson, C. M., Persons, L., de Boer, P. & Löwe, J. Bacterial actin MreB assembles in complex with cell shape protein RodZ. *EMBO J.* **29**, 1081–1090 (2010).
98. Rico, A. I., Krupka, M. & Vicente, M. In the beginning, *Escherichia coli* assembled the proto-ring: an initial phase of division. *J. Biol. Chem.* **288**, 20830–20836 (2013).
99. Tsang, M.-J. & Bernhardt, T. G. A role for the FtsQLB complex in cytokinetic ring activation revealed by an *ftsL* allele that accelerates division. *Mol. Microbiol.* **95**, 925–944 (2015).
100. Liu, B., Persons, L., Lee, L. & de Boer, P. A. Roles for both FtsA and the FtsBLQ subcomplex in FtsN-stimulated cell constriction in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **95**, 945–970 (2015).
101. Nguyen, H. T. V. et al. Structure of the heterotrimeric membrane protein complex FtsB-FtsL-FtsQ of the bacterial divisome. *Nat. Commun.* **14**, 1903 (2023).
102. Pichoff, S., Shen, B., Sullivan, B. & Lutkenhaus, J. FtsA mutants impaired for self-interaction bypass ZipA suggesting a model in which FtsA's self-interaction competes with its ability to recruit downstream division proteins. *Mol. Microbiol.* **83**, 151–167 (2012).
103. Pichoff, S., Du, S. & Lutkenhaus, J. The bypass of ZipA by overexpression of FtsN requires a previously unknown conserved FtsN motif essential for FtsA–FtsN interaction supporting a model in which FtsA monomers recruit late cell division proteins to the Z ring. *Mol. Microbiol.* **95**, 971–987 (2015).
104. Yahashiri, A., Jorgenson, M. A. & Weiss, D. S. Bacterial SPOR domains are recruited to septal peptidoglycan by binding to glycan strands that lack stem peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 11347–11352 (2015).
105. Taguchi, A. et al. FtsW is a peptidoglycan polymerase that is functional only in complex with its cognate penicillin-binding protein. *Nat. Microbiol.* **4**, 587–594 (2019).
106. Dubarry, N., Possoz, C. & Barre, F.-X. Multiple regions along the *Escherichia coli* FtsK protein are implicated in cell division. *Mol. Microbiol.* **78**, 1088–1100 (2010).
107. Perkins, A., Mounange-Badimi, M. S. & Margolin, W. Role of the antiparallel double-stranded filament form of FtsA in activating the *Escherichia coli* divisome. *mBio* **15**, e01687-24.
108. Hett, E. C. & Rubin, E. J. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 126–156 (2008).
109. Baranowski, C., Rego, E. H. & Rubin, E. J. The Dream of a Mycobacterium. *Microbiol. Spectr.* **7**, 10.1128/microbiolspec.gpp3-0008–2018 (2019).
110. Kieser, K. J. & Rubin, E. J. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 550–562 (2014).
111. Meyer, F. M. & Bramkamp, M. Cell wall synthesizing complexes in Mycobacteriales. *Curr. Opin. Microbiol.* **79**, 102478 (2024).
112. Baranowski, C. et al. Maturing *Mycobacterium smegmatis* peptidoglycan requires non-canonical crosslinks to maintain shape. *eLife* **7**, e37516 (2018).
113. Logsdon, M. M. & Aldridge, B. B. Stable Regulation of Cell Cycle Events in Mycobacteria: Insights From Inherently Heterogeneous Bacterial Populations. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
114. Brennan, P. J. & Nikaido, H. THE ENVELOPE OF MYCOBACTERIA. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 29–63 (1995).
115. Alderwick, L. J., Harrison, J., Lloyd, G. S. & Birch, H. L. The Mycobacterial Cell Wall—Peptidoglycan and Arabinogalactan. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a021113 (2015).
116. Zuber, B. et al. Direct Visualization of the Outer Membrane of Mycobacteria and Corynebacteria in Their Native State. *J. Bacteriol.* **190**, 5672–5680 (2008).
117. Vincent, A. T. et al. The mycobacterial cell envelope: a relict from the past or the result of recent evolution? *Front. Microbiol.* **9**, 2341 (2018).

118. Bansal-Mutalik, R. & Nikaido, H. Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 4958–4963 (2014).
119. Mishra, A. K. et al. Lipoarabinomannan biosynthesis in *Corynebacterineae*: the interplay of two $\alpha(1\rightarrow2)$ -mannopyranosyltransferases MptC and MptD in mannan branching. *Mol. Microbiol.* **80**, 1241–1259 (2011).
120. Berg, S., Kaur, D., Jackson, M. & Brennan, P. J. The glycosyltransferases of *Mycobacterium tuberculosis* - roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates. *Glycobiology* **17**, 35–56R (2007).
121. Kremer, L. et al. Characterization of a putative alpha-mannosyltransferase involved in phosphatidylinositol trimannoside biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **363**, 437–447 (2002).
122. Kaur, D. et al. New insights into the biosynthesis of mycobacterial lipomannan arising from deletion of a conserved gene. *J. Biol. Chem.* **282**, 27133–27140 (2007).
123. Jankute, M., Cox, J. A., Harrison, J. & Besra, G. S. Assembly of the mycobacterial cell wall. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 405–423 (2015).
124. Schleifer, K. H. & Kandler, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407–477 (1972).
125. Lavollay, M. et al. The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. *J. Bacteriol.* **190**, 4360–4366 (2008).
126. Gee, C. L. et al. A phosphorylated pseudokinase complex controls cell wall synthesis in mycobacteria. *Sci. Signal.* **5**, ra7 (2012).
127. Trunkfield, A. E., Gurcha, S. S., Besra, G. S. & Bugg, T. D. H. Inhibition of *Escherichia coli* glycosyltransferase MurG and *Mycobacterium tuberculosis* Gal transferase by uridine-linked transition state mimics. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 2651–2663 (2010).
128. Raghavendra, T., Patil, S. & Mukherjee, R. Peptidoglycan in *Mycobacteria*: chemistry, biology and intervention. *Glycoconj. J.* **35**, 421–432 (2018).
129. McNeil, M., Wallner, S. J., Hunter, S. W. & Brennan, P. J. Demonstration that the galactosyl and arabinosyl residues in the cell-wall arabinogalactan of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* are furanoid. *Carbohydr. Res.* **166**, 299–308 (1987).
130. Kaur, D., Guerin, M. E., Skovierová, H., Brennan, P. J. & Jackson, M. Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv. Appl. Microbiol.* **69**, 23–78 (2009).
131. Crick, D. C., Mahapatra, S. & Brennan, P. J. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* **11**, 107R–118R (2001).
132. Yuan, Y., Mead, D., Schroeder, B. G., Zhu, Y. & Barry, C. E. The Biosynthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*: ENZYMATIC METHYL(ENE) TRANSFER TO ACYL CARRIER PROTEIN BOUND MEROMYCOLIC ACID IN VITRO *. *J. Biol. Chem.* **273**, 21282–21290 (1998).
133. Minnikin, D. E., Kremer, L., Dover, L. G. & Besra, G. S. The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biol.* **9**, 545–553 (2002).
134. MINNIKIN, D. E. Lipids, complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. *Physiol. Identif. Classif.* 95–184 (1982).
135. Liu, J., Barry, C. E., Besra, G. S. & Nikaido, H. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* **271**, 29545–29551 (1996).
136. Liu, J. & Nikaido, H. A mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4011–4016 (1999).
137. Pawełczyk, J. & Kremer, L. The Molecular Genetics of Mycolic Acid Biosynthesis. *Microbiol. Spectr.* **2**, MGM2-0003–2013 (2014).
138. Nataraj, V. et al. Mycolic acids: deciphering and targeting the Achilles' heel of the tubercle bacillus. *Mol. Microbiol.* **98**, 7–16 (2015).

139. Bhatt, A., Molle, V., Besra, G. S., Jacobs, W. R. & Kremer, L. The Mycobacterium tuberculosis FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Mol. Microbiol.* **64**, 1442–1454 (2007).
140. Raynaud, C. et al. The functions of OmpATb, a pore-forming protein of Mycobacterium tuberculosis. *Mol. Microbiol.* **46**, 191–201 (2002).
141. Meniche, X. et al. Subpolar addition of new cell wall is directed by DivIVA in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E3243–3251 (2014).
142. Aldridge, B. B. et al. Asymmetry and Aging of Mycobacterial Cells Lead to Variable Growth and Antibiotic Susceptibility. *Science* **335**, 100–104 (2012).
143. Santi, I., Dhar, N., Bousbaine, D., Wakamoto, Y. & McKinney, J. D. Single-cell dynamics of the chromosome replication and cell division cycles in mycobacteria. *Nat. Commun.* **4**, 2470 (2013).
144. Joyce, G. et al. Cell division site placement and asymmetric growth in mycobacteria. *PLoS One* **7**, e44582 (2012).
145. Hannebelle, M. T. M. et al. A biphasic growth model for cell pole elongation in mycobacteria. *Nat. Commun.* **11**, 452 (2020).
146. Daniel, R. A. & Errington, J. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**, 767–776 (2003).
147. Jani, C. et al. Regulation of Polar Peptidoglycan Biosynthesis by Wag31 Phosphorylation in Mycobacteria. *BMC Microbiol.* **10**, 327 (2010).
148. Kang, C.-M., Nyayapathy, S., Lee, J.-Y., Suh, J.-W. & Husson, R. N. Wag31, a homologue of the cell division protein DivIVA, regulates growth, morphology and polar cell wall synthesis in mycobacteria. *Microbiol. Read. Engl.* **154**, 725–735 (2008).
149. Nguyen, L. et al. Antigen 84, an effector of pleiomorphism in Mycobacterium smegmatis. *J. Bacteriol.* **189**, 7896–7910 (2007).
150. Plocinski, P. et al. 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 (2012).
151. Donovan, C. & Bramkamp, M. Cell division in Corynebacterineae. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
152. Plocinski, P. et al. Mycobacterium tuberculosis CwsA overproduction modulates cell division and cell wall synthesis. *Tuberculosis* **93**, S21–S27 (2013).
153. England, K., Crew, R. & Slayden, R. A. Mycobacterium tuberculosis septum site determining protein, Ssd encoded by rv3660c, promotes filamentation and elicits an alternative metabolic and dormancy stress response. *BMC Microbiol.* **11**, 79 (2011).
154. Messelink, J. J., Meyer, F., Bramkamp, M. & Broedersz, C. P. Single-cell growth inference of Corynebacterium glutamicum reveals asymptotically linear growth. *eLife* **10**, e70106 (2021).
155. Sogues, A. et al. Essential dynamic interdependence of FtsZ and SepF for Z-ring and septum formation in Corynebacterium glutamicum. *Nat. Commun.* **11**, 1641 (2020).
156. Gola, S., Munder, T., Casonato, S., Manganelli, R. & Vicente, M. The essential role of SepF in mycobacterial division. *Mol. Microbiol.* **97**, 560–576 (2015).
157. Gamba, P., Hamoen, L. W. & Daniel, R. A. Cooperative Recruitment of FtsW to the Division Site of Bacillus subtilis. *Front. Microbiol.* **7**, 1808 (2016).
158. Egan, A. J. F. & Vollmer, W. The physiology of bacterial cell division. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1277**, 8–28 (2013).
159. Wu, K. J. et al. Characterization of Conserved and Novel Septal Factors in Mycobacterium smegmatis. *J. Bacteriol.* **200**, e00649-17 (2018).
160. Boutte, C. C. et al. A cytoplasmic peptidoglycan amidase homologue controls mycobacterial cell wall synthesis. *eLife* **5**, e14590 (2016).
161. Kieser, K. J. et al. Peptidoglycan synthesis in Mycobacterium tuberculosis is organized into networks with varying drug susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 13087–13092 (2015).
162. Kieser, K. J. et al. Phosphorylation of the Peptidoglycan Synthase PonA1 Governs the Rate of Polar Elongation in Mycobacteria. *PLoS Pathog.* **11**, e1005010 (2015).

163. Chao, M. C. et al. Protein complexes and proteolytic activation of the cell wall hydrolase RipA regulate septal resolution in mycobacteria. *PLoS Pathog.* **9**, e1003197 (2013).
164. Scheffers, D.-J. & Pinho, M. G. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **MMBR** **69**, 585–607 (2005).
165. Smith, T. J., Blackman, S. A. & Foster, S. J. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiol. Read. Engl.* **146 (Pt 2)**, 249–262 (2000).
166. Ishikawa, S., Hara, Y., Ohnishi, R. & Sekiguchi, J. Regulation of a new cell wall hydrolase gene, *cwlF*, which affects cell separation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**, 2549–2555 (1998).
167. Hett, E. C., Chao, M. C. & Rubin, E. J. Interaction and modulation of two antagonistic cell wall enzymes of mycobacteria. *PLoS Pathog.* **6**, e1001020 (2010).
168. Martinez, M. et al. Eukaryotic-like gephyrin and cognate membrane receptor coordinate corynebacterial cell division and polar elongation. *Nat. Microbiol.* **8**, 1896–1910 (2023).
169. Rossello, J. et al. FhaA plays a key role in mycobacterial polar elongation and asymmetric growth. *mBio* **16**, e0252624 (2025).
170. Molle, V. & Kremer, L. Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol. Microbiol.* **75**, 1064–1077 (2010).
171. Bellinzoni, M., Wehenkel, A. M., Durán, R. & Alzari, P. M. Novel mechanistic insights into physiological signaling pathways mediated by mycobacterial Ser/Thr protein kinases. *Microbes Infect.* **21**, 222–229 (2019).
172. Cole, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537–544 (1998).
173. Kang, C.-M. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev.* **19**, 1692–1704 (2005).
174. Schultz, C. et al. Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of *Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases. *Mol. Microbiol.* **74**, 724–741 (2009).
175. Iswahyudi, null et al. Mycobacterial phosphatase PstP regulates global serine threonine phosphorylation and cell division. *Sci. Rep.* **9**, 8337 (2019).
176. Fiuza, M. et al. From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. *J. Biol. Chem.* **283**, 18099–18112 (2008).
177. Fortuin, S. et al. Phosphoproteomics analysis of a clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolate: expanding the mycobacterial phosphoproteome catalog. *Front. Microbiol.* **6**, 6 (2015).
178. Pristic, S. et al. Extensive phosphorylation with overlapping specificity by *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 7521–7526 (2010).
179. Bendt, A. K. et al. Towards a phosphoproteome map of *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics* **3**, 1637–1646 (2003).
180. Habibi Arejan, N. et al. Polar protein Wag31 both activates and inhibits cell wall metabolism at the poles and septum. *Front. Microbiol.* **13**, 1085918 (2022).
181. *Corynebacterium Glutamicum: Biology and Biotechnology*. vol. 23 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2013).
182. Fernandez, P. et al. The Ser/Thr Protein Kinase PknB Is Essential for Sustaining Mycobacterial Growth. *J. Bacteriol.* **188**, 7778–7784 (2006).
183. Wasinger, V. C. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**, 1090–1094 (1995).
184. Smith, L. M. & Kelleher, N. L. Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat. Methods* **10**, 186–187 (2013).
185. Tran, J. C. et al. Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature* **480**, 254–258 (2011).
186. Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M.-C. & Yates, J. R. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem. Rev.* **113**, 2343–2394 (2013).

187. Gregorich, Z. R., Chang, Y.-H. & Ge, Y. Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up? *Pflugers Arch.* **466**, 1199–1209 (2014).
188. Meissner, F., Geddes-McAlister, J., Mann, M. & Bantscheff, M. The emerging role of mass spectrometry-based proteomics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **21**, 637–654 (2022).
189. Gillet, L. C. et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**, O111.016717 (2012).
190. Ward, B. et al. Deep plasma proteomics with data-independent acquisition: A fastlane towards biomarkers identification. 2024.02.23.581160 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2024.02.23.581160> (2024).
191. Liu, K., Ye, Y., Li, S. & Tang, H. Accurate de novo peptide sequencing using fully convolutional neural networks. *Nat. Commun.* **14**, 7974 (2023).
192. Kalhor, M., Lapin, J., Picciani, M. & Wilhelm, M. Rescoring Peptide Spectrum Matches: Boosting Proteomics Performance by Integrating Peptide Property Predictors Into Peptide Identification. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **23**, 100798 (2024).
193. Peptide Search — pyOpenMS 3.0.0 documentation. https://pyopenms.readthedocs.io/en/release3.0.0/user_guide/peptide_search.html.
194. Schubert, O. T., Röst, H. L., Collins, B. C., Rosenberger, G. & Aebersold, R. Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. *Nat. Protoc.* **12**, 1289–1294 (2017).
195. Neilson, K. A., Keighley, T., Pascovici, D., Cooke, B. & Haynes, P. A. Label-free quantitative shotgun proteomics using normalized spectral abundance factors. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1002**, 205–222 (2013).
196. Villar, M., Marina, A. & de la Fuente, J. Applying proteomics to tick vaccine development: where are we? *Expert Rev. Proteomics* **14**, 211–221 (2017).
197. Berggård, T., Linse, S. & James, P. Methods for the detection and analysis of protein–protein interactions. *Proteomics* **7**, 2833–2842 (2007).
198. Kim, D. & Nita-Lazar, A. Progress in mass spectrometry approaches to profiling protein–protein interactions in the studies of the innate immune system. *J. Proteins Proteomics* **15**, 545–559 (2024).
199. Wu, S., Zhang, S., Liu, C.-M., Fernie, A. R. & Yan, S. Recent Advances in Mass Spectrometry-based Protein Interactome Studies. *Mol. Cell. Proteomics* 100887 (2024) doi:10.1016/j.mcpro.2024.100887.
200. Liu, X., Abad, L., Chatterjee, L., Cristea, I. M. & Varjosalo, M. Mapping protein–protein interactions by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* mas.21887 (2024) doi:10.1002/mas.21887.
201. Low, T. Y. et al. Recent progress in mass spectrometry-based strategies for elucidating protein–protein interactions. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 5325–5339 (2021).
202. Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H. & Maertens, B. Purification of his-tagged proteins. in *Methods in enzymology* vol. 559 1–15 (Elsevier, 2015).
203. Kim, D., Lee, M. S., Kim, N. D., Lee, S. & Lee, H. S. Identification of α -amanitin effector proteins in hepatocytes by limited proteolysis-coupled mass spectrometry. *Chem. Biol. Interact.* **386**, 110778 (2023).
204. Brizzard, B. L., Chubet, R. G. & Vizard, D. Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *Biotechniques* **16**, 730–735 (1994).
205. Schmidt, T. G. & Skerra, A. The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng. Des. Sel.* **6**, 109–122 (1993).
206. Schmidt, T. G., Koepke, J., Frank, R. & Skerra, A. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.* **255**, 753–766 (1996).
207. Klykov, O. et al. Efficient and robust proteome-wide approaches for cross-linking mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **13**, 2964–2990 (2018).

208. Zhang, H. et al. In vivo identification of the outer membrane protein OmcA-MtrC interaction network in *Shewanella oneidensis* MR-1 cells using novel hydrophobic chemical cross-linkers. *J. Proteome Res.* **7**, 1712–1720 (2008).
209. Chavez, J. D., Weisbrod, C. R., Zheng, C., Eng, J. K. & Bruce, J. E. Protein interactions, post-translational modifications and topologies in human cells. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **12**, 1451–1467 (2013).
210. Kaake, R. M. et al. A New in Vivo Cross-linking Mass Spectrometry Platform to Define Protein–Protein Interactions in Living Cells. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **13**, 3533–3543 (2014).
211. Wu, S., Zhang, S., Liu, C.-M., Fernie, A. R. & Yan, S. Recent Advances in Mass Spectrometry-Based Protein Interactome Studies. *Mol. Cell. Proteomics* **24**, 100887 (2025).
212. Salas, D., Stacey, R. G., Akinlaja, M. & Foster, L. J. Next-generation Interactomics: Considerations for the Use of Co-elution to Measure Protein Interaction Networks. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **19**, 1–10 (2020).
213. Caudron-Herger, M. et al. Identification, quantification and bioinformatic analysis of RNA-dependent proteins by RNase treatment and density gradient ultracentrifugation using R-DeeP. *Nat. Protoc.* **15**, 1338–1370 (2020).
214. Hillier, C. et al. Landscape of the Plasmodium Interactome Reveals Both Conserved and Species-Specific Functionality. *Cell Rep.* **28**, 1635–1647.e5 (2019).
215. Rackiewicz, M., Große-Hovest, L., Alpert, A. J., Zarei, M. & Dengjel, J. Hydrophobic Interaction Chromatography for Bottom-Up Proteomics Analysis of Single Proteins and Protein Complexes. *J. Proteome Res.* **16**, 2318–2323 (2017).
216. Malinowska, L. et al. Proteome-wide structural changes measured with limited proteolysis-mass spectrometry: an advanced protocol for high-throughput applications. *Nat. Protoc.* **18**, 659–682 (2023).
217. Nagel, L. et al. Analysis of Limited Proteolysis-Coupled Mass Spectrometry Data. *Mol. Cell. Proteomics* **24**, 100934 (2025).
218. Mateus, A. et al. Thermal proteome profiling in bacteria: probing protein state in vivo. *Mol. Syst. Biol.* **14**, e8242 (2018).
219. Becher, I. et al. Pervasive Protein Thermal Stability Variation during the Cell Cycle. *Cell* **173**, 1495–1507.e18 (2018).
220. Tan, C. S. H. et al. Thermal proximity coaggregation for system-wide profiling of protein complex dynamics in cells. *Science* **359**, 1170–1177 (2018).
221. Mateus, A. et al. Thermal proteome profiling for interrogating protein interactions. *Mol. Syst. Biol.* **16**, e9232 (2020).
222. Becher, I. et al. Thermal profiling reveals phenylalanine hydroxylase as an off-target of panobinostat. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 908–910 (2016).
223. Searle, B. C. Characterizing protein-protein interactions with thermal proteome profiling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **89**, 102946 (2024).
224. Mateus, A. et al. The functional proteome landscape of *Escherichia coli*. *Nature* **588**, 473–478 (2020).
225. Qin, W., Cho, K. F., Cavanagh, P. E. & Ting, A. Y. Deciphering molecular interactions by proximity labeling. *Nat. Methods* **18**, 133–143 (2021).
226. Samavarchi-Tehrani, P., Samson, R. & Gingras, A.-C. Proximity dependent biotinylation: key enzymes and adaptation to proteomics approaches. *Mol. Cell. Proteomics* **19**, 757–773 (2020).
227. Arora, D. et al. Establishment of proximity-dependent biotinylation approaches in different plant model systems. *Plant Cell* **32**, 3388–3407 (2020).
228. Chen, C. & Perrimon, N. Proximity-dependent labeling methods for proteomic profiling in living cells. *WIREs Dev. Biol.* **6**, e272 (2017).
229. Kim, D. I. et al. BioSITE: A Method for Direct Detection and Quantitation of Site-Specific Biotinylation. *J. Proteome Res.* **17**, 759–769 (2018).
230. Schiapparelli, L. M. et al. Direct detection of biotinylated proteins by mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **13**, 3966–3978 (2014).

231. Schopp, I. M. et al. Split-BioID a conditional proteomics approach to monitor the composition of spatiotemporally defined protein complexes. *Nat. Commun.* **8**, 15690 (2017).
232. Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. & Burke, B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **196**, 801–810 (2012).
233. Choi-Rhee, E., Schulman, H. & Cronan, J. E. Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. *Protein Sci.* **13**, 3043–3050 (2004).
234. Eesmaa, A. et al. The cytoprotective protein MANF promotes neuronal survival independently from its role as a GRP78 cofactor. *J. Biol. Chem.* **296**, (2021).
235. Gawriyski, L. et al. Interaction network of human early embryonic transcription factors. *EMBO Rep.* **25**, 1589–1622 (2024).
236. Hoyer, M. J. et al. A novel class of ER membrane proteins regulates ER-associated endosome fission. *Cell* **175**, 254–265 (2018).
237. May, D. G. et al. A BioID-derived proximity interactome for SARS-CoV-2 proteins. *Viruses* **14**, 611 (2022).
238. Chojnowski, A. et al. 2C-BioID: an advanced two component BioID system for precision mapping of protein interactomes. *IScience* **10**, 40–52 (2018).
239. Kim, D. I. et al. An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol. Biol. Cell* **27**, 1188–1196 (2016).
240. Kubitz, L. et al. Engineering of ultraID, a compact and hyperactive enzyme for proximity-dependent biotinylation in living cells. *Commun. Biol.* **5**, 657 (2022).
241. Branon, T. C. et al. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat. Biotechnol.* **36**, 880–887 (2018).
242. Wei, W. et al. Cell type-selective secretome profiling in vivo. *Nat. Chem. Biol.* **17**, 326–334 (2021).
243. Zhang, S., Tang, Q., Zhang, X. & Chen, X. Proximitomics by Reactive Species. *ACS Cent. Sci.* **10**, 1135–1147 (2024).
244. Cho, K. F. et al. Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID. *Nat. Protoc.* **15**, 3971–3999 (2020).
245. Santos-Barriopedro, I., van Mierlo, G. & Vermeulen, M. Off-the-shelf proximity biotinylation for interaction proteomics. *Nat. Commun.* **12**, 5015. (2021).
246. Villaseñor, R. et al. ChromID identifies the protein interactome at chromatin marks. *Nat. Biotechnol.* **38**, 728–736 (2020).
247. Kido, K. et al. AirID, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein–protein interactions. *Elife* **9**, e54983 (2020).
248. Lee, S.-Y. et al. Engineered allostery in light-regulated LOV-Turbo enables precise spatiotemporal control of proximity labeling in living cells. *Nat. Methods* **20**, 908–917 (2023).
249. Mortensen, A. & Skibsted, L. H. Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2970–2977 (1997).
250. Hung, V. et al. Proteomic mapping of the human mitochondrial intermembrane space in live cells via ratiometric APEX tagging. *Mol. Cell* **55**, 332–341 (2014).
251. Rhee, H.-W. et al. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science* **339**, 1328–1331 (2013).
252. Guo, J. et al. The development of proximity labeling technology and its applications in mammals, plants, and microorganisms. *Cell Commun. Signal.* **21**, 269 (2023).
253. Azevedo, A. M. et al. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.* **9**, 1387–2656 (2003).
254. Lam, S. S. et al. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nat. Methods* **12**, 51–54 (2015).
255. Martell, J. D. et al. Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nat. Biotechnol.* **30**, 1143–1148 (2012).
256. Chu, Q. et al. Identification of Microprotein–Protein Interactions via APEX Tagging. *Biochemistry* **56**, 3299–3306 (2017).

257. Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A. & Seliger, B. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun. Signal. CCS* **13**, 39 (2015).
258. Hung, V. et al. Proteomic mapping of cytosol-facing outer mitochondrial and ER membranes in living human cells by proximity biotinylation. *eLife* **6**, e24463 (2017).
259. Li, Y. et al. A Clickable APEX Probe for Proximity-Dependent Proteomic Profiling in Yeast. *Cell Chem. Biol.* **27**, 858-865.e8 (2020).
260. Zhou, Y. et al. Expanding APEX2 Substrates for Proximity-Dependent Labeling of Nucleic Acids and Proteins in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **58**, 11763–11767 (2019).
261. Le Guerroué, F. et al. Autophagosomal Content Profiling Reveals an LC3C-Dependent Piecemeal Mitophagy Pathway. *Mol. Cell* **68**, 786-796.e6 (2017).
262. Letek, M. & Ordoñez, E. Characterization of the promoter region of *ftsZ* from *Corynebacterium glutamicum* and controlled overexpression of *FtsZ*. *Int. Microbiol.* 271–282 (2007) doi:10.2436/20.1501.01.36.
263. Keilhauer, C., Eggeling, L. & Sahm, H. Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**, 5595–5603 (1993).
264. Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C. & Eliceiri, K. W. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.* **82**, 518–529 (2015).
265. Cohen, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. (L. Erlbaum Associates, Hillsdale, N.J, 1988).
266. Sawilowsky, S. S. New Effect Size Rules of Thumb. *J. Mod. Appl. Stat. Methods* **8**, 597–599 (2009).
267. Santos, M. D. M. et al. Simple, efficient and thorough shotgun proteomic analysis with PatternLab V. *Nat. Protoc.* **17**, 1553–1578 (2022).
268. Carvalho, P. C. et al. Analyzing marginal cases in differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* **27**, 275–276 (2011).
269. Erde, J., Loo, R. R. O. & Loo, J. A. Enhanced FASP (eFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. *J. Proteome Res.* **13**, 1885–1895 (2014).
270. D. M. Santos, M., C. Camillo-Andrade, A., Rodriguez, A. & Durán, R. A Module for Analyzing Interactomes via APEX-MS Integrated into PatternLab for Proteomics. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **35**, 1055–1058 (2024).
271. Bin, P., Huang, R. & Zhou, X. Oxidation Resistance of the Sulfur Amino Acids: Methionine and Cysteine. *BioMed Res. Int.* **2017**, 9584932 (2017).
272. Udeshi, N. D. et al. Antibodies to biotin enable large-scale detection of biotinylation sites on proteins. *Nat. Methods* **14**, 1167–1170 (2017).
273. Letek, M. et al. DivIVA Is Required for Polar Growth in the MreB-Lacking Rod-Shaped Actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **190**, 3283–3292 (2008).
274. Luo, S. et al. Sensitive and specific affinity purification-mass spectrometry assisted by PafA-mediated proximity labeling. *Cell Rep. Methods* **5**, 101166 (2025).
275. Renuse, S. et al. Signature Fragment Ions of Biotinylated Peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **31**, 394–404 (2020).
276. Jiang, F., Ge, X. & Bennett, E. J. Employing Expression-Matched Controls Enables High-Confidence Proximity-Based Interactome Classification. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **24**, 101001 (2025).
277. Martell, J. D., Deerinck, T. J., Lam, S. S., Ellisman, M. H. & Ting, A. Y. Electron microscopy using the genetically encoded APEX2 tag in cultured mammalian cells. *Nat. Protoc.* **12**, 1792–1816 (2017).
278. Zeng, J. et al. Protein kinases PknA and PknB independently and coordinately regulate essential *Mycobacterium tuberculosis* physiologies and antimicrobial susceptibility. *PLOS Pathog.* **16**, e1008452 (2020).
279. Kang, C.-M. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev.* **19**, 1692–1704 (2005).

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

9. ANEXOS

Tabla Suplementaria 1A: Proteínas detectadas exclusivamente en la cepa C.glu_apex2-ftsZ

ID Uniprot	Número de réplicas	Número total de espectros	Número de espectros R1	Número de espectros R2	Número de espectros R3	Descripción
Q8NSS0	3	160	53	54	53	Chaperonin GroEL 1 GN=groEL1
Q8NSE1	3	18	7	8	3	DNA helicase GN=Cgl0735
Q8NSK2	3	17	6	5	6	ABC-type transporter, periplasmic component GN=Cgl0669
Q8NPJ9	3	16	5	6	5	Lipoprotein GN=Cgl1813
Q8NQ48	3	14	4	6	4	tRNA and rRNA cytosine-C5-methylases GN=Cgl1599
Q8NMF1	3	13	6	3	4	Trehalose 6-phosphate phosphatase GN=Cgl2626
Q8NTW8	3	12	2	5	5	Glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase large subunit GN=Cgl0184
Q8NPY9	3	12	7	3	2	Predicted iron-dependent peroxidase GN=Cgl1672
Q8NSM2	3	12	4	5	3	ABC-type Fe ³⁺ -siderophores transport systems, periplasmic components GN=Cgl0646
Q8NPK6	3	12	4	4	4	DUF2188 domain-containing protein GN=Cgl1806
Q8NPK7	3	11	4	3	4	Phage protein GN=Cgl1805
Q8NS28	2	11	7		4	ATP-dependent DNA helicase GN=Cgl0854
Q8NSY3	3	10	3	3	4	ABC-type transporter, duplicated ATPase component GN=Cgl0532
Q8NNY5	3	10	4	4	2	Dinucleotide-utilizing enzymes involved in molybdopterin and thiamine biosynthesis family 2 GN=Cgl2042
Q8NQY4	3	10	6	2	2	Predicted signal-transduction protein containing cAMP-binding and CBS domains GN=Cgl1288
Q59200	3	10	3	4	3	Aspartate ammonia-lyase GN=aspA
Q8NL80	3	10	3	3	4	site-specific DNA-methyltransferase (adenine-specific) GN=Cgl3069
Q8NQD1	3	9	2	3	4	Methionine synthase GN=Cgl1507

Q8NQ08	2	9	4	5		Glycerol-3-phosphate dehydrogenase GN=Cgl1646
Q8NRG4	3	8	3	3	2	Excinuclease ATPase subunit GN=Cgl1085
Q8NSU4	3	8	3	3	2	Cyclopropane fatty acid synthase and related methyltransferases GN=Cgl0573
Q8NTV2	3	8	2	3	3	ABC-type transporter, ATPase component GN=Cgl0200
Q8NSK6	3	8	3	3	2	Siderophore-interacting protein GN=Cgl0665
Q8NTH1	3	7	3	2	2	ABC-type Fe ³⁺ -siderophores transport systems, periplasmic components GN=Cgl0336
Q8NQ58	3	7	2	2	3	Probable cell division protein WhiA GN=whiA
Q8NND1	3	7	3	3	1	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase-like protein GN=dgt
O85175	3	7	2	2	3	Arginine repressor GN=argR
Q8NL64	2	7	3	4		tRNA nucleotidyltransferase/poly(A) polymerase GN=Cgl3085
Q8NLR7	2	7		5	2	Polyketide synthase modules and related proteins GN=Cgl2871
Q8NQG3	3	6	2	2	2	DNA alkylation repair protein GN=Cgl1472
Q8NMW4	3	6	2	2	2	DUF222 domain-containing protein GN=Cgl2450
Q8NTV0	3	6	3	1	2	Selenocysteine lyase GN=Cgl0202
Q8NNP5	3	6	2	2	2	L-asparaginase/archaeal Glu-tRNA ^{Gln} amidotransferase subunit D GN=Cgl2143
Q8NL65	3	6	2	2	2	UPF0301 protein Cgl3084/cg3414 GN=Cgl3084
Q8NQL0	3	6	2	2	2	Sulfurtransferase GN=Cgl1424
Q8NR37	2	6	3	3		ABC-type transporter, ATPase component GN=Cgl1227
Q8NPF5	2	6	3	3		Uncharacterized protein GN=Cgl1858
Q8NSD5	2	6	4	2		Predicted glycosyltransferases GN=Cgl0741
Q8NQB0	2	6	2	4		Periplasmic protein kinase ArgK and related GTPases of G3E family GN=Cgl1528
Q8NQM2	2	6	4	2		Predicted rRNA methylases GN=Cgl1412
Q8NNX7	2	6		4	2	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase GN=trmD
Q8NUC9	2	6		2	4	Transcriptional regulator GN=Cgl0010
Q8NR41	2	6		2	4	ABC-type transporter, periplasmic component GN=Cgl1223
Q8NN20	2	6		3	3	Predicted hydrolases or acyltransferases (Alpha/beta hydrolase superfamily)

						GN=Cgl2393
Q8NN59	3	5	1	2	2	Phosphoglycerate mutase/fructose-2,6-bisphosphatase GN=Cgl2350
Q8NMK6	3	5	2	2	1	Predicted dithiol-disulfide isomerase involved in polyketide biosynthesis GN=Cgl2567
Q8NTG2	3	5	2	1	2	Protein-tyrosine-phosphatase GN=Cgl0345
Q8NPB3	2	5	2		3	Ribonuclease D GN=Cgl1901
Q8NLW7	2	5	2	3		Uncharacterized BCR GN=Cgl2819
Q8NU69	2	5	3	2		Phosphoglycerate dehydrogenase and related dehydrogenases GN=Cgl0070
P40111	2	5	3		2	Flavin-dependent thymidylate synthase GN=thyX
Q8NSV0	2	5	2		3	tRNA pseudouridine synthase A GN=truA
Q8NM15	2	5		2	3	Septum site-determining protein MinC GN=Cgl2767
Q8NLP5	2	4	2	2		Transcriptional regulators GN=Cgl2894
Q8NLL5	2	4	2		2	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA GN=msrA
Q8NTY8	2	4	2		2	AP_endonuc_2 domain-containing protein GN=Cgl0163
Q8NTY7	2	4	2		2	Inositol 2-dehydrogenase GN=iolG
Q8NP91	2	4	3	1		Transcriptional regulator GN=Cgl1925
H7C7J9	2	4		1	3	Predicted ornithine cyclodeaminase, mu-crystallin homolog GN=Cgl1582
Q8NRP4	2	4		2	2	5-oxoprolinase subunit A GN=pxpA
Q8NLD5	2	4		2	2	Malic enzyme GN=Cgl3007
Q8NNR5	2	4		2	2	Coenzyme F420-dependent N5,N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase and related flavin-dependent oxidoreductases GN=Cgl2122
Q8NNN1	2	3	2		1	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase GN=murF
Q8NN23	2	3		2	1	Acyl-CoA:acetate CoA transferase alpha subunit GN=Cgl2390
Q8NRJ2	2	3		2	1	VWFA domain-containing protein GN=Cgl1056
Q8NL73	2	2	1		1	NADPH:quinone reductase and related Zn-dependent oxidoreductases GN=Cgl3076

Tabla Suplementaria 1B: Proteínas detectadas exclusivamente en la cepa C.glu

ID Uniprot	Número de réplicas	Número total de espectros	Número de espectros R1	Número de espectros R2	Número de espectros R3	Descripción
Q8NRR2	3	10	3	4	3	Hypothetical membrane protein GN=Cgl0983
Q8NT32	3	9	3	4	2	Cation transport ATPases GN=Cgl0482
Q8NMS4	3	7	2	3	2	Holo-[acyl-carrier-protein] synthase GN=acpS
Q8NRS4	3	7	2	3	2	Secreted protein GN=Cgl0971
Q8NMQ1	2	7		4	3	ATP-dependent Clp protease adapter protein ClpS GN=clpS
Q8NRC6	3	6	2	2	2	Hypothetical membrane protein GN=Cgl1126
Q8NT63	2	6	2	4		Hypothetical membrane protein GN=Cgl0447
Q8NMS8	2	6		4	2	Amidases related to nicotinamidase GN=Cgl2487
Q8NTW1	2	6		3	3	RelB antitoxin GN=Cgl0191
Q8NLQ8	2	5	2	3		Membrane-associated phospholipid phosphatase GN=Cgl2881
Q8NT57	2	5	2	3		Probable 5-dehydro-4-deoxyglucarate dehydratase GN=Cgl0453
Q8NT46	2	5	3	2		Putative pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase GN=Cgl0465
Q8NSK7	2	5		3	2	Hypothetical membrane protein GN=Cgl0663
Q8NP53	2	5		3	2	DNA translocase FtsK GN=ftsK
Q8NMQ0	3	4	1	1	2	SCP domain-containing protein GN=Cgl2516
Q8NNR3	2	4	2	2		Secreted protein GN=Cgl2124
Q8NLC7	2	4	2	2		Hypothetical membrane protein GN=Cgl3015
Q8NMD0	2	4	2		2	Putative N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase GN=nanE
Q8NNG4	2	4		2	2	Protein-tyrosine-phosphatase GN=Cgl2240
Q8NMX0	2	4		2	2	Uncharacterized membrane-associated protein GN=Cgl2443
Q8NQ94	2	4		2	2	UPF0237 protein Cgl1544/cg1742 GN=Cgl1544
Q8NPJ0	2	4		2	2	Uncharacterized protein Cgl1822/cg2042 GN=cg2042

Q8NLU7	2	4		2	2	Hypothetical membrane protein GN=Cgl2839
Q8NU30	2	4		2	2	Predicted hydrolases of the HAD superfamily GN=Cgl0119
Q8NS61	2	3	2		1	Cytochrome P450 GN=Cgl0818
Q8NQ16	2	3	1	2		Predicted membrane protein GN=Cgl1638
Q8NQR0	2	3	1	2		Ribokinase GN=rbsK

Tabla Suplementaria 2A: Proteínas sobreexpresadas en C.glu_apex2-ftsZ

ID Uniprot	Tasa de ambio	Valor p	Descripción
Q8NQA9	3.15	2.95E-04	Methylmalonyl-CoA mutase, N-terminal domain/subunit GN=Cgl1529
Q8NQK6	2.96	2.83E-02	GTPase Der GN=der
Q8NN94	2.88	2.96E-03	Coenzyme F420-dependent N5,N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase and related flavin-dependent oxidoreductases GN=Cgl2311
Q8NNV6	2.46	1.28E-03	Ribonuclease 3 GN=rnc
Q8NMK3	2.43	1.49E-04	tRNA-dihydrouridine synthase GN=Cgl2570
Q8NRX9	2.29	1.43E-04	ABC-type transporter, duplicated ATPase component GN=Cgl0912
Q8NM58	2.15	2.03E-02	DUF87 domain-containing protein GN=Cgl2722
Q8NQ52	2.03	5.36E-03	Riboflavin biosynthesis protein RibBA GN=ribBA
Q8NR57	2.00	1.12E-02	Peptide chain release factor 1 GN=prfA

Tabla Suplementaria 2B: Proteínas sobreexpresadas en C.glu

ID Uniprot	Tasa de ambio	Valor p	Descripción
Q8NNK9	-2.05	2.40E-03	Glucokinase GN=Cgl2185
Q8NQ93	-2.10	1.31E-02	UPF0210 protein Cgl1545/cg1743 GN=Cgl1545
Q8NNG7	-2.13	2.08E-02	Zn-ribbon protein, possibly nucleic acid-binding GN=Cgl2237
Q8NLN6	-2.22	1.61E-02	Uncharacterized ACR, homolog of gamma-carboxymuconolactone decarboxylase subunit GN=Cgl2904
Q8NP73	-2.29	1.02E-03	Diaminopimelate epimerase GN=dapF

Q8NNH4	-2.30	5.16E-03	Glutamine synthetase GN=Cgl2229
Q8NU64	-2.33	2.56E-02	Cytosine deaminase and related metal-dependent hydrolases GN=Cgl0076
Q8NPA9	-2.91	1.83E-02	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase GN=dut
Q8NU29	-3.22	5.98E-03	Carbonic anhydrases/acetyltransferases, isoleucine patch superfamily GN=Cgl0120
Q8NLD1	-6.57	1.69E-02	Dihydrolipoamide dehydrogenase/glutathione oxidoreductase and related enzymes GN=Cgl3011

Tabla Suplementaria 3: Péptidos marcados con FB detectados exclusivamente en la cepa C.glu_apex2-ftsZ

Péptidos	Número de réplicas	Número total de espectros	Número de espectros R1	Número de espectros R2	Número de espectros R3	ID Uniprot	Descripción
DY[361.1460]GYAPEAPAPVAP SPAPR	3	82	32	27	23	Q8NNN6	Cell division protein SepF
Y[361.1460]IGDGETVK	3	74	30	22	22	Q8NLC0	2-keto-4-pentenoate hydratase/2-oxohepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (Catechol pathway)
SY[361.1460]QSTIVPVELHSFE DAQVIGGAFR	3	65	24	21	20	Q8NNN6	Cell division protein SepF
ALTTVTTHDLPPTAGY[361.1460]LEGEHIALR	3	62	35	19	8	Q8NNA7	4-alpha-glucanotransferase
LDFVEELGSDSFLY[361.1460]GK	3	61	21	20	20	Q8NMV1	Trehalose import ATP-binding protein SugC
VLVY[361.1460]GNR	3	61	27	22	12	Q8NTC5	Formyltetrahydrofolate deformylase
AAVVEAGY[361.1460]JK	3	57	23	23	11	Q8NL68	HMA domain-containing protein
NDY[361.1460]ATEHVK	3	55	28	12	15	Q8NLB9	Gentisate 1,2-dioxygenase
AFYDNLVY[361.1460]PSR	3	55	22	20	13	Q8NTE7	UDP-glucose 6-dehydrogenase
Y[361.1460]AADEDAFFADYAE AHQK	3	53	21	20	12	APEX Construcción	
TAALPNGEFNAATLEY[361.1460]GNLINDGVIDPVK	3	53	20	19	14	Q8NSS0	Chaperonin GroEL 1

SNAFEY[361.1460]LR	3	53	21	16	16	Q8NRD3	Methyltransferase
YEGTAA[361.1460]APEYR	3	52	19	19	14	Q8NNN6	Cell division protein SepF
LSELGFADALEGSGQPGSGQ GSGMTSPNNY[361.1460]LAK	3	49	19	15	15	Construcción	
LIEYITHIY[361.1460]PLDAGD VIVTGTGGVGHAR	3	48	22	11	15	Q8NLC0	2-keto-4-pentenoate hydratase/2-oxohepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (Catechol pathway)
VQLY[361.1460]DDEDIDR	3	45	19	17	9	Q8NR14	ATP-dependent 6-phosphofructokinase
DASDTY[361.1460]YVLGDFAD YR	3	45	17	15	13	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
TAVY[361.1460]LHQR	3	44	19	13	12	Q8NP02	Elongation factor Ts
YQLY[361.1460]FDDR	3	44	16	17	11	Q79VE6	Uncharacterized ACR
Y[361.1460]PSVTVK	3	44	20	15	9	Q8NLJ9	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding proteins
AIETGY[361.1460]LEDLWNAP TK	3	43	16	12	15	O85176	Argininosuccinate synthase
HDVTAGDY[361.1460]R	3	42	25	15	2	Q8NU40	Lactoylglutathione lyase and related lyases
VVPPGTGIVHQNIEY[361.1460] LAR	3	41	21	14	6	Q8NQ98	Aconitate hydratase A
STLAY[361.1460]TLGGHPR	3	41	18	12	11	Q8NQ77	ABC-type transporter, ATPase component
IVLAYSGGLDTTVAIPY[361.1460] LK	3	40	15	8	17	O85176	Argininosuccinate synthase
VY[361.1460]TVGEALLSEPTT L	3	40	18	16	6	Q8NL53	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G
ERDYGY[361.1460]APEAPAPV APSPA PR	3	40	18	13	9	Q8NNN6	Cell division protein SepF
SEY[361.1460]ASK	3	39	14	11	14	Q8NNN8	Cell wall synthesis protein Wag31
YGM[15.9949]ADSYDEQGY[361.1460]]IFPEGFDAETNEWLEGFDEQR	3	39	3	2	34	Q8NQR5	Small ribosomal subunit protein bS1
ALLANLAEDLY[361.1460]DEE LR	3	38	17	9	12	P12880	Phosphoenolpyruvate carboxylase

VSEAPGY[361.1460]GQTVIEY DPGSR	3	37	16	11	10	Q8NL54	ATPases involved in chromosome partitioning
GGPGY[361.1460]TFADEFHPE LR	3	37	17	13	7	Q8NUA5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
SYADY[361.1460]VAEDIK	3	36	16	10	10	Q8NT01	Small ribosomal subunit protein uS3
SAIANY[361.1460]TSSYSAEAS R	3	35	13	8	14	Q79VG7	ATP synthase subunit alpha
EY[361.1460]SSSIALGR	3	35	15	10	10	Q8NMA4	diacetyl reductase [(S)-acetoin forming]
Y[361.1460]EGTAAYAPEYR	3	35	16	10	9	Q8NNN6	Cell division protein SepF
KY[361.1460]PDAK	3	35	24	7	4	Q8NSG4	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthase
YAADEDAFFADY[361.1460]AE AHQK	3	34	14	10	10	APEX Construcci ón	
SY[361.1460]ADDK	3	34	18	9	7	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
SY[361.1460]PTVSADYQDAVE K	3	33	18	9	6	APEX Construcci ón	
SSY[361.1460]SAEASR	3	33	17	11	5	Q79VG7	ATP synthase subunit alpha
EFIAGGAEVY[361.1460]R	3	33	18	11	4	Q8NQW7	Phosphomethylpyrimidine synthase
LGSVY[361.1460]DR	3	33	13	11	9	Q8NR01	Hypothetical membrane protein
GY[361.1460]EQEYEETLVNPY	3	33	17	10	6	Q8NSG8	Detergent sensitivity rescuer dtsR2
ANY[361.1460]TAADVK	3	32	15	9	8	Q8NP02	Elongation factor Ts
SLIHGY[361.1460]GK	3	32	17	7	8	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
AY[361.1460]SVQYHPEAAAGP NDASPLFDQFVELMDADAQK	3	31	8	8	15	P58893	Carbamoyl phosphate synthase small chain
LHCLPAY[361.1460]R	3	31	15	12	4	Q59283	Ornithine carbamoyltransferase
TSSY[361.1460]SAEASR	3	31	16	11	4	Q79VG7	ATP synthase subunit alpha
EIVAY[361.1460]LF	3	31	18	9	4	Q8NSV1	Large ribosomal subunit protein bL17
YEGTAAYAPEY[361.1460]R	3	31	15	8	8	Q8NNN6	Cell division protein SepF

TTGNDRDY[361.1460]R	3	30	21	8	1	Construcción P94337	
NEEIAY[361.1460]GSTLNPDALR	3	30	13	10	7	Q8NLC1	Uncharacterized protein
SFY[361.1460]PGAK	3	30	11	9	10	Q8NMW0	Energy-dependent translational throttle protein EttA
SGFEGPWTSNPLIFDNSY[361.1460]FTELLSGEK	3	29	7	5	17	APEX Construcción	
TLAETTGLHPSYLEQLY[361.1460]TFGK	3	29	11	10	8	Q8NRH9	ADP-ribose pyrophosphatase
AFY[361.1460]DNLYPSR	3	29	14	8	7	Q8NTE7	UDP-glucose 6-dehydrogenase
GNVHGVY[361.1460]KPGNVK	3	28	16	9	3	P19537	Fructose-bisphosphate aldolase
GTY[361.1460]ADCEDAAMVVICAGAAQKPGETR	3	28	14	9	5	Q8NLN0	L-lactate dehydrogenase
Y[361.1460]LMASFDNK	3	28	9	9	10	Q8NLJ3	Phage shock protein A (IM30), suppresses sigma54-dependent transcription
DGY[361.1460]LQQVGAPR	3	28	13	8	7	Q8NMV1	Trehalose import ATP-binding protein SugC
DYGY[361.1460]APEAPAPVAPSPAPR	3	28	14	7	7	Q8NNN6	Cell division protein SepF
AVSLEHFGASADY[361.1460]QTLFEK	3	28	13	8	7	Q8NQ65	Transketolase
GDQGY[361.1460]GSTGK	3	27	14	7	6	Q8NPA9	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase
LFGAPPGY[361.1460]VGYEEGGQLTEK	3	27	12	9	6	Q8NMA0	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit
LLEYY[361.1460]AR	3	26	13	6	7	Q8NMK4	Acetyl-CoA hydrolase
DWITVY[361.1460]PF	3	26	9	8	9	Q8NPB5	Coproheme decarboxylase
AIPGLSVLRPADANETAQAWAAALEY[361.1460]K	3	26	9	7	10	Q8NQ65	Transketolase
LGY[361.1460]AEADPTADVEGHDAASK	3	25	12	8	5	P08499	Homoserine dehydrogenase
YSPCDIATY[361.1460]GMGLAASMGQF	3	25	12	8	5	Q8NN01	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2

GEHAY[361.1460]GAPQLNVDI R	3	25	12	6	7	Q9KJU4	Histidinol-phosphate aminotransferase
DLPEDY[361.1460]KER	3	25	14	6	5	Q8NMY8	Uncharacterized protein
EAGTHVEY[361.1460]VVEQTR	3	24	11	7	6	P19583	Triosephosphate isomerase
ILTAEAELEYGIVDQVFDY[361 .1460]R	3	24	9	6	9	Q8NN02	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1
IVLGTGLGY[361.1460]VQPAAV R	3	24	9	9	6	Q8NQ08	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
FY[361.1460]VPSEGR	3	23	12	9	2	Q8NS15	Large ribosomal subunit protein bL28
DGIMVY[361.1460]R	3	23	13	6	4	Q8NLG6	Thioredoxin
ILADSY[361.1460]FDDLPEQR PY	3	23	12	9	2	Q8NS46	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) synthase
LSHY[361.1460]SK	2	23	15	8		Q8NNC6	Glycine--tRNA ligase
GIY[361.1460]PAVNPL	3	22	10	6	6	P42464	ATP synthase subunit beta
LVGAPPGYVGY[361.1460]DQ GGQLTEAVR	3	22	9	9	4	P53532	Chaperone protein ClpB
GY[361.1460]GLGHNFEGR	3	22	10	6	6	Q8NNF6	Pyruvate dehydrogenase E1 component
LAAQY[361.1460]PQHTIF	3	22	10	8	4	Q8NRI0	Quinolate synthase
ATFQPSVDEFISTLEEFATGSY[361.1460]LK	3	22	9	5	8	Q8NQC5	Uncharacterized protein
VNY[361.1460]VDR	3	22	11	7	4	Q8NRC0	Shikimate 5-dehydrogenase
TTLNIGLILPDVLGTY[361.1460]GDDGNALVLR	3	22	10	6	6	Q8NTQ7	Lipid II isoglutaminy synthase (glutamine- hydrolyzing) subunit GatD
EY[361.1460]HNESDELVA AK	3	21	10	6	5	P19583	Triosephosphate isomerase
Y[361.1460]DNSNADQWGFET R	3	21	8	4	9	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase
SY[361.1460]MAGK	3	21	12	5	4	Q8NQH1	Thiamine biosynthesis multifunctional protein ThiED
LGADFY[361.1460]FTVGTIED R	3	21	11	7	3	Q8NT19	Elongation factor G
SYDTPPPELADDAEY[361.1460]SQANDPR	3	21	10	6	5	Q8NTA5	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase

HIVEWLY[361.1460]NR	3	21	9	8	4	Q8NMF7	Predicted hydrolases of the HAD superfamily
GEGLDSPVLY[361.1460]LTAK	3	21	8	7	6	Q8NMG8	Two-component system, response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a HTH DNA-binding domain
PLLEEYY[361.1460]AR	3	21	13	4	4	Q8NMK4	Acetyl-CoA hydrolase
ADMPY[361.1460]FR	3	21	7	8	6	Q8NMX8	Carboxymuconolactone decarboxylase-like domain-containing protein
QAIY[361.1460]IDAHEYDLK	3	21	8	5	8	Q8NN95	cysteine-S-conjugate beta-lyase
DGHVINIGSIAGENPY[361.1460]IGGAGYNAAK	3	21	10	4	7	Q8NNJ5	Short-chain dehydrogenases of various substrate specificities
VHY[361.1460]SEIQGSGFR	2	21	13	8		Q8NTX7	Probable cold shock protein A
AVDGVY[361.1460]SDDPR	3	20	10	7	3	P59004	Uridylate kinase
LY[361.1460]EHPQEK	3	20	11	5	4	Q8NNC6	Glycine--tRNA ligase
RPVVQDPVY[361.1460]K	3	20	12	5	3	Q8NT20	Small ribosomal subunit protein uS7
MLAAY[361.1460]AGHADVVQALIER	3	20	10	7	3	Q8NN64	Ankyrin repeat proteins
TKEFFGLAPYEAHEDAYY[361.1460]ADEPR	3	20	7	6	7	Q8NNN6	Cell division protein SepF
LVY[361.1460]GNR	3	20	10	6	4	Q8NTC5	Formyltetrahydrofolate deformylase
DDPEY[361.1460]APAR	3	20	11	5	4	Q8NTI4	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases
YVLPSFIEQSAY[361.1460]GTK	3	19	9	9	1	Q8NN02	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1
ADPY[361.1460]FLPTVGEMDIY	3	19	10	2	7	Q8NR40	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB
FAGQGY[361.1460]DWLK	3	19	7	7	5	Q8NMS0	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) synthase
EFFGLAPY[361.1460]EAEHEDAYYADEPR	3	19	7	5	7	Q8NNN6	Cell division protein SepF
EANSY[361.1460]GNDPHPPKG	3	19	10	4	5	Q8NPK6	DUF2188 domain-containing protein
ILDAMDSTGADY[361.1460]ADSLAEATR	3	18	6	7	5	P08499	Homoserine dehydrogenase
VTSGLENILEELSPIQDY[361.1	3	18	10	4	4	Q8NT26	DNA-directed RNA polymerase subunit beta

460]SGNMSLSLSEPR							
VSPNLSALSPNADENHDFFSG SGSSY[361.1460]VIGK	3	18	8	4	6	Q79VD6	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta
GY[361.1460]AEGK	3	18	7	8	3	Q8NM99/ Q8NP31	
AAAY[361.1460]AGHADVVQAL IER	3	18	9	4	5	Q8NN64	Ankyrin repeat proteins
SAEPY[361.1460]GR	3	18	10	7	1	Q8NQ65	Transketolase
FDY[361.1460]LDVAIPF	3	18	9	4	5	Q8NS46	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) synthase
LSELGFADALEGSGQPGSGQ GSGM[15.9949]TSPNNY[361.14 60]LAK	3	17	9	2	6	Construcc ión	
ALEDLGPVY[361.1460]SR	3	17	4	7	6	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulphydrylase
IYNPHGQNY[361.1460]VPVDH DLMSYR	3	17	5	4	8	Q8NNF6	Pyruvate dehydrogenase E1 component
AASILEADY[361.1460]GVR	3	17	7	6	4	Q8NNF6	Pyruvate dehydrogenase E1 component
TY[361.1460]QTALGTVR	3	17	7	6	4	Q8NR40	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB
GYLSPY[361.1460]FINDNDTQ QAVLDNPAVL	3	17	8	5	4	Q8NSS0	Chaperonin GroEL 1
Y[361.1460]ADALGAQELTQNT VSDR	3	17	8	4	5	Q8NLJ3	Phage shock protein A (IM30), suppresses sigma54-dependent transcription
IHGLTIGADDY[361.1460]VTKP F	3	17	10	5	2	Q8NMG8	Two-component system, response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a HTH DNA-binding domain
DY[361.1460]TPQIGDIAPPK	3	17	9	6	2	Q8NMP2	Ferritin
TTVTTHDLPPTAGY[361.1460] LEGEHIALR	3	17	11	4	2	Q8NNA7	4-alpha-glucanotransferase
GDDAPTWVMAPMVATAY[36 1.1460]EAK	3	17	5	4	8	Q8NP83	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase
AAFETTIVAYDPY[361.1460]A NPAR	3	17	6	7	4	Q8NQY7	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
GLY[361.1460]TSASFHSPGAI TGDH	3	17	7	4	6	Q8NTK9	Hypothetical membrane protein

VHY[361.1460]SEIEGNFR	2	17	12	5		Q8NTJ9	Probable cold shock protein A
YM[15.9949]LGELY[361.1460]E VAPSSVHAY	3	16	8	6	2	Q8NLN0	L-lactate dehydrogenase
FSY[361.1460]IGVGPGR	3	16	6	8	2	Q8NM16	Adenylosuccinate synthetase
ADPY[361.1460]YFLPTVGEMD IY	3	16	7	8	1	Q8NR40	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB
KFY[361.1460]VPSEGR	3	16	4	6	6	Q8NS15	Large ribosomal subunit protein bL28
ALISVY[361.1460]DK	3	16	6	6	4	Q8NS21	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH
SY[361.1460]GLMEQNVYT	3	16	8	4	4	Q8NT06	Large ribosomal subunit protein uL23
KLLPGY[361.1460]VLVR	3	16	6	5	5	H7C6D0	Transcription termination/antitermination protein NusG
ILSALSPNADENHDFGSGSS Y[361.1460]VIGK	3	16	8	3	5	Q79VD6	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta
GHTEVY[361.1460]R	3	16	7	4	5	Q79VF2	Nitrogen regulatory protein P-II
TKEFFGLAPYEAHEDAY[361. 1460]YADEPR	3	16	6	4	6	Q8NNN6	Cell division protein SepF
QADEDY[361.1460]TEEFDPK	3	16	7	4	5	Q8NQR5	Small ribosomal subunit protein bS1
LIHGY[361.1460]GK	3	16	8	4	4	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
DGIPATQFY[361.1460]VDDVQ EEYDSLKDK	3	16	6	6	4	Q8NU40	Lactoylglutathione lyase and related lyases
ALHEQFQLGGEDEAVVY[361. 1460]AGTGR	3	15	9	4	2	P26512	Aspartokinase
SAIANY[361.1460]TSSY	3	15	9	4	2	Q79VG7	ATP synthase subunit alpha
VPLDELQGY[361.1460]LAQR	3	15	7	3	5	Q8NNC6	Glycine--tRNA ligase
IEY[361.1460]LAR	3	15	7	4	4	Q8NQ98	Aconitate hydratase A
IEAGQGSDELY[361.1460]NDF EHGAQLFER	3	15	5	5	5	Q8NR39	Alpha-1,4-glucan:maltose-1-phosphate maltosyltransferase
RVGGATY[361.1460]QVPVDV RPER	3	15	6	4	5	Q8NT20	Small ribosomal subunit protein uS7
VPVAAEVLDTGAVTGY[361. 1460]TR	3	15	8	4	3	Q8NT25	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'

KPETINY[361.1460]R	3	15	8	3	4	Q8NT25	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'
VAVIGAGPAGIY[361.1460]ASDLLIR	3	15	5	5	5	Q8NLW8	ferredoxin--NADP(+) reductase
VILNGEHPGY[361.1460]	3	15	5	6	4	Q8NMJ0	Phosphoribosylformylglycinamide cyclase
LAAY[361.1460]AGHADVVQALLIER	3	15	7	5	3	Q8NN64	Ankyrin repeat proteins
Y[361.1460]FQSDVK	3	15	7	4	4	Q8NSR5	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
EKIEEALTY[361.1460]GVIK	3	14	8	4	2	P19537	Fructose-bisphosphate aldolase
RIPVQY[361.1460]AK	3	14	7	4	3	P38376	Protein translocase subunit SecY
HCLPAY[361.1460]R	3	14	8	5	1	Q59283	Ornithine carbamoyltransferase
QNY[361.1460]EDPNR	3	14	6	4	4	Q8NQE4	Sec-independent protein translocase protein TatA
ELNIAEGIEIGPSPQETEY[361.1460]IAAY	3	14	5	5	4	Q8NSV2	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
IVGGVHY[361.1460]LM[15.9949]K	3	14	4	6	4	Q8NTE1	Dihydrolipoyl dehydrogenase
TY[361.1460]HAAHK	3	14	6	5	3	Q8NMD8	rRNA methylases
AELTNLWDY[361.1460]TNTK	3	14	7	3	4	Q8NPA5	Inositol-1-monophosphatase
ITDALY[361.1460]DRDDALED R	3	14	10	2	2	Q8NQ62	Uncharacterized BCR, stimulates glucose-6-P dehydrogenase activity
STSSDY[361.1460]SHALIR	3	14	6	6	2	Q8NT79	Delta-aminolevulinic acid dehydratase
FQY[361.1460]AAPAK	2	14		2	12	Q8NLC0	2-keto-4-pentenoate hydratase/2-oxohepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (Catechol pathway)
HTPFFDNYRPQFY[361.1460]	3	13	7	3	3	P42439	Elongation factor Tu
EFQAPY[361.1460]DLVR	3	13	8	3	2	P82134	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS
Y[361.1460]SPCDIATY	3	13	7	4	2	Q8NN01	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2
ANPAMFNGVMAEY[361.1460]YGVPTPITQMSGITVPEPR	3	13	2	5	6	Q8NP03	Ribosome-recycling factor

STY[361.1460]HPK	3	13	8	3	2	Q8NST6	Large ribosomal subunit protein uL13
VKVY[361.1460]EAIVK	3	13	6	2	5	Q8NT26	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
GAPGKNDY[361.1460]ATEHV K	3	13	6	3	4	Q8NLB9	Gentisate 1,2-dioxygenase
LAPLVEKY[361.1460]PSVTVK	3	13	4	5	4	Q8NLJ9	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding proteins
VAPGVPVY[361.1460]EITGNG EGQTPIAK	3	13	4	5	4	Q8NNI9	Hypothetical membrane protein
EFFGLAPYEAHEDAY[361.14 60]YADEPR	3	13	7	4	2	Q8NNN6	Cell division protein SepF
AAALEY[361.1460]K	3	13	5	4	4	Q8NQ65	Transketolase
TSDAY[361.1460]QR	3	13	6	4	3	Q8NQM7	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding proteins
LAAFETTIVAY[361.1460]DPY ANPAR	3	13	6	6	1	Q8NQY7	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
GSVY[361.1460]DR	3	13	5	4	4	Q8NR01	Hypothetical membrane protein
VLFQY[361.1460]SA	3	13	3	6	4	Q8NRZ7	Glycosidases
VLVY[361.1460]PR	3	13	6	5	2	Q8NS03	Molybdopterin molybdenumtransferase
PLLVSYSY[361.1460]LEHYSSEQ AR	3	13	4	4	5	Q8NTF8	Sugar transferases involved in lipopolysaccharide synthesis
LAELGISLPSVAAPVAAY[361. 1460]VPAIQTGNQVW	3	13	8	1	4	Q8NTM4	Translation initiation inhibitor
SY[361.1460]GTPLESALK	3	12	4	2	6	O68602	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5- phosphoribosylamino)methylideneamino] imidazole-4-carboxamide isomerase
ATFGNVHGVY[361.1460]KPG NVK	3	12	5	4	3	P19537	Fructose-bisphosphate aldolase
LFY[361.1460]EGR	3	12	5	4	3	P42463	Acetolactate synthase large subunit
FTGLPGSY[361.1460]VPLTDT VDAFER	3	12	3	4	5	P42464	ATP synthase subunit beta
GIY[361.1460]PAVNPLTST	3	12	4	4	4	P42464	ATP synthase subunit beta
GVISY[361.1460]SAR	3	12	8	1	3	Q46078	Pyruvate kinase

GTM[15.9949]Y[361.1460]DPSSVF	3	12	4	4	4	Q6M6E7	Fructose-1,6-bisphosphatase class 2
LQEYSVVDY[361.1460]TTAT	3	12	4	4	4	Q6M6E7	Fructose-1,6-bisphosphatase class 2
GTMY[361.1460]DPSSVFY	3	12	4	4	4	Q6M6E7	Fructose-1,6-bisphosphatase class 2
NLPIY[361.1460]QSTAF	3	12	4	4	4	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase
AGSSHTIEPEIY[361.1460]R	3	12	6	5	1	Q8NP09	Uncharacterized membrane protein Cgl2017/cg2211
LIGY[361.1460]EIK	3	12	5	3	4	Q8NQ19	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase
LVGSY[361.1460]IDGR	3	12	4	4	4	Q8NQ22	Alanine--tRNA ligase
CAALLIDGTPVGY[361.1460]A GELHPQILEK	3	12	4	4	4	Q8NQ6	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit
Y[361.1460]LWSETNFVR	3	12	4	4	4	Q8NR39	Alpha-1,4-glucan:maltose-1-phosphate maltosyltransferase
AKQDY[361.1460]LDK	3	12	4	5	3	Q8NRC3	2-oxoglutarate dehydrogenase E1/E2 component
WY[361.1460]VIDATDVVLGR	3	12	6	1	5	Q8NST6	Large ribosomal subunit protein uL13
GVGGEVLAY[361.1460]VW	3	12	3	5	4	Q8NSX8	Small ribosomal subunit protein uS8
IY[361.1460]TVIR	3	12	4	4	4	Q8NSZ9	Large ribosomal subunit protein uL29
Y[361.1460]APQAASEPVAK	3	12	4	4	4	Q8NT02	Large ribosomal subunit protein uL22
YFNDTY[361.1460]EGLPTDGY AAWLEK	3	12	4	5	3	Q8NLQ1	UDP-galactopyranose mutase
Y[361.1460]YSPDEAR	3	12	5	4	3	Q8NLQ1	UDP-galactopyranose mutase
AFAGQGY[361.1460]DWLK	3	12	4	4	4	Q8NMS0	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) synthase
Y[361.1460]AGHADVVQALIER	3	12	8	2	2	Q8NN64	Ankyrin repeat proteins
ASDVEEY[361.1460]MR	3	12	6	3	3	Q8NQ80	Aromatic ring hydroxylating enzyme
IGSSTHTIDPSASFYPY[361.1460] AESK	3	12	6	5	1	Q8NQ95	Predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerases
SY[361.1460]ADDKSVLEELR	3	12	3	5	4	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
IRPQMAVQY[361.1460]LAIDP HSPAEFR	3	12	5	4	3	Q8NTZ7	Predicted metalloendopeptidase

DVTAGDY[361.1460]R	3	12	2	4	6	Q8NU40	Lactoylglutathione lyase and related lyases
LGQEVEY[361.1460]DDDSITV GGKR	2	12	6	6		Q01651	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GQVIVKPGAYTPHTEFEGSVY[361.1460]VLSK	3	11	5	3	3	P42439	Elongation factor Tu
LVTATIDPGLDENAY[361.1460]IVPGLGDAGDR	3	11	6	2	3	P58998	Uracil phosphoribosyltransferase
PKY[361.1460]DNSNADQWGF ETR	3	11	3	4	4	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase
YFVTPDAAY[361.1460]HGLK	3	11	4	2	5	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase
VESALDY[361.1460]K	3	11	8	2	1	Q8NM16	Adenylosuccinate synthetase
Y[361.1460]GLADIAR	3	11	6	3	2	Q8NNV6	Ribonuclease 3
EFPLFPPYTDEVY[361.1460]SA VER	3	11	3	3	5	Q8NP50	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase
KWY[361.1460]VIDATDVVLG R	3	11	4	3	4	Q8NST6	Large ribosomal subunit protein uL13
LTYYIY[361.1460]GIGPAR	3	11	4	2	5	Q8NSV6	Small ribosomal subunit protein uS13
GFLAGY[361.1460]PLVNVK	3	11	6	4	1	Q8NT19	Elongation factor G
DGKPLFHDESGY[361.1460]AG LSDIAR	3	11	5	3	3	Q79VE3	Glutamine synthetase
ANY[361.1460]TVPGINENDAK	3	11	7	1	3	Q8NLE3	Starvation-inducible DNA-binding protein
LVDPDY[361.1460]YI	3	11	2	4	5	Q8NML0	Serine acetyltransferase
EAHAAY[361.1460]LTSLGASDI IDR	3	11	4	3	4	Q8NMN4	NADPH:quinone reductase and related Zn- dependent oxidoreductases
DY[361.1460]QEQR	3	11	5	4	2	Q8NMW6	Hemoglobin-like proteins
AY[361.1460]AGHADVVQALIE R	3	11	4	4	3	Q8NN64	Ankyrin repeat proteins
WFY[361.1460]DLATGK	3	11	3	4	4	Q8NNH1	SPOR domain-containing protein
ALFSEAY[361.1460]EDPVSGIF	3	11	4	4	3	Q8NNQ9	Methionine synthase II (Cobalamin- independent)
NACDLFTGIFESSNGY[361.146 0]DGR	3	11	3	4	4	Q8NQ64	Transaldolase

TLSGVY[361.1460]KDEVGK	3	11	4	4	3	Q8NQA9	methylmalonyl-CoA mutase
DASDTYY[361.1460]VLGDFADYR	3	11	8	2	1	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
NDVLAANY[361.1460]PFATIEPNVGLVELPDAR	3	11	4	3	4	Q8NRL6	Ribosome-binding ATPase YchF
ANTEHNY[361.1460]DASSITILEGLEAVR	3	11	3	4	4	Q8NUD3	DNA gyrase subunit B
IY[361.1460]DLQNPTAK	2	11	8	3		Q8NSJ4	Tryptophan--tRNA ligase
SGSGSSY[361.1460]VIGK	2	11	7	4		Q79VD6	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta
DLPYVGTLEPHVY[361.1460]SD	2	11	9	2		Q8NM82	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
YVSTVLY[361.1460]EDIRD	2	11	9	2		Q8NML1	Cysteine synthase
SGGGLFTTGNDRDY[361.1460]R	3	10	4	1	5	Construcción P94337	
NWINY[361.1460]I	3	10	4	2	4	O69043	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH
APGESTY[361.1460]ANLPIADFGETTTR	3	10	5	3	2	P08499	Homoserine dehydrogenase
GLIDELDY[361.1460]GEDQEASR	3	10	3	3	4	P0C1E6	GTPase Obg
AY[361.1460]LNFPNK	3	10	5	4	1	Q8NLT9	dCTP deaminase, dUMP-forming
Y[361.1460]AQAIEAEGIK	3	10	4	4	2	Q8NMZ9	Trigger factor
FIEQSAY[361.1460]GTK	3	10	4	3	3	Q8NN02	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1
MLLIKPY[361.1460]EMSSMQV IENAIR	3	10	4	2	4	Q8NP03	Ribosome-recycling factor
GIVPGLATVLVGDDPASHSY[361.1460]VK	3	10	4	2	4	Q8NSM0	Bifunctional protein Fold
FVIEPLEPGFGY[361.1460]TLGN	3	10	4	1	5	Q8NSV2	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
VWLSEDY[361.1460]VR	3	10	4	4	2	Q79VE5	branched-chain-amino-acid transaminase
GSY[361.1460]GFVPDLPAAG	3	10	7	1	2	Q8NL73	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase

TEAVGIVDALGEGVEGLQVG QR							
Y[361.1460]GVAPDHPR	3	10	4	4	2	Q8NLW8/ Q8NM28	
SAQVAEY[361.1460]LEQR	3	10	5	2	3	Q8NM69	Rhodanese-related sulfurtransferases
M[15.9949]IGLAHPDYRPLLEE YY[361.1460]AR	3	10	4	4	2	Q8NMK4	Acetyl-CoA hydrolase
ATEY[361.1460]ENAAEFAAQ LVTAEQSVEDTK	3	10	3	4	3	Q8NP60	Phage shock protein A (IM30), suppresses sigma54-dependent transcription
Y[361.1460]ANALGQAELASNS VEGR	3	10	6	1	3	Q8NP60	Phage shock protein A (IM30), suppresses sigma54-dependent transcription
ENPY[361.1460]GN	3	10	4	4	2	Q8NQA5	Membrane protease subunits, stomatin/prohibitin homologs
GFNLY[361.1460]FHTLGR	3	10	5	4	1	Q8NQB5	Phospholipid-binding protein
TLAETTGLHPSY[361.1460]LE QLYTFGK	3	10	3	3	4	Q8NRH9	ADP-ribose pyrophosphatase
SGYQY[361.1460]ATEHAR	3	10	4	3	3	Q8NT47	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase
VDVPAIDFY[361.1460]GR	3	10	3	3	4	Q8NTI8	Zn-dependent alcohol dehydrogenases, class III
LSENIAEKY[361.1460]	3	10	4	4	2	Q8NU08	Acetyltransferases (The isoleucine patch superfamily)
AM[15.9949]Y[361.1460]AVGG GK	2	10	6		4	Q8NM64	Chaperonin GroEL 2
GDY[361.1460]ITRPIK	2	10	8	2		Q8NT25	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'
VLYPNDTTY[361.1460]EGK	2	10	6	4		Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
ASDTY[361.1460]YVLGDFADY R	2	10		1	9	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
IPVQY[361.1460]AK	3	9	3	4	2	P38376	Protein translocase subunit SecY
QLTIPPEAAY[361.1460]GPEGS GHPLSGR	3	9	4	3	2	P42458	Probable FK506-binding protein
SLEELNADIVFGIPGGAVLPVY DPLY[361.1460]SSTK	3	9	4	1	4	P42463	Acetolactate synthase large subunit
KEY[361.1460]GGVR	3	9	5	2	2	Q46072	PTS system mannose-specific EIIBCA component

IYNPHGQNYVPVDHDLMSY[361.1460]R	3	9	4	4	1	Q8NNF6	Pyruvate dehydrogenase E1 component
EGSY[361.1460]AVLR	3	9	4	4	1	Q8NT05	Large ribosomal subunit protein uL2
EKY[361.1460]GDDQFMEWR	3	9	5	2	2	Q8NTA5	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase
IIQCYSGY[361.1460]JENK	3	9	1	2	6	H7C6D0	Transcription termination/antitermination protein NusG
DLGY[361.1460]EVEER	3	9	6	2	1	Q79VE5	branched-chain-amino-acid transaminase
TSY[361.1460]SPIGR	3	9	6	2	1	Q8NLB9	Gentisate 1,2-dioxygenase
TMPQFLY[361.1460]AEGMVPP QELFDDLQAEALEK	3	9	4	1	4	Q8NLJ9	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding proteins
FERY[361.1460]GK	3	9	4	3	2	Q8NM73	DUF4178 domain-containing protein
TIQNELFDVGADLATPIEENPK Y[361.1460]PPLR	3	9	6	2	1	Q8NML4	Corrinoid adenosyltransferase
AAQGDY[361.1460]DAIAAAD VLVNR	3	9	1	4	4	Q8NP81	Fructose-1-phosphate kinase and related fructose-6-phosphate kinase (PfkB)
GIVPQEIIDAYKEY[361.1460]C EK	3	9	2	4	3	Q8NPR5	Lsr2 family protein
PY[361.1460]GEMEGQWR	3	9	4	1	4	Q8NRP7	Sortase and related acyltransferases
EAGADVY[361.1460]R	3	9	4	3	2	Q8NS03	Molybdopterin molybdenumtransferase
AVTGPy[361.1460]SK	3	9	3	2	4	Q8NS37	3'(2'),5-bisphosphonucleoside 3'(2')-phosphohydrolase
FNQQY[361.1460]TSAIEGALN TIQEALPGFEEVGSGR	3	9	3	3	3	Q8NSF7	Dehydrogenases with different specificities (Related to short-chain alcohol dehydrogenases)
SGY[361.1460]QYATEHAR	3	9	4	3	2	Q8NT47	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase
NHPY[361.1460]IICVATK	3	9	4	3	2	Q8NTE4	Glycosyltransferases involved in cell wall biogenesis
GYLSPY[361.1460]FINDNDTQ QAVLDNPAVLLVR	2	9		2	7	Q8NSS0	Chaperonin GroEL 1
RY[361.1460]YGGCEQVDIIED LAR	2	9	5		4	Q93PM7	Serine hydroxymethyltransferase
EFFGLAPYEAHEDAYY[361.1	2	9	6		3	Q8NNN6	Cell division protein SepF

460]ADEPR							
TKVEY[361.1460]SEIAHSFLGE TF	2	9	4	5		Q8NRH9	ADP-ribose pyrophosphatase
LAELGISLPSVAAPVAAY[361. 1460]VPAIQTGNQVWTSGQLP FVDGQLPATGK	2	9	3		6	Q8NTM4	Translation initiation inhibitor
AETEDISEWVDY[361.1460]LK	3	8	4	2	2	P42463	Acetolactate synthase large subunit
LVQLLIQSENAPQAVEY[361.1 460]QIISLW	3	8	3	2	3	Q79VG7	ATP synthase subunit alpha
Y[361.1460]QVEAK	3	8	5	2	1	Q8NLG1	Large ribosomal subunit protein bL9
KADYY[361.1460]IDVR	3	8	4	3	1	Q8NM11	Orotate phosphoribosyltransferase
QNSGIITLDPSTY[361.1460]GEP GEDAR	3	8	4	3	1	Q8NQ6	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit
QHALY[361.1460]GK	3	8	4	3	1	Q8NSZ7	Small ribosomal subunit protein uS17
GAIEIDDY[361.1460]M[15.9949]R	3	8	4	3	1	Q8NTE1	Dihydrolipoyl dehydrogenase
Y[361.1460]QPLNELDPEVAAA IAGELAR	3	8	2	4	2	Q93PM7	Serine hydroxymethyltransferase
AADSDLSVHDAY[361.1460]LK	3	8	6	1	1	Q79VD6	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta
SHLVHIY[361.1460]DK	3	8	4	3	1	Q8NLK7	Two-component system, response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a HTH DNA-binding domain
IHTYDAFGY[361.1460]R	3	8	4	2	2	Q8NLZ3	Predicted amidohydrolase
GVVGGQSLAPTDY[361.1460] AQQR	3	8	3	4	1	Q8NNK0	Hypothetical membrane protein
EVFEHTGNYSTY[361.1460]R	3	8	4	2	2	Q8NNR1	Malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase
IYQDNQY[361.1460]K	3	8	2	3	3	Q8NPI9	Periplasmic serine proteases (ClpP class)
ILNY[361.1460]VKPDFIHVF	3	8	4	2	2	Q8NQ77	ABC-type transporter, ATPase component
FY[361.1460]GAQPPAGHAPHR	3	8	3	1	4	Q8NQB5	Phospholipid-binding protein
IHGY[361.1460]GK	3	8	5	2	1	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
EEASPY[361.1460]VADAAK	3	8	4	2	2	Q8NS51	phosphoserine transaminase

GAPY[361.1460]SAGQVLENYP FIR	3	8	4	2	2	Q8NSC5	DUF4259 domain-containing protein
DNLY[361.1460]PSR	3	8	4	3	1	Q8NTE7	UDP-glucose 6-dehydrogenase
Y[361.1460]GPYIER	3	8	4	2	2	Q8NTJ8	DNA topoisomerase 1
Y[361.1460]GPYLK	3	8	4	2	2	Q8NTJ8	DNA topoisomerase 1
YSLAPVAEALSDELGQY[361.1 460]VAL	2	8	6		2	Q01655	Phosphoglycerate kinase
YMLGELY[361.1460]EVAPSSV H	2	8	6	2		Q8NLN0	L-lactate dehydrogenase
AHDGENY[361.1460]LSFESR	2	8	6	2		Q8NMJ4	Ferric nitrobindin-like protein
LAADY[361.1460]PLYEGLED WTIV	2	8	6		2	Q93PM7	Serine hydroxymethyltransferase
INGKPIGENFKEY[361.1460]SS SIALGR	2	8	6	2		Q8NMA4	diacetyl reductase [(S)-acetoin forming]
LFVY[361.1460]KPPVLAK	2	8	4	4		Q8NNG9	Exoribonucleases
LVNSGNDAY[361.1460]R	2	8	4	4		Q8NNV4	Cell division initiation protein
Y[361.1460]NNLVR	2	8	4	4		Q8NR58	Transcription termination factor Rho
DIYELGLETGHATY[361.1460] ETSGPTWDQFSQSK	2	8	3		5	Q8NRP7	Sortase and related acyltransferases
GASGAVGFIY[361.1460]R	2	8	4	4		Q8NSG8	Detergent sensitivity rescuer dtsR2
IVDGY[361.1460]GGHGIGR	2	8	6		2	Q8NSV9	Methionine aminopeptidase
FFDNYPQFY[361.1460]FR	3	7	4	2	1	P42439	Elongation factor Tu
GGVAY[361.1460]IMK	3	7	4	2	1	P42455	2-isopropylmalate synthase
VVIFGAGMGMPY[361.1460]FS TDTTAAQR	3	7	4	1	2	P59004	Uridylate kinase
LVY[361.1460]AFSER	3	7	4	1	2	Q8NR40	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB
LTM[15.9949]DDY[361.1460]Q GVTVSLTNPGGIGTR	3	7	4	2	1	Q8NRC3	2-oxoglutarate dehydrogenase E1/E2 component
ALY[361.1460]GALSDR	3	7	4	1	2	Q8NT08	Large ribosomal subunit protein uL4
LPGY[361.1460]VLVR	3	7	3	1	3	H7C6D0	Transcription termination/antitermination protein NusG

Y[361.1460]LM[15.9949]ASFDN K	3	7	1	3	3	Q8NLJ3	Phage shock protein A (IM30), suppresses sigma54-dependent transcription
Y[361.1460]EGTAAAY[361.1460] APEYR	3	7	3	2	2	Q8NNN6	Cell division protein SepF
VY[361.1460]PVLK	3	7	4	2	1	Q8NNS1	DNA polymerase III epsilon subunit and related 3'-5' exonucleases
FIMGEEAKDWITVY[361.1460] PFVR	3	7	1	2	4	Q8NPB5	Coproheme decarboxylase
GAVSY[361.1460]ETDR	3	7	4	2	1	Q8NQF8	RNA polymerase-binding protein RbpA
NAFEY[361.1460]JLR	3	7	3	1	3	Q8NRD3	Methyltransferase
AFDQVAEIVNGY[361.1460]DP DAIVLAR	3	7	2	4	1	Q8NTC5	Formyltetrahydrofolate deformylase
SDSSPY[361.1460]TGTEFLPAQ SADRPLVQGVPSQVDANR	3	7	3	1	3	Q8NU92	FHA domain-containing protein
IVLEKDPHYADY[361.1460]GLI QR	2	7	4	3		P31026	NADP-specific glutamate dehydrogenase
SETY[361.1460]VSEK	2	7	4	3		Q04513	L-threonine dehydratase biosynthetic IlvA
TY[361.1460]AHSNF	2	7	6	1		Q59283	Ornithine carbamoyltransferase
QKVESALDY[361.1460]K	2	7	4	3		Q8NM16	Adenylosuccinate synthetase
EGAAPAGDADPY[361.1460]K	2	7	4	3		Q8NP41	Ribosome-binding factor A
RVQLY[361.1460]DDEDIDR	2	7	4	3		Q8NR14	ATP-dependent 6-phosphofructokinase
Y[361.1460]VVDTLAEK	2	7	5	2		Q8NRM2	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase
Y[361.1460]LMASF	2	7	4	3		Q8NLJ3	Phage shock protein A (IM30), suppresses sigma54-dependent transcription
TPDEPDAPY[361.1460]SDGVV TGYGR	2	7	5	2		Q8NLR8	Acetyl-CoA carboxylase beta subunit
DLNHDVY[361.1460]TAK	2	7	6	1		Q8NNG7	Zn-ribbon protein, possibly nucleic acid- binding
YGM[15.9949]ADSY[361.1460] DEQGNIFPEGFDAETNEWLE GFDEQR	2	7		2	5	Q8NQR5	Small ribosomal subunit protein bS1
SYEPY[361.1460]ELYETVPGL	2	7		2	5	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase

K							
Y[361.1460]AKPESSEEGPEKPT EDS	2	7	4	3		Q8NT64	Secreted protein
DYPLIPVGY[361.1460]F	2	7	4	3		Q8NTQ1	Catalase
PTNY[361.1460]AR	2	7	5	2		Q8NTV8	Uncharacterized protein
DSPWY[361.1460]ATK	3	6	4	1	1	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase
VSQLPQGEGLNAAANGEY[361. 1460]VDLM[15.9949]AAGINDP VK	3	6	3	2	1	Q8NM64	Chaperonin GroEL 2
LDDSY[361.1460]K	3	6	4	1	1	Q8NNP0	Isoleucine--tRNA ligase
Y[361.1460]QTIEA	3	6	2	1	3	Q8NRV2	Large ribosomal subunit protein bL25
SAALAALGQFY[361.1460]AEG R	3	6	3	2	1	Q8NLU7	Hypothetical membrane protein
VDAPY[361.1460]QQPLK	3	6	3	1	2	Q8NM58	Uncharacterized protein
IHGLTIGADDY[361.1460]VTKP FSLEEVITR	3	6	1	2	3	Q8NMG8	Two-component system, response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a HTH DNA-binding domain
QQAEEAAAEAPAGNY[361.146 0]STDSAEDAPAAEAVEESAGS LASDEQLAALR	3	6	2	1	3	Q8NQR5	Small ribosomal subunit protein bS1
IFDNSY[361.1460]FTELLSGEK	2	6	4	2		APEX Construcci ón	
ENDPY[361.1460]LSR	2	6	4		2	Construcc ión P94337	
ESIFGGAREENDPY[361.1460]L SR	2	6		2	4	Construcc ión P94337	
HYAHVDAPGHADY[361.1460]I K	2	6	4		2	P42439	Elongation factor Tu
HTPFFDNYPQFY[361.1460]F R	2	6	3	3		P42439	Elongation factor Tu
VLADTY[361.1460]PELNEAF	2	6	5	1		P42439	Elongation factor Tu
DY[361.1460]EAVIR	2	6	5	1		P42455	2-isopropylmalate synthase

NQGEY[361.1460]MPDFVTLSE GLGCVAIR	2	6	2		4	P42463	Acetolactate synthase large subunit
GYDPAY[361.1460]GAR	2	6	4	2		P53532	Chaperone protein ClpB
STLETWPQVIINTY[361.1460]G TPPVELVSGK	2	6	4		2	Q59282	Acetylmethionine aminotransferase
LQEY[361.1460]SVVDYTTAT	2	6	3		3	Q6M6E7	Fructose-1,6-bisphosphatase class 2
AGGAEVY[361.1460]R	2	6	3		3	Q8NQW7	Phosphomethylpyrimidine synthase
MY[361.1460]ELITGR	2	6	4	2		Q8NRC3	2-oxoglutarate dehydrogenase E1/E2 component
VAY[361.1460]TQLVDEISTEPD YDAALAALN	2	6	3		3	Q8NRG3	Thiol peroxidase
GVHVVTVNDY[361.1460]LAK	2	6	5	1		Q8NSB6	Protein translocase subunit SecA 1
SY[361.1460]GLM[15.9949]EQN VY	2	6	4	2		Q8NT06	Large ribosomal subunit protein uL23
Y[361.1460]FGGEELSIAEIK	2	6	5	1		Q8NT19	Elongation factor G
VY[361.1460]EAIVK	2	6	4		2	Q8NT26	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
EASY[361.1460]TLGTR	2	6	4	2		Q8NL57	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
GIMVY[361.1460]R	2	6		3	3	Q8NLG6	Thioredoxin
LY[361.1460]HPGTPLPIFPHDP DLR	2	6	3	3		Q8NM01	Coenzyme F420-dependent N5,N10- methylene tetrahydromethanopterin reductase and related flavin-dependent oxidoreductases
ELAAIQDAEKDY[361.1460]DS R	2	6	2	4		Q8NMP2	Ferritin
EESIEY[361.1460]GPLGK	2	6	4	2		Q8NN39	Hypothetical membrane protein
MGPY[361.1460]DTEEEAHHA SIAAAR	2	6	4	2		Q8NNH1	SPOR domain-containing protein
YEGTAAY[361.1460]APEY[361. 1460]R	2	6	5		1	Q8NNN6	Cell division protein SepF
VSDLVISAGY[361.1460]AILGR	2	6	3	3		Q8NR37	ABC-type transporter, ATPase component
EQSLNALAQDLSFY[361.1460] GVPLLR	2	6	4	2		Q8NSN8	Deoxyribodipyrimidine photolyase

AVNEYLDSSFY[361.1460]EAG	2	6	4		2	Q8NT97	Helix-turn-helix domain-containing protein
AY[361.1460]VETTR	2	6	4	2		Q8NTJ8	DNA topoisomerase 1
PSFTMGGLGSGLAY[361.1460]NTEDLER	3	5	2	1	2	P58939	Carbamoyl phosphate synthase large chain
ANPAMFNGVMAEYY[361.1460]GVPTPITQM	3	5	3	1	1	Q8NP03	Ribosome-recycling factor
EISY[361.1460]GLVER	3	5	1	2	2	Q8NLM3	L-lactate dehydrogenase (FMN-dependent) and related alpha-hydroxy acid dehydrogenases
TLY[361.1460]DETLTLLQELIR	3	5	3	1	1	Q8NLV7	Acetylornithine deacetylase/Succinyl-diaminopimelate desuccinylase and related deacylases
IGQTLADY[361.1460]DANIDTIR	3	5	3	1	1	Q8NMP4	phosphoserine phosphatase
FLHDY[361.1460]ELGK	3	5	2	1	2	Q8NTZ7	Predicted metalloendopeptidase
TGNDRDY[361.1460]R	2	5	4	1		Construcción P94337	
DVGRDY[361.1460]EAVIR	2	5	4	1		P42455	2-isopropylmalate synthase
LEEIALADDY[361.1460]FISR	2	5	4	1		P42457	Citrate synthase
SKDTTTYQGVTEIGSVPAY[361.1460]LVLADGR	2	5	2		3	P58893	Carbamoyl phosphate synthase small chain
AY[361.1460]NTSGK	2	5	4	1		Q59279	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
GYISGY[361.1460]FATDM[15.9949]ER	2	5	3	2		Q8NM64	Chaperonin GroEL 2
DQY[361.1460]LDNMDIER	2	5	4	1		Q8NN68	Elongation factor 4
NGVMAEY[361.1460]YGVPTPI TQMSGITVPEPR	2	5	3	2		Q8NP03	Ribosome-recycling factor
IVHQVNIEY[361.1460]LAR	2	5	3		2	Q8NQ98	Aconitate hydratase A
AEY[361.1460]PDVHVIVHPESPM[15.9949]PVVDAADSSGSTDFIVK	2	5	3	2		Q8NRI0	Quinolinate synthase
ADLATIPTY[361.1460]VPGR	2	5	2	3		Q8NTT4	Aromatic amino acid aminotransferase

IIQCY[361.1460]SGYENK	2	5	4	1		H7C6D0	Transcription termination/antitermination protein NusG
SALSPNADENHDFSGSGSSSY[361.1460]VIGK	2	5	3	2		Q79VD6	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta
IY[361.1460]SDDPDSLADAPDP ALEHEK	2	5	4	1		Q8NLF2	Hypothetical membrane protein
NVADVEY[361.1460]LLQALA DIGDPVAVER	2	5	4		1	Q8NLN1	pyruvate kinase
VY[361.1460]GIPAVVQR	2	5	4	1		Q8NLN1	pyruvate kinase
MKDVLVY[361.1460]EIR	2	5	3	2		Q8NLU2	Alanine aminotransferase
AHKEIY[361.1460]NTLLQVLE DGR	2	5	4		1	Q8NMA0	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit
PIGENFKEY[361.1460]SSSIAL GR	2	5	3	2		Q8NMA4	diacetyl reductase [(S)-acetoin forming]
YDEMVAEAEKY[361.1460]R	2	5	4	1		Q8NMW0	Energy-dependent translational throttle protein EttA
LKY[361.1460]EGFR	2	5	4	1		Q8NNG5	Predicted phosphatases
GLAPYEAHEHEDAYY[361.1460] ADEPR	2	5	4	1		Q8NNN6	Cell division protein SepF
GLAPYEAHEHEDAY[361.1460]Y ADEPR	2	5	2	3		Q8NNN6	Cell division protein SepF
Y[361.1460]EGTAAAY	2	5	4	1		Q8NNN6	Cell division protein SepF
FGEIGGPPSAY[361.1460]QVE MR	2	5	3	2		Q8NPB4	DUF3000 domain-containing protein
GVHVDIPLQAY[361.1460]FR	2	5	3	2		Q8NQ75	Predicted membrane components of an uncharacterized iron-regulated ABC-type transporter SufB
MGAVSY[361.1460]ETDRDHD LAPR	2	5	4	1		Q8NQF8	RNA polymerase-binding protein RbpA
QGHVDVLGTDLPILIDY[361.1460]AK	2	5	3		2	Q8NQI0	SAM-dependent methyltransferases
NSNQNFQPDNLNLDLDDSAIP TY[361.1460]K	2	5	4	1		Q8NR01	Hypothetical membrane protein
SY[361.1460]LIGQGR	2	5	4		1	Q8NR21	Exonuclease domain-containing protein

FKPLPEY[361.1460]VDTFR	2	5	3	2		Q8NRX6	Uncharacterized ACR
AVLEAYSPLYGIY[361.1460]QK	2	5	3		2	Q8NSD2	Metallopeptidase family protein
GAVGFIY[361.1460]R	2	5	3	2		Q8NSG7 Q8NSG8	#N/A
ESHPHHIQQTVEAPNY[361.1460]H	2	5	4	1		Q8NSR5	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
SGSY[361.1460]LDAGK	2	5	3		2	Q8NTD0	Antitoxin
ANPAMFNGVMAEY[361.1460]YGVPTPITQM	3	4	1	1	2	Q8NP03	Ribosome-recycling factor
FY[361.1460]PGAK	3	4	2	1	1	Q8NMW0	Energy-dependent translational throttle protein EttA
LGIHVY[361.1460]TPPEISSELLGLASAESR	3	4	2	1	1	Q8NS46	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) synthase
VAGASSPWGDDKEFPVSAEETGYVHPY[361.1460]TR	3	4	2	1	1	Q8NS61	Uncharacterized protein
PLLVSYLEHY[361.1460]SSEQAR	3	4	1	1	2	Q8NTF8	Sugar transferases involved in lipopolysaccharide synthesis
TVDEQVSNY[361.1460]YDMLLK	2	4	3	1		P31026	NADP-specific glutamate dehydrogenase
DTTTYQGVTEIGSVPAY[361.1460]LVLADGR	2	4	2		2	P58893	Carbamoyl phosphate synthase small chain
CLPAY[361.1460]R	2	4	3	1		Q59283	Ornithine carbamoyltransferase
QMNQLGY[361.1460]AEVETR	2	4	2	2		Q79VE9	Cytochrome bc1 complex cytochrome b subunit
LAY[361.1460]PIDK	2	4	3	1		Q8NLF9	Small ribosomal subunit protein bS6
FDKGYISGY[361.1460]FATDMER	2	4	1		3	Q8NM64	Chaperonin GroEL 2
Y[361.1460]VLPSFIEQSAY	2	4	3	1		Q8NN02	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1
GIVDQVFDY[361.1460]R	2	4	2	2		Q8NN02	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1
GY[361.1460]NVDQPR	2	4	2		2	Q8NND3	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]

SGEPLIY[361.1460]M	2	4	1		3	Q8NNP0	Isoleucine--tRNA ligase
MLLIKPY[361.1460]EM	2	4	2		2	Q8NP03	Ribosome-recycling factor
FRPY[361.1460]TNTDVVGTEI GGACK	2	4	2	2		Q8NQV3	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]
DGY[361.1460]QPGVLEAFHAS VEQMR	2	4	3	1		Q8NR17	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A
Y[361.1460]GLIACASSLDQGG PTAR	2	4	2	2		Q8NR17	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A
SLVY[361.1460]AFSER	2	4	3	1		Q8NR40	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB
NSAIGY[361.1460]EAAAK	2	4	3		1	Q8NRN8	Fumarate hydratase class II
KQHALY[361.1460]GK	2	4	2	2		Q8NSZ7	Small ribosomal subunit protein uS17
VTVTGEGFTDEEIIIEAVANAG Y[361.1460]K	2	4	2	2		Q8NLG5	Copper chaperone
YY[361.1460]SPDEAR	2	4	2	2		Q8NLQ1	UDP-galactopyranose mutase
GAY[361.1460]SLLAQLTMVAE DVSAQTGIPR	2	4	3		1	Q8NNR1	Malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase
EVFEHTGNY[361.1460]STYR	2	4		1	3	Q8NNR1	Malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase
DTVRPVFDDVFGEDSIDAY[36 1.1460]R	2	4	2	2		Q8NNU8	Metal-dependent amidase/aminoacylase/carboxypeptidase
IY[361.1460]QDNQYK	2	4	3	1		Q8NPI9	Periplasmic serine proteases (ClpP class)
RQQAEEAAAEAPAGNY[361.1 460]STDSAEDAPAAEAVEESA GSLASDEQLAALR	2	4		2	2	Q8NQR5	Small ribosomal subunit protein bS1
VLVY[361.1460]PRPR	2	4	3	1		Q8NS03	Molybdopterin molybdenumtransferase
LVDVPGFLPGAGQEY[361.146 0]GGILR	2	4	3	1		Q8NSG7	Detergent sensitivity rescuer dtsR1
IAMY[361.1460]HALGEG	2	4	2		2	Q8NSI4	Dihydrolipoamide dehydrogenase/glutathione oxidoreductase and related enzymes
AVTLEGDKTAVY[361.1460]LH QR	3	3	1	1	1	Q8NP02	Elongation factor Ts
LLPGY[361.1460]VLVR	3	3	1	1	1	H7C6D0	Transcription termination/antitermination protein NusG
AYISNGTLLEHNY[361.1460]D	3	3	1	1	1	Q8NLN1	pyruvate kinase

R							
Y[361.1460]LLAPVLGR	3	3	1	1	1	Q8NNT1	Transcriptional regulator

Tabla Suplementaria 4A: Péptidos marcados con FB sobrerrepresentados en la cepa C.glu_apex2-ftsZ

Péptidos	Tasa de cambio	Valor p	ID	Descripción
EENDPY[361.1460]LSR	13.68	4.94E-05	Construcción P94337	
DFQY[361.1460]AAPAK	6.66	6.30E-03	Q8NLC0	2-keto-4-pentenoate hydratase/2-oxohepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (Catechol pathway?)
LAAFETTIVAYDPY[361.1460]ANPAR	5.38	2.08E-02	Q8NQY7	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
IY[361.1460]GIGPAR	3.73	4.63E-03	Q8NSV6	Small ribosomal subunit protein uS13
AALGGY[361.1460]LPER	3.63	3.49E-03	Q8NNF6	Pyruvate dehydrogenase E1 component
LLY[361.1460]PEPK	2.78	1.84E-04	Q8NR47	Lactoylglutathione lyase and related lyases
DTSY[361.1460]VVPEYPSANYPVVER	2.61	8.52E-03	P71121	Thiosulfate sulfurtransferase
AFAHY[361.1460]R	2.61	2.81E-02	Q8NT20	Small ribosomal subunit protein uS7
AGANLY[361.1460]TSPEDFEK	2.61	1.21E-02	P19537	Fructose-bisphosphate aldolase
Y[361.1460]AAGMQPAEIAEVFK	2.47	3.14E-02	Q8NQI2	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating
HSLIHGY[361.1460]GK	2.27	7.88E-05	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
DWITVY[361.1460]PFVR	2.23	2.54E-03	Q8NPB5	Coproheme decarboxylase
HVNY[361.1460]PIGVTAER	2.21	6.12E-03	Q8NMW6	Hemoglobin-like proteins
VVADDY[361.1460]VDPEFGSGAVK	2.20	2.83E-03	Q8NN37	Valine--tRNA ligase
Y[361.1460]KPSFHDVQR	2.20	3.40E-02	Q8NS41	Uncharacterized protein
GIYLY[361.1460]SR	2.03	1.51E-02	Q8NNF6	Pyruvate dehydrogenase E1 component
ALNAY[361.1460]NPAER	1.92	3.62E-02	Q8NST5	Small ribosomal subunit protein uS9
AQTSVY[361.1460]DIAK	1.84	1.66E-02	Q01655	Phosphoglycerate kinase
VPATALY[361.1460]VAEGAANDER	1.80	3.69E-02	Q8NMD8	rRNA methylases
Y[361.1460]NAQLAER	1.75	2.51E-02	Q79VG9	ATP synthase subunit b

ALDALDNGTLND-NNSGLFY[361.1460]DLK	1.48	5.11E-03	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
Y[361.1460]YGGCEQVDIIEDLAR	1.38	2.10E-03	Q93PM7	Serine hydroxymethyltransferase

Tabla Suplementaria 4B: Péptidos marcados con FB sobrerrepresentados en la cepa C.glu_apex2

Péptidos	Tasa de cambio	Valor p	ID Uniprot	Descripción
DGKPVFPY[361.1460]FVTPDAAYHGLK	-1.37	1.91E-03	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase
VLADTY[361.1460]PELNEAFAFDSIDKAPEEK	-1.55	2.85E-03	P42439	Elongation factor Tu
Y[361.1460]AESER	-1.68	5.43E-03	Q8NQR5	Small ribosomal subunit protein bS1
GTMY[361.1460]DPSSVF	-1.70	2.63E-02	Q6M6E7	Fructose-1,6-bisphosphatase class 2
MIGLAHPDYRPLLEYY[361.1460]AR	-1.76	8.31E-03	Q8NMK4	Acetyl-CoA hydrolase
GVYSSLAEAIMAY[361.1460]DR	-1.79	3.63E-02	Q8NT25	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'
GFY[361.1460]GAQPPAGHAPHR	-1.91	1.06E-04	Q8NQB5	Phospholipid-binding protein
YSLAPVAEALSDELQY[361.1460]VA-LAADVVGEDAHER	-2.03	4.89E-03	Q01655	Phosphoglycerate kinase
EIELEDPY[361.1460]EK	-2.06	1.13E-02	Q8NM64	Chaperonin GroEL 2
MFLSQY[361.1460]WGGPK	-2.07	1.26E-02	Q8NMW6	Hemoglobin-like proteins
AYAVY[361.1460]KELFDAELPEGANTQRPLWAST-GVK	-2.09	3.43E-02	Q8NQ64	Transaldolase
Y[361.1460]AESERR	-2.16	3.22E-02	Q8NQR5	Small ribosomal subunit protein bS1
IELSSQSANINLPY[361.1460]ITVDAD-KNPLFLDETLR	-2.17	6.56E-03	Q8NLY6	Chaperone protein DnaK
Y[361.1460]QNWPEASAVDLSDVALES-DALDAAVDLK	-2.21	1.41E-03	Per-Protein-Pas-mido	
Y[361.1460]GGTEIK	-2.38	1.34E-02	Q8NSS1	Co-chaperonin GroES
INLPY[361.1460]ITVDADKNPLFLDETLR	-2.40	3.17E-03	Q8NLY6	Chaperone protein DnaK
DDENSY[361.1460]FK	-2.46	1.26E-02	Q8NMD4	Glucosamine-6-phosphate deaminase
VY[361.1460]TVGEALLSEPTTLISIR	-2.94	1.30E-03	Q8NL53	Ribosomal RNA small subunit methyl-transferase G

IAVY[361.1460]AERDPK	-3.63	1.43E-03	Q01651	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
FGQEPFAFAFAGQGY[361.1460]DWLK	-5.44	4.23E-03	Q8NMS0	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) synthase
FVIEPLEPGFGY[361.1460]TLGNSLR	-5.67	7.65E-04	Q8NSV2	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
DAEAYLGEDVTDAVITVPAY[361.1460]FEDSQR	-6.24	2.30E-02	Q8NLY6	Chaperone protein DnaK
IAVY[361.1460]AER	-7.06	2.97E-05	Q01651	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
LGQVEY[361.1460]DDDSITVGGK	-9.75	3.92E-02	Q01651	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Tabla Suplementaria 5: Proteínas marcadas con FB detectadas exclusivamente en la cepa C.glu_apex2-ftsZ

ID Uniprot	Número de réplicas	Número total de espectros	Número de espectros R1	Número de espectros R2	Número de espectros R3	Descripción
Q8NNN6	3	447	198	131	118	Cell division protein SepF GN=sepF
APEX	3	161	67	47	47	
Q8NTE7	3	97	45	31	21	UDP-glucose 6-dehydrogenase GN=Cgl0360
Q8NQ65	3	95	44	28	23	Transketolase GN=Cgl1574
Q8NMV1	3	89	34	28	27	ABC-type transporter, ATPase component GN=Cgl2463
Q8NTC5	3	88	39	32	17	Formyltetrahydrofolate deformylase GN=purU
Q8NSS0	3	83	32	26	25	Chaperonin GroEL 1 GN=groEL1
Q8NN64	3	79	41	22	16	Ankyrin repeat proteins GN=Cgl2345
Q8NLB9	3	78	41	17	20	Gentisate 1,2-dioxygenase GN=Cgl3023
Q8NU40	3	73	35	26	12	Lactoylglutathione lyase and related lyases GN=Cgl0107
Q8NLJ9	3	68	28	21	19	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding proteins GN=Cgl2943
Q8NRD3	3	62	25	17	20	Methyltransferase GN=Cgl1119
Q8NN02	3	62	28	21	13	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1 GN=clpP1

Q8NLJ3	3	59	22	19	18	Phage shock protein A (IM30), suppresses sigma54-dependent transcription GN=Cgl2949
Q8NL68	3	59	24	24	11	HMA domain-containing protein GN=Cgl3081
Q79VD6	3	58	32	14	12	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta GN=Cgl2525
Q8NS46	3	56	30	14	12	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) synthase GN=Cgl0836
Q8NQ77	3	56	26	15	15	ABC-type transporter, ATPase component GN=Cgl1562
P08499	3	53	23	18	12	Homoserine dehydrogenase GN=hom
Q8NR14	3	52	23	20	9	ATP-dependent 6-phosphofructokinase GN=pfkA
Q8NR01	3	51	22	16	13	Hypothetical membrane protein GN=Cgl1266
Q8NRH9	3	50	20	18	12	ADP-ribose pyrophosphatase GN=Cgl1070
Q8NMG8	3	48	19	14	15	Two-component system, response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a HTH DNA-binding domain GN=Cgl2607
Q8NMA4	3	48	24	14	10	diacetyl reductase [(S)-acetoin forming] GN=Cgl2674
Q8NP03	3	46	16	12	18	Ribosome-recycling factor GN=frr
P19583	3	45	21	13	11	Triosephosphate isomerase GN=tpiA
Q8NM16	3	45	28	13	4	Adenylosuccinate synthetase GN=purA
Q79VE6	3	45	17	17	11	Uncharacterized ACR GN=Cgl2197
Q8NNN8	3	43	14	11	18	Cell wall synthesis protein Wag31 GN=Cgl2150
P12880	3	43	22	9	12	Phosphoenolpyruvate carboxylase GN=ppc
Q8NQW7	3	42	23	11	8	Phosphomethylpyrimidine synthase GN=thiC
Q8NMW0	3	41	18	12	11	Energy-dependent translational throttle protein EttA GN=ettA
Q8NSG4	3	41	30	7	4	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthase GN=purK
H7C6D0	3	40	15	10	15	Transcription termination/antitermination protein NusG GN=nusG
P58893	3	40	12	8	20	Carbamoyl phosphate synthase small chain GN=carA
Q8NN01	3	40	19	12	9	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2 GN=clpP2
Q8NS15	3	39	16	15	8	Large ribosomal subunit protein bL28 GN=rpmB
Q8NUA5	3	38	18	13	7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase GN=Cgl0034
Q8NST6	3	38	20	7	11	Large ribosomal subunit protein uL13 GN=rplM

Q8NT01	3	37	16	10	11	Small ribosomal subunit protein uS3 GN=rpsC
Q8NL54	3	37	16	11	10	ATPases involved in chromosome partitioning GN=Cgl3095
P42463	3	35	15	7	13	Acetolactate synthase large subunit GN=ilvB
Q8NR39	3	33	15	9	9	Alpha-1,4-glucan:maltose-1-phosphate maltosyltransferase GN=glgE
Q8NLG6	3	31	14	10	7	Thiol-disulfide isomerase and thioredoxins GN=Cgl2976
Q8NTJ8	3	30	19	7	4	DNA topoisomerase 1 GN=topA
Q8NLC1	3	30	13	10	7	Uncharacterized protein GN=Cgl3021
Q8NLQ1	3	29	12	11	6	UDP-galactopyranose mutase GN=Cgl2888
Q8NMY8	3	29	16	6	7	DSBA-like thioredoxin domain-containing protein GN=Cgl2425
P59004	3	28	15	8	5	Uridylate kinase GN=pyrH
Q8NPA9	3	27	14	7	6	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase GN=dut
Q8NNJ5	3	26	14	4	8	Short-chain dehydrogenases of various substrate specificities GN=Cgl2203
Q8NS03	3	26	13	9	4	Molybdopterin molybdenumtransferase GN=Cgl0883
Q8NMP2	3	25	13	10	2	Ferritin GN=Cgl2526
Q8NLW8	3	25	9	9	7	ferredoxin--NADP(+) reductase GN=Cgl2818
Q9KJU4	3	25	12	6	7	Histidinol-phosphate aminotransferase GN=hisC
Q8NRC0	3	24	13	7	4	Shikimate 5-dehydrogenase GN=Cgl1132
P38376	3	24	11	8	5	Protein translocase subunit SecY GN=secY
Q8NTX7	3	24	14	8	2	Cold shock proteins GN=Cgl0174
Q8NQ08	3	24	9	9	6	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase GN=Cgl1646
Q8NMF7	3	23	11	8	4	Predicted hydrolases of the HAD superfamily GN=Cgl2619
Q8NTQ7	3	22	10	6	6	Lipid II isoglutaminy synthase (glutamine-hydrolyzing) subunit GatD GN=gatD
Q8NQC5	3	22	9	5	8	Uncharacterized protein GN=Cgl1513
Q8NTM4	3	22	11	1	10	Translation initiation inhibitor GN=Cgl0282
Q8NQH1	3	22	13	5	4	Thiamine biosynthesis multifunctional protein ThiED GN=theD
Q8NTI4	3	22	12	6	4	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases GN=Cgl0323

Q8NNH1	3	22	12	6	4	SPOR domain-containing protein GN=Cgl2232
Q8NSR5	3	21	11	6	4	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase GN=guaB
Q8NP60	3	21	10	5	6	Phage shock protein A (IM30), suppresses sigma54-dependent transcription GN=Cgl1961
Q8NTZ7	3	21	11	5	5	Predicted metalloendopeptidase GN=Cgl0155
Q8NQN6	3	21	9	7	5	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit GN=pheT
Q8NN95	3	21	8	5	8	cysteine-S-conjugate beta-lyase GN=Cgl2309
Q8NMX8	3	21	7	8	6	Carboxymuconolactone decarboxylase-like domain-containing protein GN=Cgl2435
Q79VE5	3	21	12	6	3	branched-chain-amino-acid transaminase GN=Cgl2204
Q8NT47	3	19	8	6	5	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase GN=menB
P42455	3	19	14	4	1	2-isopropylmalate synthase GN=leuA
Q8NPK6	3	19	10	4	5	DUF2188 domain-containing protein GN=Cgl1806
Q8NS21	3	19	9	6	4	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH GN=purH
Q8NRP7	3	18	8	1	9	Sortase and related acyltransferases GN=Cgl1001
Q8NM99	3	18	7	8	3	GMP reductase GN=guaB1
Q8NNR1	3	18	9	3	6	Malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase GN=Cgl2125
Q8NP31	3	18	7	8	3	Proline--tRNA ligase GN=proS
Q8NTK9	3	18	8	4	6	Hypothetical membrane protein GN=Cgl0298
Q8NTJ9	2	18	13	5		Cold shock proteins GN=Cgl0308
Q8NM28	3	17	11	4	2	ferredoxin--NADP(+) reductase GN=Cgl2754
Q8NSF7	3	17	10	3	4	Dehydrogenases with different specificities (Related to short-chain alcohol dehydrogenases) GN=Cgl0719
Q8NTF8	3	17	5	5	7	Sugar transferases involved in lipopolysaccharide synthesis GN=Cgl0349
P26512	3	16	10	4	2	Aspartokinase GN=lysC
Q8NMJ0	3	16	6	6	4	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase GN=purM
Q8NQ62	3	15	11	2	2	Uncharacterized BCR, stimulates glucose-6-P dehydrogenase activity GN=Cgl1577

Q8NT79	3	15	7	6	2	Delta-aminolevulinic acid dehydratase GN=Cgl0431
Q8NQM7	3	15	8	4	3	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding proteins GN=Cgl1407
Q8NP50	3	15	6	3	6	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase GN=pnp
Q8NLN1	3	15	11	2	2	pyruvate kinase GN=Cgl2910
Q8NQA9	3	14	6	5	3	methylmalonyl-CoA mutase GN=Cgl1529
Q8NMZ9	3	14	4	4	6	Trigger factor GN=tig
Q8NPA5	3	14	7	3	4	Inositol-1-monophosphatase GN=Cgl1909
Q8NQE4	3	14	6	4	4	Sec-independent protein translocase protein TatA GN=tatA
Q8NM82	2	14	9	5		Hypoxanthine phosphoribosyltransferase GN=Cgl2697
Q8NNI9	3	13	4	5	4	Hypothetical membrane protein GN=Cgl2210
Q8NP09	3	13	6	5	2	Uncharacterized membrane protein Cgl2017/cg2211 GN=Cgl2017
Q8NRZ7	3	13	3	6	4	Glycosidases GN=Cgl0889
Q8NQ75	2	13	11	2		Predicted membrane components of an uncharacterized iron-regulated ABC-type transporter SufB GN=Cgl1564
Q8NSX8	3	12	3	5	4	Small ribosomal subunit protein uS8 GN=rpsH
O68602	3	12	4	2	6	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase GN=hisA
Q8NM11	3	12	7	4	1	Orotate phosphoribosyltransferase GN=pyrE
Q8NQ19	3	12	5	3	4	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase GN=aspS
Q8NT02	3	12	4	4	4	Large ribosomal subunit protein uL22 GN=rplV
Q8NPI9	3	12	5	4	3	Periplasmic serine proteases (ClpP class) GN=Cgl1823
Q8NQ95	3	12	6	5	1	Predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerases GN=Cgl1543
Q8NQ80	3	12	6	3	3	Aromatic ring hydroxylating enzyme GN=Cgl1559
Q8NQ22	3	12	4	4	4	Alanine--tRNA ligase GN=alaS
Q8NLM3	3	12	8	2	2	L-lactate dehydrogenase (FMN-dependent) and related alpha-hydroxy acid dehydrogenases GN=Cgl2918
Q8NSZ9	3	12	4	4	4	Large ribosomal subunit protein uL29 GN=rpmC
Q8NM69	3	11	6	2	3	Rhodanese-related sulfurtransferases GN=Cgl2710

Q8NRL6	3	11	4	3	4	Ribosome-binding ATPase YchF GN=yhfF
Q8NMN4	3	11	4	3	4	NADPH:quinone reductase and related Zn-dependent oxidoreductases GN=Cgl2537
Q8NN68	3	11	8	2	1	Elongation factor 4 GN=lepA
Q8NML0	3	11	2	4	5	Serine acetyltransferase GN=Cgl2563
Q8NNQ9	3	11	4	4	3	Methionine synthase II (Cobalamin-independent) GN=Cgl2129
Q8NUD3	3	11	3	4	4	DNA gyrase subunit B GN=gyrB
P58998	3	11	6	2	3	Uracil phosphoribosyltransferase GN=upp
Q8NNV6	3	11	6	3	2	Ribonuclease 3 GN=rnc
Q8NLE3	3	11	7	1	3	Starvation-inducible DNA-binding protein GN=Cgl2999
Q8NT05	3	11	6	4	1	Large ribosomal subunit protein uL2 GN=rplB
Q8NSG7	2	11	7	4		Detergent sensitivity rescuer dtsR1 GN=Cgl0708
Q8NSJ4	2	11	8	3		Tryptophan--tRNA ligase GN=trpS
Q8NML1	2	11	9	2		Cysteine synthase GN=Cgl2562
Q8NL57	2	11	9	2		N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase GN=Cgl3092
Q8NSM0	3	10	4	2	4	Bifunctional protein Fold GN=fold
Q8NL73	3	10	7	1	2	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase, mitochondrial GN=Cgl3076
Q8NU08	3	10	4	4	2	Acetyltransferases (The isoleucine patch superfamily) GN=Cgl0143
Q8NNP0	3	10	5	1	4	Isoleucine--tRNA ligase GN=ileS
Q8NQA5	3	10	4	4	2	Membrane protease subunits, stomatin/prohibitin homologs GN=Cgl1533
P0C1E6	3	10	3	3	4	GTPase Obg GN=obg
Q8NLT9	3	10	5	4	1	dCTP deaminase, dUMP-forming GN=dcd
Q46072	3	10	6	2	2	PTS system mannose-specific EIIBCA component GN=ptsM
Q8NTI8	3	10	3	3	4	Zn-dependent alcohol dehydrogenases, class III GN=Cgl0319
O69043	3	10	4	2	4	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH GN=hisH
Q8NP81	3	9	1	4	4	Fructose-1-phosphate kinase and related fructose-6-phosphate kinase (PfkB) GN=Cgl1935

Q8NTE4	3	9	4	3	2	Glycosyltransferases involved in cell wall biogenesis GN=Cgl0363
Q8NNK0	3	9	4	4	1	Hypothetical membrane protein GN=Cgl2198
Q8NS37	3	9	3	2	4	3'(2'),5-bisphosphonucleoside 3'(2')-phosphohydrolase GN=Cgl0845
Q8NNV4	3	9	4	4	1	Cell division initiation protein GN=Cgl2076
Q8NML4	3	9	6	2	1	Corrinoid adenosyltransferase GN=Cgl2559
Q8NM73	3	9	4	3	2	DUF4178 domain-containing protein GN=Cgl2706
P42458	3	9	4	3	2	Probable FK506-binding protein GN=Cgl0830
Q8NR58	2	9	5	4		Transcription termination factor Rho GN=rho
Q8NQI0	2	9	7		2	SAM-dependent methyltransferases GN=Cgl1454
Q8NSB6	2	9	8	1		Protein translocase subunit SecA 1 GN=secA1
Q8NLU2	2	9	6	3		alanine transaminase GN=Cgl2844
Q8NSN8	2	9	7	2		Deoxyribodipyrimidine photolyase GN=Cgl0630
Q8NTQ1	2	9	6	3		Catalase GN=Cgl0255
Q8NM57	3	8	5	2	1	Tubulin-like protein GN=Cgl2723
Q8NLZ3	3	8	4	2	2	Predicted amidohydrolase GN=Cgl2793
Q8NLK7	3	8	4	3	1	Two-component system, response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a HTH DNA-binding domain GN=Cgl2935
Q8NSC5	3	8	4	2	2	DUF4259 domain-containing protein GN=Cgl0751
Q8NLG1	3	8	5	2	1	Large ribosomal subunit protein bL9 GN=rplI
Q8NS51	3	8	4	2	2	phosphoserine transaminase GN=Cgl0828
Q8NS61	3	8	4	1	3	Uncharacterized protein GN=Cgl0818
Q8NMJ4	2	8	6	2		Ferric nitrobindin-like protein GN=Cgl2579
Q8NSV9	2	8	6		2	Methionine aminopeptidase GN=map
Q8NR17	2	8	5	3		Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A GN=gatA
Q8NNG9	2	8	4	4		Exoribonucleases GN=Cgl2234
Q8NNS1	3	7	4	2	1	DNA polymerase III epsilon subunit and related 3'-5' exonucleases GN=Cgl2116
Q8NLU7	3	7	4	2	1	Hypothetical membrane protein GN=Cgl2839

Q8NU92	3	7	3	1	3	FHA domain-containing protein GN=Cgl0047
Q04513	2	7	4	3		L-threonine dehydratase biosynthetic IlvA GN=ilvA
Q8NT64	2	7	4	3		Secreted protein GN=Cgl0446
Q8NP41	2	7	4	3		Ribosome-binding factor A GN=rbfA
Q8NNG7	2	7	6	1		Zn-ribbon protein, possibly nucleic acid-binding GN=Cgl2237
Q8NLX1	2	7	2		5	Sulfate adenylyltransferase subunit 2 GN=Cgl2815
Q8NLR8	2	7	5	2		Acetyl-CoA carboxylase beta subunit GN=Cgl2870
Q8NTV8	2	7	5	2		Uncharacterized protein GN=Cgl0194
P58939	3	6	2	2	2	Carbamoyl phosphate synthase large chain GN=carB
Q8NM58	3	6	3	1	2	Uncharacterized protein GN=Cgl2722
Q8NSB7	3	6	4	1	1	Ribosome hibernation promoting factor GN=hpf
Q59279	3	6	4	1	1	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase GN=argC
Q8NM01	2	6	3	3		Coenzyme F420-dependent N5,N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase and related flavin-dependent oxidoreductases GN=Cgl2785
Q59282	2	6	4		2	Acetylornithine aminotransferase GN=argD
Q8NR37	2	6	3	3		ABC-type transporter, ATPase component GN=Cgl1227
Q8NRG3	2	6	3		3	Thiol peroxidase GN=tpx
Q8NT97	2	6	4		2	Helix-turn-helix domain-containing protein GN=Cgl0411
Q8NN39	2	6	4	2		Hypothetical membrane protein GN=Cgl2374
Q8NMP4	3	5	3	1	1	phosphoserine phosphatase GN=Cgl2522
Q8NLV7	3	5	3	1	1	Acetylornithine deacetylase/Succinyl-diaminopimelate desuccinylase and related deacylases GN=Cgl2829
O87331	3	5	3	1	1	GTP pyrophosphokinase GN=relA
Q8NPB4	2	5	3	2		DUF3000 domain-containing protein GN=Cgl1900
Q8NQZ8	2	5	3	2		DUF2581 domain-containing protein GN=Cgl1269
Q8NNU8	2	5	3	2		Metal-dependent amidase/aminoacylase/carboxypeptidase GN=Cgl2083
Q8NRX6	2	5	3	2		Uncharacterized ACR GN=Cgl0915
Q8NQU5	2	5	4		1	Phosphopantetheine adenylyltransferase GN=coaD

Q8NLF2	2	5	4	1		Hypothetical membrane protein GN=Cgl2990
Q8NTD0	2	5	3		2	Antitoxin GN=Cgl0377
Q8NR21	2	5	4		1	Exonuclease domain-containing protein GN=Cgl1243
Q8NNG5	2	5	4	1		Predicted phosphatases GN=Cgl2239
Q8NSD2	2	5	3		2	Metallopeptidase family protein GN=Cgl0744
Q8NTT4	2	5	2	3		Probable phenylalanine aminotransferase GN=pat
Q8NNT1	3	3	1	1	1	Transcriptional regulator GN=Cgl2106

Tabla Suplementaria 6A: Proteínas marcadas con FB sobrerrepresentadas en la cepa C.glu_apex2-ftsZ

ID Uniprot	Tasa de cambio	Valor p	Descripción
Construcción	-20.95	1.00E-05	His-Flag-APEX-FtsZ
P94337	-11.56	1.00E-05	Cell division protein FtsZ GN=ftsZ
Q8NLC0	-9.84	4.40E-03	2-keto-4-pentenoate hydratase/2-oxohepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (Catechol pathway) GN=Cgl3022
Q8NP02	-5.72	6.25E-03	Elongation factor Ts GN=tsf
P19537	-5.03	1.19E-02	Fructose-bisphosphate aldolase GN=fba
Q8NNF6	-4.30	1.90E-03	Pyruvate dehydrogenase E1 component GN=aceE
Q79VG7	-3.24	5.35E-03	ATP synthase subunit alpha GN=atpA
Q8NSV6	-3.20	5.69E-03	Small ribosomal subunit protein uS13 GN=rpsM
Q8NQ98	-2.23	1.55E-02	Aconitate hydratase A GN=acn
Q8NMW6	-2.04	8.80E-03	Hemoglobin-like proteins GN=Cgl2448
Q8NQW4	-1.64	1.06E-03	Alpha-1,4 glucan phosphorylase GN=Cgl1308
Q8NT20	-1.56	8.50E-03	Small ribosomal subunit protein uS7 GN=rpsG
Q8NNC6	-1.39	1.53E-02	Glycine--tRNA ligase GN=glyQS

Tabla Suplementaria 6B: Proteínas marcadas con FB sobrerrepresentadas en la cepa C.glu_apex

ID Uniprot	Tasa de cambio	Valor p	Descripción
Q01651	8.48	2.83E-03	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GN=gap
Q8NMD4	3.69	6.08E-03	Glucosamine-6-phosphate deaminase GN=nagB
Per-Protein-Pasmido	3.32	4.69E-04	
Q8NSS1	3.31	5.03E-03	Co-chaperonin GroES GN=groES
Q8NQB5	2.47	1.78E-05	Phospholipid-binding protein GN=Cgl1523
Q8NLY6	2.44	1.11E-02	Chaperone protein DnaK GN=dnaK
Q01655	2.42	1.48E-03	Phosphoglycerate kinase GN=pgk
Q8NMW3	2.27	3.12E-03	Predicted thioesterase GN=Cgl2451
Q8NT21	1.97	1.95E-02	Small ribosomal subunit protein uS12 GN=rpsL
Q8NL53	1.85	2.91E-03	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G GN=rsmG
Q8NSX5	1.76	5.14E-03	Small ribosomal subunit protein uS5 GN=rpsE
Q6M6E7	1.70	1.45E-02	Fructose-1,6-bisphosphatase class 2 GN=glpX
Q8NQ64	1.58	2.44E-04	Transaldolase GN=tal
P42439	1.40	3.76E-03	Elongation factor Tu GN=tuf
Q8NM64	1.34	1.06E-02	Chaperonin GroEL 2 GN=groEL2

Tabla Suplementaria 7A: Péptidos marcados con FB detectados exclusivamente en la cepa C.glu_apex2-ftsZ

Péptidos	Número de réplicas	Número total de espectros	Número de espectros R1	Número de espectros R2	Número de espectros R3	Número de espectros R4	Número de espectros R5	ID Uniprot	Descripción
ALTTVTTHDLPPTAGY[361.1460]LEGEHIALR	4	33	18	1	11		3	Q8NNA7	4-alpha-glucanotransferase
EGTAAYAPEY[361.1460]R	3	25	1	18		6		Q8NNN6	Cell division protein SepF
EIVAY[361.1460]LF	4	16	9	1	4		2	Q8NSV1	50S ribosomal protein

									L17
ERDY[361.1460]GY[361.1460]APEAPAPVAPSPAPR	3	16	2	8		6		Q8NNN6	Cell division protein SepF
DAEAY[361.1460]LGEDV TDAVITVPAYFEDSQR	5	13	2	6	2	1	2	Q8NLY6	Chaperone protein DnaK (HSP70)
GIELPPIY[361.1460]FSDH R	3	13	1	9			3	Q8NLX1	ATP-sulfurylase small subunit
EKIEEALTY[361.1460]GV IK	5	12	4	4	2	1	1	P19537	Fructose-bisphosphate aldolase, FBP aldolase, FBPA
VPLDELQGY[361.1460]L AQR	5	12	3	2	2	2	3	Q8NNC6	Glycine--tRNA ligase
VAPGVPVY[361.1460]EII TGNGEGQTPIAK	5	12	3	3	2	2	2	Q8NNI9	Hypothetical membrane protein
ANTEHNY[361.1460]DAS SITILEGLEAVR	5	12	2	4	2	2	2	Q8NUD3	DNA gyrase subunit B
YSPCDIATY[361.1460]G MGLAASMGQF	3	12	6		4		2	Q8NN01	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2
INGKPIGENFKEY[361.1460] SSSIALGR	3	12	2	8		2		Q8NMA4	Diacetyl reductase [(S)-acetoin forming]
DYERDY[361.1460]ER	2	12	1	11				Q8NNV4	Uncharacterized protein, Cgl2076
YFNDDTY[361.1460]EGLP TDGYAAWLEK	5	11	2	2	3	2	2	Q8NLQ1	UDP-galactopyranose mutase
ILDAMDSTGADY[361.1460] ADSLAEATR	3	11	4		4		3	P08499	Homoserine dehydrogenase, HDH
IYNPHGQNY[361.1460]V PVDHDLMLSYR	3	11	3		3		5	Q8NNF6	Pyruvate dehydrogenase E1 component, E1p, PDH E1 component
DY[361.1460]GY[361.1460] APEAPAPVAPSPAPR	3	11	2	5		4		Q8NNN6	Cell division protein SepF
NDVLAANY[361.1460]PF ATIEPNVGLVELPDAR	5	10	3	2	2	1	2	Q8NRL6	Ribosome-binding ATPase YchF

ALEDLGPVY[361.1460]SR	4	10	2	1	3		4	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase, OAH-sulfhydrylase
YGMADSY[361.1460]DEQGN YIFPEGFDAETNEWLEGFDEQR	3	10	2		5		3	Q8NQR5	Ribosomal protein S1
NAA Y[361.1460]SIPTYGE SIYGDDGFGEFTGASVPLDEAF	5	9	1	2	1	1	4	Q8NT25	DNA-directed RNA polymerase subunit beta, RNAP subunit beta, Cgl0489
NAFEY[361.1460]LR	5	9	2	2	1	2	2	Q8NRD3	Uncharacterized protein, Cgl1119
MLAAY[361.1460]AGHADVVQALIER	4	9	4		2	1	2	Q8NN64	Ankyrin repeat proteins
YEGTAA Y[361.1460]APEY[361.1460]R	4	9	1	4		3	1	Q8NNN6	Cell division protein SepF
FY[361.1460]GAQPPAGHAPHR	4	9	1	2		3	3	Q8NQB5	Phospholipid-binding protein
HCLPAY[361.1460]R	3	9	5		3		1	Q59283	Ornithine carbamoyltransferase, OTCase
ENY[361.1460]IPR	3	9	2	5		2		Q8NSZ2	50S ribosomal protein L5
SAEPY[361.1460]GR	3	9	4		3		2	Q8NQ65	Transketolase
VHY[361.1460]SEIQSGF R	3	9	4	1	4			Q8NTX7	Cold shock proteins, Cgl0174
DGIPATQFY[361.1460]VDDVQEEYDSLKDK	3	9	4		3		2	Q8NU40	Lactoylglutathione lyase and related lyases
Y[361.1460]QPLNELDPEVAAAIAGELAR	5	8	1	2	1	2	2	Q93PM7	Serine hydroxymethyltransferase, SHMT, Serine methylase
APGESTY[361.1460]ANLPIADFGETTTR	4	8	3	2	2		1	P08499	Homoserine dehydrogenase, HDH
ATFGNVHGVY[361.1460]KPGNVK	4	8	2	2	2		2	P19537	Fructose-bisphosphate aldolase, FBP aldolase,

									FBPA
AETEDISEWVDY[361.1460]LK	4	8	2	3	1		2	P42463	Acetolactate synthase large subunit
LVTATIDPGLDENAY[361.1460]IVPGLGDAGR	4	8	3	2	1		2	P58998	Uracil phosphoribosyltransferase
QKVESALDY[361.1460]K	4	8	2	3	1	2		Q8NM16	Adenylosuccinate synthetase
GVHVVTVNDY[361.1460]LAK	4	8	3	2	1	2		Q8NSB6	Protein translocase subunit SecA 1
RQQAEEAAAEAPAGNY[361.1460]STDSAEDAPAAEAVEESAGSLASDEQLAALR	4	8	1	2	2		3	Q8NQR5	Ribosomal protein S1
MY[361.1460]AVGGGK	3	8	2	4		2		Q8NM64	60 kDa chaperonin 2 (GroEL protein 2) (Protein Cpn60 2)
GYLSPY[361.1460]FINDNDTQQAVALDNPAVL	3	8	3		3		2	Q8NSS0	60 kDa chaperonin 1
AY[361.1460]AEEFEGDQK	3	8	2	4		2		Q8NSS0	60 kDa chaperonin 1
GGVEY[361.1460]LLLSAR	3	8		2		4	2	Q8NSS1	10 kDa chaperonin (GroES protein) (Protein Cpn10)
EKY[361.1460]GDDQFMEWR	3	8	4		2		2	Q8NTA5	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase, BPG-dependent PGAM, PGAM, Phosphoglyceromutase, Dpgm
FAGQGY[361.1460]DWLK	3	8	3		3		2	Q8NMS0	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein)

									synthase
LAELGISLPSVAAPVAA Y[361.1460]VPAIQTGNQ VW	3	8	4		1		3	Q8NTM4	Translation initiation inhibitor
TVDEQVSNNYY[361.1460] DM[15.9949]LLK	2	8		7		1		P31026	NADP-specific glutamate dehydrogenase, NADP- GDH
PKY[361.1460]DNSNADQ WGFETR	4	7	1	2	2		2	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase, OAH- sulfhydrylase
LPGY[361.1460]VLVR	4	7	2	2		2	1	H7C6D0	Transcription termination/antiterminat ion protein NusG
GVVGGQSLAPTDY[361 .1460]AQQR	4	7	1	2	3		1	Q8NNK0	Hypothetical membrane protein
QQAEEAAAEAPAGNY[3 61.1460]STDSAEDAPAAE AVEESAGSLASDEQLAA LR	4	7	1	2	2		2	Q8NQR5	Ribosomal protein S1
GSY[361.1460]GFVPDLP AAAGTEAVGIVDALGEG VEGLQVGQR	3	7	5		1		1	Q8NL73	enoyl-[acyl-carrier- protein] reductase
Y[361.1460]PGGAPVSSG GH	3	7	2	4		1		Q8NSL6	Carbon starvation protein, predicted membrane protein
YDNLY[361.1460]PSR	3	7	2	3		2		Q8NTE7	UDP-glucose 6- dehydrogenase
IGY[361.1460]EIK	2	7		4		3		Q8NQ19	Aspartate-- tRNA(Asp/Asn) ligase, EC 6.1.1.23 (Aspartyl- tRNA synthetase, AspRS) (Non- discriminating aspartyl- tRNA synthetase, ND- AspRS)

ADPY[361.1460]YFLPTV GEM[15.9949]DIYLFSEGR	2	7		5		2		Q8NR40	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB
NAY[361.1460]NPAER	2	7		5		2		Q8NST5	30S ribosomal protein S9
VHY[361.1460]SEIEGNFGR	2	7	6		1			Q8NTJ9	Cold shock proteins, Cgl0308
AHKEIY[361.1460]NTLL QVLEDGR	4	6	2	2	1		1	Q8NMA0	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit
GLIDELDY[361.1460]GE DQEASR	3	6		2	2		2	P0C1E6	GTPase Ogb
DVGRDY[361.1460]EAVIR	3	6	2	2	2			P42455	2-isopropylmalate synthase
DY[361.1460]EAVIR	3	6	3	2	1			P42455	2-isopropylmalate synthase
NLPIY[361.1460]QSTAF	3	6	2		2		2	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase, OAH- sulfhydrylase
SY[361.1460]IGVGPGR	3	6	2	2		2		Q8NM16	Adenylosuccinate synthetase
GSY[361.1460]DEIAR	3	6	2	2		2		Q8NM44	Putative glutamate-- cysteine ligase 2
MLLIKPY[361.1460]EMSS MQVIENAIR	3	6	3		1		2	Q8NP03	Ribosome-recycling factor, RRF (Ribosome- releasing factor)
RVQLY[361.1460]DDEDI DR	3	6	2	3	1			Q8NR14	ATP-dependent 6- phosphofructokinase, ATP-PFK, Phosphofructokinase
TEHYDVVVLGAGPGGY[361.1460]VSAIR	3	6	3	2	1			Q8NTE1	Dihydrolipoyl dehydrogenase, LPD
ELAAIQDAEKDY[361.14 60]DSR	3	6	2	2	2			Q8NMP2	Ferritin
AY[361.1460]AGHADVV QALIER	3	6	2		2		2	Q8NN64	Ankyrin repeat proteins

ALFSEAY[361.1460]EDP VSGIF	3	6	2		2		2	Q8NNQ9	Methionine synthase II (Cobalamin- independent)
M[15.9949]GAVSY[361.14 60]ETDRDHDLPAPR	3	6	1	3		2		Q8NQF8	RNA polymerase- binding protein RbpA
SY[361.1460]ADDKSVLE ELR	3	6	1		3		2	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
AY[361.1460]VETTR	3	6	2	3	1			Q8NTJ8	DNA topoisomerase 1
GGGLFTTGNDRDY[361.1 460]R	2	6		2		4		Construcc ion P94337	
ASY[361.1460]NNHPIEET GAK	2	6	2	4				Q57179	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+)) (KARI)
NSPLVIGVGEGENFLGS DVSGFIDY[361.1460]TR	2	6		4		2		Q8NND3	Glutamine--fructose-6- phosphate aminotransferase [isomerizing]
ANPAMFNGVMAEY[361. 1460]YGVPTPITQMSGIT VPEPR	2	6			3		3	Q8NP03	Ribosome-recycling factor, RRF (Ribosome- releasing factor)
EFFGLAPYEAHEHEDAY[3 61.1460]Y[361.1460]ADEP R	2	6		4		2		Q8NNN6	Cell division protein SepF
AY[361.1460]ETTAPHLG GCGLHDPLAVGVAVDP SLVTLLPINLK	2	6	3	3				Q8NP48	Inosine-uridine nucleoside N- ribohydrolase
FGEIGGPPSAY[361.1460] QVEMR	2	6	3		3			Q8NPB4	Uncharacterized protein, Cgl1900
AFEY[361.1460]LR	4	5	1	2		1	1	Q8NRD3	Uncharacterized protein, Cgl1119
SLEELNADIVFGIPGGAV LPVYDPLY[361.1460]SST K	3	5	2		1		2	P42463	Acetolactate synthase large subunit
Y[361.1460]SLAPVAEAL SDELGQY[361.1460]VAL	3	5	2		2		1	Q01655	Phosphoglycerate kinase

AADVVGEDAHER									
VAY[361.1460]TQLVDEIS TEPDYDAALAALN	3	5	2	1			2	Q8NRG3	Thiol peroxidase
SQY[361.1460]DIINVR	3	5	1	2		2		Q8NSV4	30S ribosomal protein S4
LTYYIY[361.1460]GIGPAR	3	5	2		1		2	Q8NSV6	30S ribosomal protein S13
SGSGSSY[361.1460]VIGK	3	5	2	1	2			Q79VD6	Ribonucleoside- diphosphate reductase subunit beta
VWLSEDY[361.1460]VR	3	5	2		2		1	Q79VE5	Branched-chain-amino- acid transaminase
LY[361.1460]FDDR	3	5	1	2		2		Q79VE6	Uncharacterized ACR, Cgl2197
EASY[361.1460]TLGTR	3	5	2	2		1		Q8NL57	N-acetylmuramoyl-L- alanine amidase
TMPQFLY[361.1460]AEG MVPPQELFDDLQAEALE K	3	5	2		1		2	Q8NLJ9	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding proteins, Cgl2943
FY[361.1460]PGAK	3	5	2	2			1	Q8NMW0	Energy-dependent translational throttle protein EttA
GLAPYEAHEDAYY[361 .1460]ADEPR	3	5	2	2	1			Q8NNN6	Cell division protein SepF
Y[361.1460]ANALGQAE ASNSVEGR	3	5	3	1			1	Q8NP60	Phage shock protein A (IM30), suppresses sigma54-dependent transcription, Cgl1961
STSSDY[361.1460]SHALI R	3	5	2		2		1	Q8NT79	Delta-aminolevulinic acid dehydratase
AFDQVAEIVNGY[361.14 60]DPDAIVLAR	3	5		2	2	1		Q8NTC5	Formyltetrahydrofolate deformylase
AHDGENY[361.1460]LSF ESR	2	5	2	3				Q8NMJ4	Ferric nitrobindin-like protein

GGY[361.1460]LPER	2	5		3		2		Q8NNF6	Pyruvate dehydrogenase E1 component, E1p, PDH E1 component
FVIEPLEPGFGY[361.1460]JTLGN	2	5	2				3	Q8NSV2	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
VTFGEYGIQALEPAY[361.1460]ITNR	2	5		3	2			Q8NT00	50S ribosomal protein L16
Y[361.1460]GALSDR	2	5		3		2		Q8NT08	50S ribosomal protein L4
GVEY[361.1460]YR	2	5		4		1		Q8NLE6	Myo-inositol-1-phosphate synthase
FY[361.1460]DLATGK	2	5		4		1		Q8NNH1	SPOR domain-containing protein
Y[361.1460]DLATGK	2	5		3		2		Q8NNH1	SPOR domain-containing protein
GGVAY[361.1460]IMK	3	4	2		1		1	P42455	2-isopropylmalate synthase
SKDTTTYQGVTEIGSVPAY[361.1460]LVLADGR	3	4	1	2			1	P58893	Carbamoyl-phosphate synthase small chain
YSLAPVAEALSDELQY[361.1460]VAL	3	4	2	1			1	Q01655	Phosphoglycerate kinase
DAEAYLGEDVTDVITVPAY[361.1460]FEDSQR	3	4		2	1		1	Q8NLY6	Chaperone protein DnaK (HSP70)
AGGAEVY[361.1460]JR	3	4	1	1			2	Q8NQW7	Phosphomethylpyrimidine synthase
Y[361.1460]QTIEA	3	4	1	1			2	Q8NRV2	50S ribosomal protein L25 (General stress protein CTC)
VAHIEY[361.1460]DPNR	3	4	1	2		1		Q8NT05	Large ribosomal subunit protein uL2
SYSDTPDDEDQYAEY[361.1460]ADWDEDDTDNR	3	4	1	2		1		Q8NMJ1	Uncharacterized protein, Cgl2582
GYERDDRDY[361.1460]	3	4		2	1		1	Q8NNV4	Uncharacterized protein, Cgl2076

TKVEY[361.1460]SEIAHS FLGETF	3	4	2	1	1			Q8NRH9	ADP-ribose pyrophosphatase
KY[361.1460]TDEAPTPEL IDK	3	4	1	2		1		Q8NTH2	Nitroreductase
IFDNSY[361.1460]FTELL SGEK	2	4	3		1			APEX Construcc ion	
ILS[79.9663]Y[361.1460]A DFYQLAGVVAVEVTGG PK	2	4		1		3		APEX Construcc ion	
GGLFTTGNDRDY[361.14 60]R	2	4		2		2		Construcc ion P94337	
NDPY[361.1460]LSR	2	4		2		2		Construcc ion P94337	
ATELGHLNTAY[361.14 60]LVNPLTDPR	2	4	2	2				P77844	Phosphate acetyltransferase
SAIANY[361.1460]TSSY	2	4	2		2			Q79VG7	ATP synthase subunit alpha
YMLGELY[361.1460]EVA PSSVH	2	4	3		1			Q8NLN0	L-lactate dehydrogenase, L-LDH
INLKDEIEFVCTHAGGV VEIYY[361.1460]GQPLNE R	2	4		3		1		Q8NMJ4	Ferric nitrobindin-like protein
ENPVEVAHAGNIY[361.1 460]AFIGLKDTTGTGDTLC DANAPIILESMDFPDPVI QVAI	2	4			2		2	Q8NT19	Elongation factor G, EF-G
VGGVHY[361.1460]LM[1 5.9949]K	2	4		2		2		Q8NTE1	Dihydrolipoyl dehydrogenase, LPD
LAADY[361.1460]PLYEG LEDWTIV	2	4	3				1	Q93PM7	Serine hydroxymethyltransfera se, SHMT, Serine methylase
LYTLDY[361.1460]YLK	2	4	2	2				H7C7K2	Pyruvate carboxylase

NVADVEY[361.1460]LLQ ALADIGDPVAVER	2	4	3				1	Q8NLN1	Pyruvate kinase, Cgl2910
HY[361.1460]GEVAQQLD GINVR	2	4	1	3				Q8NLQ6	Hypothetical membrane protein
MGPY[361.1460]DTEEEA HHAISIAAAR	2	4	2		2			Q8NNH1	SPOR domain- containing protein
TKEFFGLAPY[361.1460]E AEHEDAYYADEPR	2	4		3		1		Q8NNN6	Cell division protein SepF
GFNLY[361.1460]FHTLG R	2	4	2		2			Q8NQB5	Phospholipid-binding protein
AAPGY[361.1460]VR	2	4	2		2			Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
AAFETTIVAY[361.1460]D PYANPAR	2	4		3		1		Q8NQY7	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
GAVEAGLVGVY[361.146 0]YQQFDR	2	4		2		2		Q8NSB5	HAD family hydrolase
YDVDPY[361.1460]ADKV DDVM[15.9949]PGQVVR	2	4		2		2		Q8NSB7	Ribosome hibernation promoting factor, HPF
IAMY[361.1460]HALGEG	2	4	2				2	Q8NSI4	Dihydrolipoamide dehydrogenase/glutathi one oxidoreductase and related enzymes
Y[361.1460]FGADAILLM LS[79.9663]VLDDEEYAA LAAEAARFDLDILTEVID EEVARA	3	3	1		1		1	P06560	Tryptophan biosynthesis protein TrpCF
LVQLLIQSENAPQAVEY[361.1460]QIISLW	3	3	1		1		1	Q79VG7	ATP synthase subunit alpha
DGKPVFPY[361.1460]FV TPDAAY[361.1460]HGLK	3	3		1		1	1	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase, OAH- sulfhydrylase
AIVAEIIVQYFLSY[361.1 460]ADR	3	3		1		1	1	Q8NM16	Adenylosuccinate synthetase
DGEQFIPLY[361.1460]GE HAR	3	3	1	1	1			Q8NNI8	Uncharacterized transporter Cgl2211/cg2425

TGNDRDY[361.1460]R	2	3	2		1			Construcc ion P94337	
DPY[361.1460]LSR	2	3	1	2				Construcc ion P94337	
TSPNNY[361.1460]LAK	2	3		2		1		Construcc ion P94337	
FGEGVPLKPVVKPGSWI GGDHDGNPY[361.1460]V TAETVEYSTHR	2	3		1		2		P12880	Phosphoenolpyruvate carboxylase
VLADTY[361.1460]PELN EAF	2	3	2		1			P42439	Elongation factor Tu, EF-Tu
AY[361.1460]DHEAIDAS AR	2	3		2		1		P66326	Small ribosomal subunit protein uS10
AY[361.1460]NTSGK	2	3	2		1			Q59279	N-acetyl-gamma- glutamyl-phosphate reductase
STLETWPQVIINTY[361.1 460]GTPPVELVSGK	2	3	2				1	Q59282	Acetylornithine aminotransferase
TY[361.1460]AHSNF	2	3	2		1			Q59283	Ornithine carbamoyltransferase, OTCase
CLPAY[361.1460]R	2	3	2		1			Q59283	Ornithine carbamoyltransferase, OTCase
DQY[361.1460]LDNMDIE R	2	3	2		1			Q8NN68	Elongation factor 4
MLLIKPY[361.1460]EM	2	3	1				2	Q8NP03	Ribosome-recycling factor, RRF (Ribosome- releasing factor)
IVHQVNIEY[361.1460]LA R	2	3	1				2	Q8NQ98	Aconitate hydratase A, ACN, Aconitase
FRPY[361.1460]TNTDVV GTEIGGACK	2	3	2		1			Q8NQV3	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase

									[NAD(P)+]
ISVY[361.1460]DK	2	3		2		1		Q8NS21	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH
LNAY[361.1460]NPAER	2	3		2		1		Q8NST5	30S ribosomal protein S9
Y[361.1460]GIGPAR	2	3		2		1		Q8NSV6	30S ribosomal protein S13
IGDPQVAY[361.1460]R	2	3		2		1		Q8NT19	Elongation factor G, EF-G
YAEGYPGRRY[361.1460] YGGCEQVDIIEDLAR	2	3	2	1				Q93PM7	Serine hydroxymethyltransferase, SHMT, Serine methylase
YAEGYPGRRYY[361.1460]GGCEQVDIIEDLAR	2	3	2	1				Q93PM7	Serine hydroxymethyltransferase, SHMT, Serine methylase
RYY[361.1460]GGCEQVDIIEDLAR	2	3		2	1			Q93PM7	Serine hydroxymethyltransferase, SHMT, Serine methylase
NY[361.1460]TVEGMTCHCVSSVK	2	3		2		1		Q8NL68	HMA domain-containing protein
TEDLVDIITELAEVY[361.1460]GSWK	2	3			1		2	Q8NLF4	Transcriptional regulators
Y[361.1460]LMASF	2	3	2		1			Q8NLJ3	Phage shock protein A (IM30), suppresses sigma54-dependent transcription, Cgl2949
TPDEPDAPY[361.1460]SDGVVTGYGR	2	3	1		2			Q8NLR8	Acetyl-CoA carboxylase beta subunit
EKETLEY[361.1460]AHQSELNR	2	3		2		1		Q8NM89	Hypothetical membrane protein

RSY[361.1460]SDTPDDE DQYAEYADWDEDDTDN R	2	3	1	2				Q8NMJ1	Uncharacterized protein, Cgl2582
FGGDGAY[361.1460]GES K	2	3	1	2				Q8NMS0	3-oxoacyl-(Acyl- carrier-protein) synthase
M[15.9949]LAAY[361.146 0]AGHADVVQALIER	2	3	1	2				Q8NN64	Ankyrin repeat proteins
TRPY[361.1460]GVLFSK	2	3		2		1		Q8NNA8	Acyl-CoA synthetase
AEAVY[361.1460]DDVLN LTAEDIAESVR	2	3		2		1		Q8NNJ5	Short-chain dehydrogenases of various substrate specificities
GLAPY[361.1460]EAEHE DAYYADEPR	2	3	1	2				Q8NNN6	Cell division protein SepF
Y[361.1460]EGTAAY	2	3	2		1			Q8NNN6	Cell division protein SepF
GTAAYAPEY[361.1460]R	2	3		2		1		Q8NNN6	Cell division protein SepF
LRNECDDY[361.1460]VD TK	2	3		2		1		Q8NNV4	Uncharacterized protein, Cgl2076
FIMGEEAKDWITVY[361. 1460]PFVR	2	3			2		1	Q8NPB5	Uncharacterized ACR, Cgl1899
ILNY[361.1460]VKPDFIH VF	2	3	2	1				Q8NQ77	ABC-type transporter, ATPase component, Cgl1562
MGAVSY[361.1460]ETDR DHDLAPR	2	3	2			1		Q8NQF8	RNA polymerase- binding protein RbpA
VSDLVISAGY[361.1460] AILGR	2	3	1		2			Q8NR37	ABC-type transporter, ATPase component
QKY[361.1460]NNLVR	2	3	1	2				Q8NR58	Transcription termination factor Rho
Y[361.1460]GWEYSATVP EDAK	2	3	2	1				Q8NRC0	Shikimate 5- dehydrogenase
VLVY[361.1460]PRPR	2	3	1	2				Q8NS03	Molybdopterin

									molybdenumtransferase , EC 2.10.1.1
AGLS DNY[361.1460]AEW TLNLHNTSNPTADPR	2	3		2		1		Q8NS52	DUF3071 domain-containing protein
EFPVSAEETGYVHPY[361.1460]TR	2	3		2		1		Q8NS61	Uncharacterized protein, Cgl0818
LVDVPGFLPGAGQEY[361.1460]GGILR	2	3	2		1			Q8NSG7	Detergent sensitivity rescuer dtsR1
VVGSDTPLY[361.1460]DQR	2	3	1	2				Q8NSK6	Siderophore-interacting protein
DYPLIPVG Y[361.1460]F	2	3	2		1			Q8NTQ1	Catalase
VVD AIATTATDRY[361.1460]DRPADAVVIESVEIT A	2	3		2		1		Q8NUA5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase
WELEDLSFAILY[361.1460]PK	2	2	1				1	O87331	GTP pyrophosphokinase
AFSHFALLANLAEDLY[361.1460]DEELR	2	2		1		1		P12880	Phosphoenolpyruvate carboxylase
GKPVFPYFVTPDAAY[361.1460]HGLK	2	2		1			1	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase, OAH-sulfhydrylase
Y[361.1460]MLGELY[361.1460]EVAPSSVHAY	2	2	1		1			Q8NLN0	L-lactate dehydrogenase, L-LDH
YMLGELYEVAPSSVHAY[361.1460]IIGEHGDTLPVLSSATIAGVSLSR	2	2		1		1		Q8NLN0	L-lactate dehydrogenase, L-LDH
FDKGYISGY[361.1460]FATDMER	2	2	1				1	Q8NM64	60 kDa chaperonin 2 (GroEL protein 2) (Protein Cpn60 2)
GY[361.1460]ISGYFATDMER	2	2	1		1			Q8NM64	60 kDa chaperonin 2 (GroEL protein 2) (Protein Cpn60 2)
GQMGGMDY[361.1460]LSEDRVELR	2	2	1				1	Q8NN68	Elongation factor 4
ANDGAY[361.1460]VR	2	2	1	1				Q8NNF6	Pyruvate

									dehydrogenase E1 component, E1p, PDH E1 component
GAEAAALDY[361.1460]GEK	2	2		1	1			Q8NNT5	Histidinol dehydrogenase
NGVMAEY[361.1460]YGVPTPITQMSGITVPEPR	2	2	1		1			Q8NP03	Ribosome-recycling factor, RRF (Ribosome-releasing factor)
EFGTSAQILY[361.1460]DLGVR	2	2		1	1			Q8NQ52	Riboflavin biosynthesis protein RibBA
DGY[361.1460]QPGVLEAFHASVEQMR	2	2	1		1			Q8NR17	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A
Y[361.1460]ADIAAISFIR	2	2		1		1		Q8NLN1	Pyruvate kinase, Cgl2910
DAFGY[361.1460]R	2	2		1		1		Q8NLZ3	Predicted amidohydrolase
ARPEY[361.1460]DI	2	2		1		1		Q8NM28	ferredoxin--NADP(+) reductase
Y[361.1460]IDVDQAIHAK	2	2		1			1	Q8NM85	Dihydropteroate synthase
ILDNVWHY[361.1460]DFGGDGNVVESYISYLR	2	2		1		1		Q8NMG8	Two-component system, response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a HTH DNA-binding domain
AQHLLDRDY[361.1460]TPQIGDIAPPK	2	2	1		1			Q8NMP2	Ferritin
PANY[361.1460]EWWNVTAKE	2	2		1			1	Q8NNA8	Acyl-CoA synthetase
EFFGLAPY[361.1460]EAEHEDAY[361.1460]YADEPR	2	2		1		1		Q8NNN6	Cell division protein SepF
IVAITACPTGIAHTY[361.1460]M[15.9949]AADSLT	2	2		1		1		Q8NP80	Phosphotransferase system, fructose-

QNAEGR									specific IIC component, EC 2.7.1.191
TWDSLTPGHPEY[361.1460]R	2	2	1	1				Q8NQ65	Transketolase
GVHVDIPLQAY[361.1460]FR	2	2	1		1			Q8NQ75	Predicted membrane components of an uncharacterized iron-regulated ABC-type transporter SufB
QGHDLVLTDLDPILIDY[361.1460]AK	2	2	1				1	Q8NQI0	SAM-dependent methyltransferases
Y[361.1460]ALTVF	2	2		1		1		Q8NRW2	Peptide chain release factor 3
GAPY[361.1460]SAGQVL ENYPFIR	2	2	1	1				Q8NSC5	DUF4259 domain-containing protein
YGPY[361.1460]LK	2	2		1	1			Q8NTJ8	DNA topoisomerase 1
DSLSDQLIAGSGPEGL TY[361.1460]ER	2	2	1			1		Q8NTR0	DNA polymerase III subunit gamma/tau

Tabla Suplementaria 7B: Péptidos marcados con FB detectados exclusivamente en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ*

Péptidos	Número de réplicas	Número total de espectros	Número de espectros R1	Número de espectros R2	Número de espectros R3	Número de espectros R4	Número de espectros R5	ID Uniprot	Descripción
SY[361.1460]M[15.9949]A GK	3	15			8	5	2	Q8NQH1	Thiamine biosynthesis multifunctional protein ThiED
EAGSY[361.1460]GK	3	9			3	2	4	Q8NLP6	Serine--tRNA ligase
HY[361.1460]DHADGAQ R	3	6			2	2	2	Q8NTL6	Zn-dependent hydrolases, including glyoxylases
GNVHGVY[361.1460]K	3	6			2	2	2	P19537	Fructose-bisphosphate aldolase
LNGFY[361.1460]K	3	5			2	2	1	Q8NP02	Elongation factor Ts

AIY[361.1460]EADAAAG AT	3	4			1	2	1	Q8NLY6	Chaperone protein DnaK
APVAEALSDELGGY[361. 1460]VALAADVVGEDA HER	2	4			2		2	Q01655	Phosphoglycerate kinase
ETQRPQGQNPY[361.1460] JGGYDNFGGVYQQNVA PQK	3	3	1		1	1		Q8NRR2	Hypothetical membrane protein
SFPEAVEVCAEKIGY[361. .1460]QINY[79.9663]QGG GPGR	2	3	1	2				Q8NND6	DNA primase
Y[361.1460]KPTTPGR	2	3			2	1		Q8NT05	Large ribosomal subunit protein uL2
KQHALY[361.1460]GK	2	3			2	1		Q8NSZ7	Small ribosomal subunit protein uS17
IKGY[361.1460]GLGHNF EGR	2	3				1	2	Q8NNF6	Pyruvate dehydrogenase E1 component
IYNPHGQNYVPVDHDL M[15.9949]LSY[361.1460] R	2	2			1	1		Q8NNF6	Pyruvate dehydrogenase E1 component
VNDVDAAY[361.1460]D RVVAGDVQFR	2	2			1	1		Q8NTH6	alcohol dehydrogenase (NADP(+))
Y[361.1460]GHEVK	2	2			1		1	O69282	Malate:quinone oxidoreductase
SVGYY[361.1460]DAYYL QAQR	2	2				1	1	Q8NR17	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A

Tabla Suplementaria 8A: Péptidos marcados con FB sobrerrepresentados en la cepa C.glu_apex2-ftsZ

Péptidos	Tasa de cambio	Valor p	ID Uniprot	Descripción
RY[361.1460]YGGCEQVDIIEDLAR	-4.47	5.15E-03	Q93PM7	Serine hydroxymethyltransferase

IAAAFDTLIIGCAYY[361.1460]ESK	-4.30	1.62E-02	Q8NQQ6	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding proteins
AAGY[361.1460]EVTTPIVVSNYK	-3.51	1.13E-03	Q8NMD6	protein-N(pi)-phosphohistidine--sucrose phosphotransferase
SY[361.1460]GLM[15.9949]EQNVYTFFVSTDANK	-3.12	4.76E-02	Q8NT06	Large ribosomal subunit protein uL23
Y[361.1460]QNWPEASAVDLSDVALES-DALDAAVDLK	-2.85	3.03E-02	Per-Protein-Plasmido	
SFY[361.1460]PGAK	-2.74	3.22E-02	Q8NMW0	Energy-dependent translational throttle protein EttA
EFFGLAPYEAHEHEDAY[361.1460]YADEPR	-2.58	4.42E-02	Q8NNN6	Cell division protein SepF
GDY[361.1460]ITRPIK	-2.40	3.58E-02	Q8NT25	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'
REY[361.1460]HNESEDELVA AK	-2.31	2.79E-03	P19583	Triosephosphate isomerase
EFFGLAPYEAHEHEDAYY[361.1460]ADEPR	-2.31	2.94E-02	Q8NNN6	Cell division protein SepF
TVDEQVSNNYY[361.1460]DMLLK	-2.30	1.98E-02	P31026	NADP-specific glutamate dehydrogenase
AVSLEHFGASADY[361.1460]QTLFEK	-2.25	4.55E-03	Q8NQ65	Transketolase
AEY[361.1460]PDVH-VIVHPESPMPVVDAADSSGSTDFIVK	-2.23	2.31E-02	Q8NRI0	Quinolinate synthase
SLIHGY[361.1460]GK	-2.22	3.46E-03	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
ILADSY[361.1460]FDDL PVEQRPY	-2.16	2.29E-02	Q8NS46	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) synthase
VY[361.1460]TVGEALLSEPTTL	-2.15	2.77E-02	Q8NL53	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G
SY[361.1460]QSTIVPVELHSFEDAQVIGGA FR	-2.14	1.71E-03	Q8NNN6	Cell division protein SepF
YMLGELY[361.1460]EVAPSSVHAY	-2.00	4.89E-02	Q8NLN0	L-lactate dehydrogenase
AIELLY[361.1460]DADADLSLIQGR	-1.99	1.69E-03	Q57179	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+))
YM[15.9949]LGELY[361.1460]EVAPSSVHAYII-GEHGDTELPVLSSATIAGVSLSR	-1.92	2.89E-02	Q8NLN0	L-lactate dehydrogenase
YAADEDAFFADY[361.1460]AEAHQK	-1.83	5.73E-04	APEX Construcccion	

LFGAPPGY[361.1460]VGYEEGGQLTEK	-1.81	2.16E-02	Q8NMA0	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit
ALDALDNGTLNDNNSGLFY[361.1460]DLK	-1.62	4.04E-03	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase

Tabla Suplementaria 8B: Péptidos marcados con FB sobrerrepresentados en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ*

Péptidos	Tasa de cambio	Valor p	ID Uniprot	Descripción
IVGGVHY[361.1460]L	7.89	3.49E-02	Q8NTE1	Dihydrolipoyl dehydrogenase, LPD
HTPFFDNYRPQFY[361.1460]FR	6.08	1.09E-03	P42439	Elongation factor Tu, EF-Tu
AVLEAYSPLYGIY[361.1460]QK	5.68	2.30E-03	Q8NSD2	Metallopeptidase family protein
IEESLY[361.1460]R	4.96	4.46E-02	Q8NSZ0	Aldo/keto reductases, related to diketogulonate reductase
GVGGEVLAY[361.1460]VW	4.38	1.13E-02	Q8NSX8	Small ribosomal subunit protein uS8
GAIEIDDY[361.1460]M[15.9949]R	3.94	1.15E-04	Q8NTE1	Dihydrolipoyl dehydrogenase, LPD
VEIENSDDSY[361.1460]DREK	3.93	1.06E-03	Q8NM64	60 kDa chaperonin 2 (GroEL protein 2) (Protein Cpn60 2)
Y[361.1460]LSGGQK	3.62	6.70E-03	Q8NRH0	ABC-type transporter, duplicated ATPase component
IVGGVHY[361.1460]LM[15.9949]K	3.49	2.63E-03	Q8NTE1	Dihydrolipoyl dehydrogenase, LPD
STY[361.1460]HPK	3.27	3.52E-04	Q8NST6	Large ribosomal subunit protein uL13
SYEPY[361.1460]ELYETVPGLK	3.15	9.37E-03	Q8NQW4	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
WFY[361.1460]DLATGK	3.00	3.63E-02	Q8NNH1	SPOR domain-containing protein
SGSY[361.1460]LDAGK	2.92	3.96E-04	Q8NTD0	Uncharacterized protein, Cgl0377
GHTEVY[361.1460]R	2.85	3.08E-03	Q79VF2	Nitrogen regulatory protein PII
AFAHY[361.1460]R	2.76	8.13E-04	Q8NT20	30S ribosomal protein S7
NLY[361.1460]FHTLGR	2.75	2.26E-02	Q8NQB5	Phospholipid-binding protein

IYQDNQY[361.1460]K	2.74	3.57E-02	Q8NPI9	Periplasmic serine proteases (ClpP class)
PVFPYFVTPDAAY[361.1460]HGLK	2.63	2.10E-02	Q79VI4	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase, OAH-sulfhydrylase
Y[361.1460]QTIEAAVR	2.57	1.22E-03	Q8NRV2	50S ribosomal protein L25 (General stress protein CTC)
LAAQY[361.1460]PQHTIF	2.52	1.17E-02	Q8NRI0	Quinolate synthase A
NNAESLVY[361.1460]QTR	2.50	1.10E-03	Q8NLY6	Chaperone protein DnaK (HSP70)
HIVEWLY[361.1460]NR	2.44	2.61E-02	Q8NMF7	Predicted hydrolases of the HAD superfamily
MMFGYPTEPY[361.1460]EIDPIMVK	2.43	1.34E-02	P42457	Citrate synthase
MFLSQY[361.1460]WGGPK	2.43	1.34E-02	Q8NMW6	Hemoglobin-like proteins
HARPEY[361.1460]DI	2.41	4.42E-02	Q8NM28	ferredoxin--NADP(+) reductase
ADM[15.9949]PY[361.1460]FR	2.40	2.42E-02	Q8NMX8	Carboxymuconolactone decarboxylase-like domain-containing protein
AM[15.9949]Y[361.1460]AVGGGK	2.39	3.42E-02	Q8NM64	60 kDa chaperonin 2 (GroEL protein 2) (Protein Cpn60 2)
LDDSY[361.1460]K	2.38	1.84E-03	Q8NNP0	Isoleucine--tRNA ligase
PQFY[361.1460]FR	2.32	2.06E-02	P42439	Elongation factor Tu, EF-Tu
AFAFAGQGY[361.1460]DWLK	2.24	4.49E-02	Q8NMS0	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) synthase
Y[361.1460]LM[15.9949]ASFDNK	2.22	6.96E-04	Q8NLJ3	Phage shock protein A (IM30), suppresses sigma54-dependent transcription, Cgl2949
VNY[361.1460]VDR	2.19	2.33E-02	Q8NRC0	Shikimate 5-dehydrogenase
LLY[361.1460]PEPK	2.18	1.37E-03	Q8NR47	Lactoylglutathione lyase and related lyases
VATAY[361.1460]EAK	2.16	2.36E-03	Q8NP83	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase
GTM[15.9949]Y[361.1460]DPSSVF	2.12	2.54E-02	Q6M6E7	Fructose-1,6-bisphosphatase class 2, FBPase class 2

IIQCYSGY[361.1460]ENK	2.11	4.82E-02	H7C6D0	Transcription termination/antitermination protein NusG
VVDAIATTATDRY[361.1460]DR	2.11	6.67E-03	Q8NUA5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase
SY[361.1460]GLM[15.9949]EQNVY	2.11	3.92E-03	Q8NT06	Large ribosomal subunit protein uL23
PLLEYY[361.1460]AR	2.05	8.47E-03	Q8NMK4	Acetyl-CoA hydrolase
Y[361.1460]YTHYR	2.04	1.83E-02	Q8NP40	Translation initiation factor IF-2
IY[361.1460]QDNQYK	2.01	4.43E-02	Q8NPI9	Periplasmic serine proteases (ClpP class)
LLEYY[361.1460]AR	2.00	2.31E-02	Q8NMK4	Acetyl-CoA hydrolase
CAALLIDGTPVGY[361.1460]AGELHPQILEK	1.98	6.71E-03	Q8NQN6	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit
SGY[361.1460]QYATEHAR	1.97	3.99E-02	Q8NT47	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase, DHNA-CoA synthase
AQTSVY[361.1460]DIAK	1.95	9.58E-03	Q01655	Phosphoglycerate kinase
IPVQY[361.1460]AK	1.94	3.76E-03	P38376	Protein translocase subunit SecY
Y[361.1460]GPYLK	1.92	1.64E-02	Q8NTJ8	DNA topoisomerase 1
SAIANYTSSY[361.1460]SAEASR	1.92	4.25E-03	Q79VG7	ATP synthase subunit alpha
ASY[361.1460]LTR	1.92	3.07E-03	Q8NP02	Elongation factor Ts, EF-Ts
VY[361.1460]EAIVK	1.90	1.67E-02	Q8NT26	DNA-directed RNA polymerase subunit beta, RNAP subunit beta, Cgl0488
IAVY[361.1460]AER	1.89	1.01E-02	Q01651	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH
DGIM[15.9949]VY[361.1460]R	1.88	2.97E-02	Q8NLG6	Thiol-disulfide isomerase and thioredoxins
LAY[361.1460]PIDK	1.88	2.40E-02	Q8NLF9	Small ribosomal subunit protein bS6
AFY[361.1460]DNLYPSR	1.86	7.01E-03	Q8NTE7	UDP-glucose 6-dehydrogenase
VLVY[361.1460]PR	1.86	3.02E-02	Q8NS03	Molybdopterin molybdenumtransferase, EC 2.10.1.1

IGSSTHTIDPSASFYPY[361.1460]AESK	1.85	8.78E-03	Q8NQ95	Predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerases
SQY[361.1460]IER	1.84	1.37E-05	Q8NSX5	30S ribosomal protein S5
SY[361.1460]LIGQGR	1.84	5.60E-03	Q8NR21	Exonuclease domain-containing protein
VLVY[361.1460]GNR	1.75	3.59E-03	Q8NTC5	Formyltetrahydrofolate deformylase
TGY[361.1460]VVSDK	1.72	1.52E-02	Q8NSZ7	30S ribosomal protein S17
LQEYSVVDY[361.1460]TTAT	1.71	3.74E-03	Q6M6E7	Fructose-1,6-bisphosphatase class 2, FBPase class 2
ALISVY[361.1460]DK	1.70	5.02E-03	Q8NS21	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH
VY[361.1460]TTTPK	1.65	1.87E-03	Q8NT21	30S ribosomal protein S12
AYAVY[361.1460]K	1.64	6.49E-04	Q8NQ64	Transaldolase

Tabla Suplementaria 9A: Proteínas marcadas con FB detectadas exclusivamente en la cepa C.glu_apex2-ftsZ

ID Uniprot	Número de réplicas	Número total de espectros	Número de espectros R1	Número de espectros R2	Número de espectros R3	Número de espectros R4	Número de espectros R5	Descripción
Q8NUD3	5	14	2	6	2	2	2	DNA gyrase subunit B GN=gyrB
Q8NLX1	3	13	1	9			3	Sulfate adenylyltransferase GN=Cgl2815
Q8NNI9	5	12	3	3	2	2	2	Hypothetical membrane protein GN=Cgl2210
Q8NSB6	4	10	4	3	1	2		Protein translocase subunit SecA 1 GN=secA1
Q8NMJ4	3	9	2	6		1		UPF0678 fatty acid-binding protein-like protein Cgl2579/cg2850 GN=Cgl2579
P58998	4	8	3	2	1		2	Uracil phosphoribosyltransferase GN=upp
Q8NSL6	3	8	2	5		1		Carbon starvation protein, predicted membrane protein GN=Cgl0654
Q8NP48	2	8	5	3				Inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase GN=Cgl1977

Q8NNA8	3	7		5		1	1	Long-chain acyl-CoA synthetases (AMP-forming) GN=Cgl2296
Q8NL73	3	7	5		1		1	NADPH:quinone reductase and related Zn-depend- ent oxidoreductases GN=Cgl3076
P0C1E6	3	6		2	2		2	GTPase Obg GN=obg
Q8NNQ9	3	6	2		2		2	Methionine synthase II (Cobalamin-independent) GN=Cgl2129
Q8NM44	3	6	2	2		2		Putative glutamate--cysteine ligase 2 GN=Cgl2736
Q6M2F0	2	6	4	2				ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH GN=ftsH
Q79VE9	2	6	2	4				Cytochrome bc1 complex cytochrome b subunit GN=qcrB
Q8NT79	3	5	2		2		1	Delta-aminolevulinic acid dehydratase GN=Cgl0431
Q8NRG3	3	5	2	1			2	Thiol peroxidase GN=tpx
Q8NQ84	2	5		2			3	ABC-type transporter, duplicated ATPase compo- nent GN=Cgl1554
Q8NQH0	3	4	1	2	1			Hydroxyethylthiazole kinase GN=thiM
Q8NLU7	3	4	1	2		1		Hypothetical membrane protein GN=Cgl2839
Q8NTH2	3	4	1	2		1		Nitroreductase GN=Cgl0335
Q8NT37	2	4		2		2		Geranylgeranyl pyrophosphate synthase GN=Cgl0473
Q8NQG6	2	4		3	1			GTPase Der GN=der
Q8NLQ6	2	4	1	3				Hypothetical membrane protein GN=Cgl2883
Q59279	2	4	2		2			N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase GN=argC
P77844	2	4	2	2				Phosphate acetyltransferase GN=pta
H7C7K2	2	4	2	2				Pyruvate carboxylase GN=Cgl0689
Q8NSB5	2	4		2		2		Uncharacterized protein GN=Cgl0761
Q8NPK7	2	4		3			1	Uncharacterized protein GN=Cgl1805
P06560	3	3	1		1		1	Tryptophan biosynthesis protein TrpCF GN=trpC
Q8NNI8	3	3	1	1	1			Uncharacterized transporter Cgl2211/cg2425 GN=Cgl2211

Q8NS16	2	3	1	2				50S ribosomal protein L33 GN=rpmG
Q8NR37	2	3	1		2			ABC-type transporter, ATPase component GN=Cgl1227
Q8NLR8	2	3	1		2			Acetyl-CoA carboxylase beta subunit GN=Cgl2870
Q59282	2	3	2				1	Acetylornithine aminotransferase GN=argD
Q8NSK0	2	3	1	2				Exonuclease III GN=Cgl0671
Q8NRD7	2	3	1	2				SAM-dependent methyltransferases GN=Cgl1115
Q8NSK6	2	3	1	2				Siderophore-interacting protein GN=Cgl0665
Q8NLF4	2	3			1		2	Transcriptional regulators GN=Cgl2988
Q8NS52	2	3		2		1		Uncharacterized protein GN=Cgl0827
Q8NM85	2	2		1			1	Dihydropteroate synthase GN=Cgl2694
Q8NTR0	2	2	1			1		DNA polymerase III subunit gamma/tau GN=dnaX
Q8NNT5	2	2		1	1			Histidinol dehydrogenase GN=hisD
Q8NN35	2	2	1				1	Molecular chaperone GN=Cgl2378
P0C1E4	2	2	1	1				Pyrroline-5-carboxylate reductase GN=proC
Q8NQ52	2	2		1	1			Riboflavin biosynthesis protein RibBA GN=ribBA
Q8NSC5	2	2	1	1				Uncharacterized protein GN=Cgl0751

Tabla Suplementaria 9B: Proteínas marcadas con FB detectadas exclusivamente en la cepa *C.glu_ Apkna_apex2-ftsZ*

ID Uniprot	Número de réplicas	Número total de espectros	Número de espectros R1	Número de espectros R2	Número de espectros R3	Número de espectros R4	Número de espectros R5	Descripción
Q8NRR2	3	4	2	1	1			Hypothetical membrane protein GN=Cgl0983
Q8NTH6	2	2		1	1			Zn-dependent alcohol dehydrogenases GN=Cgl0331
O69282	2	2		1		1		Malate:quinone oxidoreductase GN=mqo

Tabla Suplementaria 10A: Proteínas marcadas con FB sobrerrepresentadas en la cepa C.glu_apex2-ftsZ

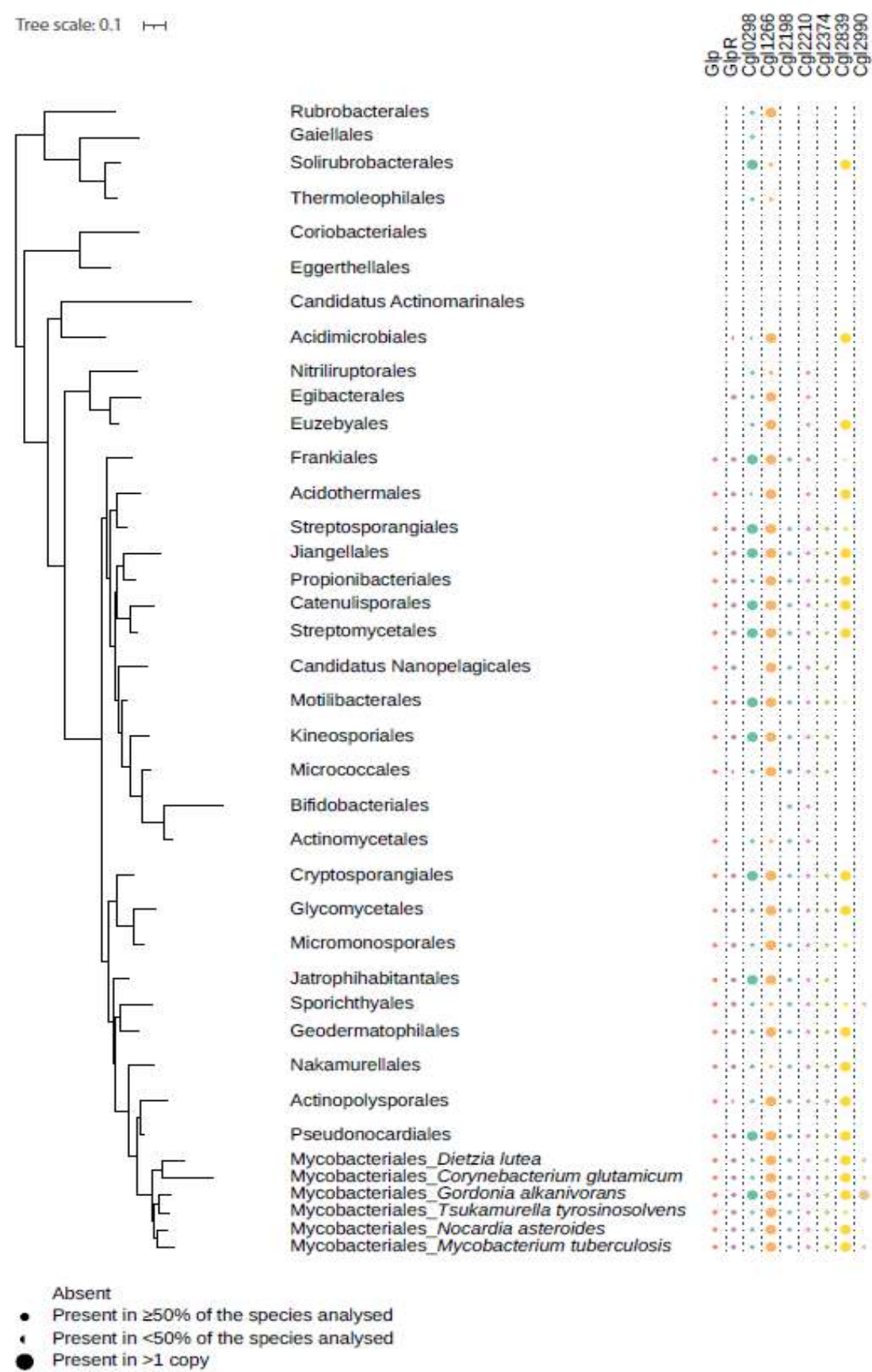
ID Uniprot	Tasa de cambio	Valor p	Descripción
Q8NSD2	-6.44	1.19E-03	Uncharacterized protein GN=Cgl0744
Q8NSX8	-4.55	1.17E-02	30S ribosomal protein S8 GN=rpsH
Q8NNP0	-3.47	8.62E-04	Isoleucine--tRNA ligase GN=ileS
Q8NTD0	-3.26	3.11E-04	Uncharacterized protein GN=Cgl0377
Q8NQH1	-3.23	1.85E-02	Thiamine biosynthesis multifunctional protein ThiED GN=theD
Q8NSZ0	-2.69	3.02E-02	Aldo/keto reductases, related to diketogulonate reductase GN=Cgl0525
Q8NTQ1	-2.46	1.29E-02	Catalase GN=Cgl0255
Q8NR47	-2.31	1.23E-03	Lactoylglutathione lyase and related lyases GN=Cgl1217
Q8NNJ2	-2.30	2.77E-02	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex GN=aceF
Q8NRV2	-2.22	1.16E-03	50S ribosomal protein L25 GN=rplY
Q8NLF9	-2.21	1.08E-02	30S ribosomal protein S6 GN=rpsF
Q8NRC0	-2.19	3.23E-02	Shikimate 5-dehydrogenase GN=Cgl1132
Q46078	-2.14	1.79E-04	Pyruvate kinase GN=pyk
Q8NR21	-2.11	1.83E-03	Exonuclease domain-containing protein GN=Cgl1243
Q8NSX5	-2.05	1.00E-05	30S ribosomal protein S5 GN=rpsE
Q79VF2	-2.03	1.94E-02	Nitrogen regulatory protein PII GN=Cgl2060
Q8NST6	-1.95	3.88E-03	50S ribosomal protein L13 GN=rplM
Q8NLN1	-1.94	2.56E-02	Pyruvate kinase GN=Cgl2910
Q8NSZ7	-1.86	9.49E-03	30S ribosomal protein S17 GN=rpsQ
Q8NT21	-1.84	2.51E-04	30S ribosomal protein S12 GN=rpsL
Q8NQ95	-1.82	8.86E-03	Predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerases GN=Cgl1543
Q8NT20	-1.81	5.13E-04	30S ribosomal protein S7 GN=rpsG
P38376	-1.65	7.54E-03	Protein translocase subunit SecY GN=secY
Q8NP02	-1.64	3.47E-03	Elongation factor Ts GN=tsf

Q8NSV4	-1.55	2.66E-03	30S ribosomal protein S4 GN=rpsD
--------	-------	----------	----------------------------------

Tabla Suplementaria 10B: Proteínas marcadas con FB sobrerrepresentadas en la cepa *C.glu_Δpkna_apex2-ftsZ*

ID Uniprot	Tasa de cambio	Valor p	Descripción
APEX	3.57	1.47E-04	
Q8NNA7	3.50	9.31E-03	4-alpha-glucanotransferase GN=Cgl2297
Q8NQF8	3.25	1.26E-02	RNA polymerase-binding protein RbpA GN=rbpA
Q8NMD6	3.24	2.38E-04	Phosphotransferase system IIC components, glucose/maltose/N-acetylglucosamine-specific GN=Cgl2642
Q8NMW0	2.81	3.97E-03	ABC-type transporter, duplicated ATPase component GN=Cgl2454
P58893	2.76	1.32E-02	Carbamoyl-phosphate synthase small chain GN=carA
Per-Protein-Plasmido	2.74	3.18E-02	
P31026	2.28	4.02E-02	NADP-specific glutamate dehydrogenase GN=gdh
Q57179	1.94	1.51E-03	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+)) GN=ilvC
P59004	1.87	4.02E-02	Uridylate kinase GN=pyrH
Q8NR01	1.65	9.10E-03	Hypothetical membrane protein GN=Cgl1266
Q93PM7	1.47	4.59E-03	Serine hydroxymethyltransferase GN=glyA

Figura Suplementaria 1: Distribución de las proteínas candidatas a interactores de FtsZ en la filogenia de Actinobacteria.



10. AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecer a Rosario por elegirme y aceptarme en su grupo, siendo mi primera experiencia estudiantil/laboral en el exterior. Por las enseñanzas y el tiempo dedicado para poder culminar hoy esta tesis. Y principalmente, por exigirme/motivarme a terminarla y defenderla, en este nuevo contexto de vida, que es ser madre.

A los miembros del tribunal por aceptar corregir esta tesis. A Cecilia por su rápida disposición y colaboración; a Sonia, por su profesionalismo y transmitirme optimismo y serenidad; y a Germán, por su disposición a viajar desde Argentina para compartirme su experiencia y participar presencialmente de este acto de defensa. Muchas gracias a los tres.

A todos mis compañeros de la Ubypa, porque de alguna forma han colaborado en estos años, con experimentos, con una idea, o simplemente con escucharme, que ya es bastante. En especial, a Made, por su rol de madre, consejera, justo se nos jubiló, pero la amistad y los lazos personales seguirán fuera de Pasteur.

A todo el grupo del Institut Pasteur de París, por recibirme y hacerme sentir como en casa en mis dos pasantías. En especial a Mariano, Dani y Anne Marie. Fueron meses de intenso aprendizaje y la más linda experiencia de viaje, gracias a todos.

A Germán, por toda la ayuda final sobre escritura, gráficos, tipografía de la tesis, y también por los momentos de amistad compartidos con él y su familia.

A todas las demás personas de Pasteur, por las charlas, por velar por mi seguridad (traerme y llevarme a casa), María Elena, Ceci, Vale.

Y esta tesis se desarrolla, como todo en la vida, en un contexto personal, que por suerte, fue muy lindo.

Agradecerles a Laura y Ricardo por adoptarnos, recibirnos en su casa cuando apenas nos conocíamos por zoom. Por los hermosos momentos que hemos vivido junto a ellos, por mimarme, por los cafecitos, por la comida tan rica, por los consejos.

A Andrea y toda su familia, simplemente por hacernos parte de la suya. GRACIAS!

A mis amigas más jóvenes, por recibirnos en Uruguay, gracias a ellas, emigrar fue una experiencia linda, aún en pandemia. Por toda la información de cómo encontrar trabajo, como insertarnos en esta nueva sociedad, las palabras nuevas y costumbres a aprender. Gracias Angie, Andrea, Agus.

A los amigos cubanos que hemos conocido acá y se han hecho grandes amigos, Rachel y Rogelio; Abel; Pili, Liset, Robe y Cris; Patricia, Nacho y Mar. A los más nuevos, Yaíma y Yaiko, por tanta comprensión con la jefa de la casa.

A mi familia y amigos de la vida, de Cuba, que siempre están presentes, los que están, mi mamá, mi hermano, mi tío, mi amiga/hermana Are, y los que ya no están en este momento, mis abus, Tete, torto, mi papá. A Dayle y familia. A Marlen. La familia de mi esposo!!!

Y a la familia que elegí y estoy construyendo, a mi esposo, por su amor y paciencia infinita, por alentarme y apoyarme a terminar el doctorado. Y muy en especial a mi beba, no tengo palabras para describir el amor tan grande que siento. Es, sin dudas, lo más deseado y lindo que me ha pasado en la vida.

Perdón si olvido a alguien; gracias a todas esas personas y a la vida, porque el olvido solo es reflejo de cuántas han sido.