

Informe final publicable de proyecto

Estudio de la fosfatasa micobacteriana PtpA como potencial modulador del metabolismo lipídico del macrófago

Código de proyecto ANII: FCE_1_2021_1_166706

Fecha de cierre de proyecto: 01/08/2025

VILLARINO, Andrea Elizabeth (Responsable Técnico - Científico)

GARCÍA CEDRÉS, Tania (Investigador)

QUIJANO HERRERA, Celia Lía (Investigador)

COSTÁBILE CRISTECH, Alicia (Investigador)

CARRIÓN RUNCO, Federico (Investigador)

FORRELLAD, Marina Andrea (Investigador)

GAGO, Gabriela (Investigador)

HERGATACORZIAN KEHYAIAN, VALENTINA (Investigador)

HERRERA, Fernando (Investigador)

LISA, María Natalia (Investigador)

LÓPEZ RADCECO, Andrés (Investigador)

MARGENAT ARRAMBIDE, Mariana (Investigador)

MOYNA BORTHAGARAY, Guillermo (Investigador)

BALBOA, Luciana (Investigador)

FERREIRA, Ana María (Investigador)

BETANCOUR CURUTCHET, Gabriela (Becario)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \ \

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA. LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS \ \

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE ROSARIO (IBR), SEDE CCT, ROSARIO. \ \

DEPARTAMENTO DE FÍSICA DE LA FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL (UNL) \ \

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (INTA CASTELAR) \ \

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIÓN LITORAL NORTE \ \ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) es el agente etiológico de la Tuberculosis humana; enfermedad que constituyen un importante problema de salud en Uruguay y el mundo. La fosfatasa PtpA es un factor de virulencia de esta micobacteria, introducido en los macrófagos durante la infección. Esta fosfatasa es capaz de inhibir la respuesta inmune y la apoptosis al actuar sobre proteínas eucariotas, favoreciendo la persistencia de la bacteria dentro de las células infectadas. Además nuestro grupo demostró que PtpA interacciona con proteínas humanas vinculadas al metabolismo, en especial con la proteína trifuncional (TFP-ECHA) clave en la beta-oxidación de los ácidos grasos. El rol establecido de PtpA como modulador de la inmunidad y su potencial rol como modulador del metabolismo durante la infección, la convierten en un factor de virulencia extremadamente interesante a estudiar. La presente propuesta buscó dar continuidad al trabajo del grupo profundizando en el estudio de la actividad e interacción de PtpA con la proteína humana TFP-ECHA, explorando posibles mecanismos de regulación positiva y negativa de dicha actividad. Se evaluó además el potencial rol inmuno-metabólico de PtpA en un modelo de macrófagos humanos infectados con las cepas de Mtb conteniendo o no el gen funcional de PtpA. Entender a nivel básico los mecanismos de cómo la fosfatasa PtpA micobacteriana actúa sobre la proteína humana TFP-ECHA contribuyó a explicar los cambios del perfil metabólico de los macrófagos reportados durante la infección, que posibilitan la sobrevivencia y multiplicación de la bacteria en el macrófago. A su vez, el conocimiento generado sumará al necesario para el desarrollo futuro de nuevas estrategias antituberculosas dirigidas a modular el metabolismo del hospedero y/o inhibir al factor de virulencia PtpA.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología Celular, Microbiología / Vías de señalización celular mediadas por fosfatases y quinasas

Palabras clave: *Mycobacterium* / Fosfatasa / Metabolismo /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Existen evidencias de que la fosfatasa de tirosina PtpA es un factor de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), introducido en el citosol de los macrófagos durante la infección. Allí actúa sobre proteínas eucariotas inhibiendo la eliminación de la bacteria, la apoptosis y modulando la respuesta inmune disminuyendo TNF α , IL-1 β e IL-12; acciones que favorecen la persistencia del patógeno dentro del macrófago[1-7]. Nuestro grupo demostró que PtpA interacciona con proteínas humanas vinculadas al metabolismo, en especial la subunidad alfa de la proteína trifuncional (hTFP-ECHA), clave en la beta-oxidación de los ácidos grasos; y la fosfofructoquinasa-1 (hPFK-1), principal enzima reguladora de la glucólisis[8]. El rol establecido de PtpA como modulador de la inmunidad y su potencial rol como modulador del metabolismo durante la infección, la convierten en un factor de virulencia extremadamente interesante a estudiar. Cabe señalar que PtpA, es considerado un blanco terapéutico ideal para el diseño de drogas-antituberculosas, ya que al ser secretada[1,4,9,10], evita la necesidad de que la droga atraviese la envoltura micobacteriana, barrera que explica en gran parte la resistencia de Mtb a los antibióticos[11-12]. Numerosos grupos, incluyendo el nuestro, han identificado inhibidores de PtpA[10,13-15], sin embargo estos tienen como blanco el sitio activo de PtpA, altamente conservado dentro de las PTPs[16-17]; por lo cual identificar sitios secundarios menos conservados continúa siendo un desafío. En el proyecto FCE anterior se avanzó en el estudio de la fosfatasa micobacteriana PtpA, pero quedaban objetivos y nuevas preguntas por abordar. Se demostró *in vitro* y a nivel celular, la interacción entre PtpA recombinante (rPtpA) con hTFP-ECHA inmunopurificada a partir de macrófagos. A su vez mostramos que la interacción involucra el sitio activo de PtpA y que esta desfosforila la hTFP-ECHA, identificando *in silico* el residuo de P-Tyr-271 como el posible blanco de PtpA [18-21]. Durante el nuevo FCE finalizado se logró dar continuidad al estudio, verificando experimentalmente dicho sitio y profundizando en la caracterización de la interacción y actividad entre ambas proteínas; utilizando la hTFP-ECHA recombinante o mutantes puntuales de ésta que nos permitieron abordar estudios cinéticos y estructurales en mejores condiciones que al usar hTFP-ECHA inmunopurificada. Al igual que la mayoría de las proteínas que actúan en la mitocondria, la hTFP-ECHA/B sintetizada en el citosol es translocada a dicho organelo donde cumple su función[22]. En la mitocondria la hTFP-ECHA/ECHB cumple un rol central en la beta-oxidación de ácidos grasos de cadena larga, catalizando tres de las cuatro etapas de esta vía [23]. La estructura-cristalográfica de hTFP-ECHA/B ha sido resuelta recientemente, indicando que la hélice-10 de TFP-ECHA es importante para su anclaje a la membrana interna mitocondrial y la interacción con la membrana relevante para su actividad [24]. Curiosamente la Tyr-271 de TFP-ECHA, que identificamos como potencial blanco de PtpA se localiza en dicha hélice-10, estando ambas ausentes en los ortólogos bacterianos, lo que plantea la hipótesis que cambios en el estado de fosforilación de dicha hélice podrían ser importantes en la regulación de la localización sub-celular de la hTFP-ECHA. Esto concuerda con evidencias que indican que hTFP-ECHA deja de ser detectada en la mitocondria de macrófagos infectados con la cepa virulenta de Mtb[25]. Una posibilidad

es que durante la infección PtpA sea el factor bacteriano que desfosforile la hTFP-ECHA, promoviendo así su degradación proteasomal, explicando su desaparición en la mitocondria. Esto se ve apoyado con evidencias reportadas en Phosphosite[26] que muestran numerosas modificaciones postraduccionales en hTFP-ECHA, como fosforilación y ubiquitinilación, cuyo rol se desconoce. Además, va en acuerdo con reportes que conectan a PtpA con las vías de regulación-degradación mediadas por ubiquitina[2-5], indicando que la ubiquitina actúa como un activador de PtpA frente al sustrato artificial pNPP u otros sustratos reportados (VPS33B, Jnk y p38)[2] y es capaz de interactuar con la E3 ubiquitin-ligasa TRIM27, causando una disminución de la apoptosis celular y de la respuesta inmune[3]. Por otro lado, estudios cinéticos sugieren que el sustrato fosforilado podría actuar como activador de la PtpA, uniéndose a un sitio secundario aún no descrito[27]. Nuestro grupo, verificó en el FCE en curso, la activación de PtpA por ubiquitina utilizando el sustrato artificial y avanzó en estudios in silico de los complejos ubiquitina-PtpA y PtpA-TFP-ECHA[18]. En la presente propuesta se logró ampliar los estudios, evaluando experimentalmente e in silico la formación del complejo proteico ubiquitina-PtpA-hTFP-ECHA, así como la potencial activación de la PtpA al usar la rTFP-ECHA como sustrato. La disminución reportada de hTFP-ECHA en la mitocondria es de esperar tenga consecuencias a nivel del metabolismo lipídico; reduciría el aporte energético ligado a la beta-oxidación mitocondrial y conduciría a la acumulación de ácidos grasos en el citosol, lugar donde son sintetizados antes de su translocación a la mitocondria. Esta hipótesis concuerda con el aumento observado luego de la infección con Mtb y Mb-BCG de los cuerpos lipídicos (Lipid drops, ricos en TAGs y ésteres de colesterol) asociados al fenotipo denominado macrófagos espumosos[28-29], y con el hecho que Mtb utiliza los lípidos del hospedero como principal fuente de C durante su persistencia [30-31]. Cabe destacar que poco se sabe sobre los factores bacterianos implicados en estos cambios metabólicos reportados[32-33]. El aumento de los cuerpos lipídicos en los macrófagos infectados actuaría como un mecanismo que permite restablecer cierto equilibrio, evitando la muerte del macrófago y a su vez favoreciendo la persistencia del patógeno[34]. Un mecanismo adicional podría incluir la regulación negativa por ácidos grasos de la actividad fosfatasa de PtpA, donde altas concentraciones de ácidos grasos inhibirían a PtpA al actuar sobre la hTFP-ECHA. Esto permitiría que el pool de hTFP-ECHA fosforilada aumente, la cual podría alcanzar la mitocondria, revirtiendo la inhibición de la beta-oxidación, contribuyendo a frenar el estrés debido a la infección y la apoptosis. Interesantemente, se ha reportado que ácidos grasos esenciales son capaces de inhibir in vitro a PtpA, utilizando el sustrato artificial pNPP[66]. En el FCE anterior, demostramos que el ácido oleico (OA) inhibe in vitro a PtpA al actuar sobre el pNPP (IC₅₀=90 μ M). El OA constituye el ácido graso más común a nivel celular, presente en TAGs y membranas, se ha visto asociado con el aumento de marcadores del fenotipo M2 de macrófagos [35], fenotipo que favorece la persistencia de las micobacterias. Además, el OA estimuló la oxidación completa de ácidos grasos a través de la activación de la quinasa PKA[36]. En el citosol del macrófago los ácidos grasos no se encuentran libres, se encuentran almacenados en TAGs dentro de los cuerpos lipídicos o unidos a proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs). Las FABPs participan en el mantenimiento de la homeostasis lipídica, dirigiendo el tráfico de lípidos y controlando vías inflamatorias y metabólicas[37-38], viéndose aumentada la expresión de la FABP4 durante la infección con Mb-BCG[39]. En este contexto, en la presente propuesta se buscará en avanzar en entender la inhibición de la actividad de rPtpA con OA. Los cambios metabólicos y sus consecuencias sobre las micobacterias durante la infección son variados y no siempre concuerdan, reflejando la variabilidad de situaciones que transcurren durante la infección y formación y disgregación de los granulomas[40-41]. Existen estudios donde la infección con micobacterias causa una disminución tanto de la glucólisis como del metabolismo mitocondrial[42], y en otros causa un aumento del mismo[25]. Por otro lado, numerosos trabajos describen un re-direccionamiento del metabolismo, caracterizado por una disminución del metabolismo mitocondrial y un aumento de la glucólisis y producción de lactato (efecto Warburg o glucólisis aerobia)[25,43-50]. En este caso, el factor de hipoxia HIF1-alfa juega un rol importante, activando la PFK, enzima clave de la regulación de la glucólisis, y enzima identificada por nosotros como interactor de PtpA[8]. Esto coloca a PtpA en un punto de control importante del metabolismo, relacionándola tanto con el metabolismo lipídico (al actuar sobre TFP-ECHA), como con el glucolítico (al interactuar con la PFK). Así se abordó este aspecto utilizando un modelo de infección de macrófagos con las cepas micobacterianas portando o no el gen funcional de PtpA, obtenidas en el FCE previo. Se determinó el metabolismo de los mismos mediante análisis comparativo del perfil de metabolitos, conteo de gotas lipídicas, el perfil inflamatorio, y proteómica comparativa. En resumen, entender a nivel básico los mecanismos de cómo la PtpA actúa sobre la TFP-ECHA y cómo esta actividad puede estar regulada, podría contribuir a explicar ciertos cambios del perfil metabólico de los macrófagos reportados durante la infección, aportando así a la comprensión de los mecanismos activados durante la interacción bacteria-hospedero. A su vez, el conocimiento generado podría contribuir con el desarrollo de nuevas estrategias antituberculosas dirigidas a modular el metabolismo del hospedero y/o inhibir al factor de virulencia PtpA.

Metodología/Diseño del estudio

-Los objetivo 1 y 2 se abordarán con estrategias in vitro e in silico enfocadas al estudio de la interacción, actividad y regulación de PtpA utilizando hTFP-ECHA recombinante como sustrato. Inicialmente se obtendrá el material necesario para los ensayos planteados. Los vectores con los genes de PtpA wt y los mutantes del sitio activo (PtpAC11S,

PtpAD126A) ya están disponibles en el laboratorio. Se expresarán en *Escherichia coli* BL21 (DE3) y los nuevos lotes proteicos se purificarán por cromatografía de afinidad y exclusión molecular, utilizando protocolos ya optimizados[8,19]. El gen de hTFP-ECHA ya fue clonado y su secuencia verificada (ANEXO) y en Julio/2021 se iniciarán su producción en *E.coli* Rosetta™(DE3)pLysS[55]. Mediante mutagénesis sitio dirigida se obtendrá el mutante hTFP-ECHA-Y271F y otros de interés, por ejemplo carente de la hélice-10, relevante para su actividad/localización membranar. La fosforilación se verificará por inmunodetección con un Ac anti-P-Tyr y/o por espectrometría de masa (Servicio UByPA-IPMon). La cepa donde se expresará cuenta con actividad Tyr quinasa, pero si fuera necesario se fosforilará in vitro con la quinasa JAK1 utilizando un protocolo estandarizado por el Lic. Parietti en su posgrado en curso. Si fuera necesario se evaluará su producción en sistemas de expresión eucariota. En todos los casos, se eliminará el tag de purificación, para evitar afecte los ensayos de interacción. Se evaluarán el rendimiento de purificación y pureza y la actividad específica se determinará como establecido[8,55]. Los potenciales reguladores de PtpA a evaluar (ubiquitina y ácido oleico) serán de origen comercial (SIGMA) o suministrados por colaboradores. En caso que se observe que estas moléculas afectan su actividad, se comparará su efecto, y el de otras de relevancia como lípidos nitrados[54], sobre PtpB, otra fosfatasa de tirosina secretada por las micobacterias, disponible en el grupo[19]. No se descarta la necesidad de generar nuevos mutantes, como PtpA-A140E, que afectaría el sitio descrito como importante en la interacción PtpA-ubiquitina[2], o mutantes que aporten a entender el mecanismo de interacción y/o regulación implicado.

En los ensayos de interacción entre las diferentes formas de PtpA y hTFP-ECHA recombinante generadas (en ausencia y presencia de potenciales reguladores) se utilizarán metodologías que permitan evaluar la formación de complejos proteicos como SEC analítica y la determinación de las constantes de interacción, como SPR[8], o incluso utilizando análogos fluorescentes como para los ácidos grasos[64]. Se realizarán ensayos de cristalogénesis buscando resolver la estructura de algún complejo (IBR-Rosario-Argentina). En paralelo se modelarán y realizarán estudios de dinámica molecular (UNL-Argentina) de los complejos de interés, evaluando a nivel atómico las características principales de la interacción, estabilidad y energética de ésta.

En los ensayos de actividad de PtpA se utilizará la hTFP-ECHA recombinante como sustrato, lo que permitirá realizar ensayos en condiciones de concentración E:S adecuadas. Se analizará la cinética de PtpAwt o de los mutantes de interés en presencia de diferentes concentraciones de hTFP-ECHAwat o mutantes definidos, siguiendo la actividad mediante la dosificación del fosfato liberado (Phosphate Assay Kit, ab65622, Abcam)[51]. Se determinarán los parámetros cinéticos[8] y evaluarán potenciales cambios en el gráfico de V_o vs $[S]$ al agregar ubiquitina/ácido graso, buscando identificar una posible regulación alostérica [27,65] y/o el tipo de inhibición[66]. Los ensayos de interacción y cinéticos se realizarán en triplicado, aplicando los test estadísticos adecuados para determinar la variabilidad de los resultados.

-El objetivo 3 se abordará infectando macrófagos humanos con las cepas de Mtb y Mb-BCG portando o no el gen de PtpA. Las infecciones de macrófagos derivados de cultivos primarios con la cepa virulenta de Mtb H37Rv y la cepa Mtb H37Rv carente de PtpA (generada en INTA-Castelar, FCE en curso) se realizarán en Argentina en un laboratorio BSL-3 por la Dra. L. Balboa (adjunto ASPECTOS-ETICOS)[28]. Las infecciones de macrófagos derivados de monocitos THP-1(ATCC TIB-202) con la cepa vacunal Mb-BCG (Pasteur) se realizará en un laboratorio BSL-2 de la Facultad de Ciencias-Uruguay[2,3]. La cepa de Mb-BCG carente de PtpA está siendo generada por T.García en su maestría. A diferentes tiempos post-infección(24hs,48hs,120hs) se obtendrán las muestras para los estudios metabólicos, proteómicos y de expresión. El éxito de la infección será evaluado determinando las UFCs recuperadas una vez lisados los macrófagos [67]. Los cuerpos lipídicos se visualizarán y cuantificarán gracias a la tinción de OilRed O y análisis en microscopio óptico (ORO, Sigma-Aldrich)[28]. Los triacilglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos se

separarán por cromatografía en capa delgada, siguiendo protocolos descritos[68], visualizando éstos por tinción de Cu-fosfórico, realizando un análisis de densitometría para evaluar el contenido (ImageJ). En la extracción de metabolitos extracelulares e intracelulares para análisis por RMN se aplicarán protocolos definidos por nuestro grupo[69,18]. Los datos de ¹H RMN se obtendrán en un espectrómetro Bruker/AVANCEIII/500. Los datos crudos se procesarán (MestReNova) y se realizarán análisis no dirigido que permita determinar diferencias entre las muestras, llegando a la identidad de los metabolitos de interés por espectroscopía [STOCSY; ¹H-¹³C (HSQC, HMBC)], y agregado de estándares. En los extractos proteicos se evaluará mediante inmunodetección con Ac comerciales o espectrometría de masas (Servicio IPMon) la presencia de modificaciones postraduccionales en la hTFP-ECHA (fosforilación Invitrogen #136600 o ubiquitinación ab134953), incluyéndose otras proteínas de interés (PFK, GSK3-alfa)[7,8]. El Ac-anti TFP-ECHA (ab200652) permitirá determinar cambios de localización de hTFP-ECHA evaluando fracciones subcelulares (citósol/mitocondria), por WB, o evaluando co-localización por microscopía confocal o citometría (Servicio IPMon), incluyendo a PtpA (Ac generado), u otras como FABP4 que une lípidos, USP14 asociadas al proteasoma, o TRIM27 asociada a la ubiquitinación[3,54,70]. Se obtendrán muestras de ARNm, utilizando protocolos establecidos[53] que permitan analizar la expresión de proteínas vinculadas con la degradación de ácidos de cadena larga como la hTFP-ECHA/TFP-ECHB/ACSL4, agregando otras vinculadas a la síntesis de lípidos (GPAT/AGPAT/PAP/GK/DAGK/DGAT/ACAT), la regulación del metabolismo (HIF1-alfa), y citoquinas que se sabe son moduladas por PtpA, TNFalfa/IL1beta/IL6/IL-12[2], incluyendo la IL-10 asociada al fenotipo espumoso de los macrófagos[28]. Las citoquinas que se vean moduladas se cuantificarán utilizando kit comerciales (Biolegend). Los ensayos se realizan en triplicado, aplicando el test estadístico adecuado que muestre la variabilidad de cada metodología, de manera que sea posible comparar y saber si existen diferencias entre las muestras obtenidas a partir de los macrófagos sin infectar y los macrófagos infectados

Resultados, análisis y discusión

Con respecto al Objetivo 1. Se logró profundizar en la caracterización *in silico* e *in vitro* de la interacción y actividad de la fosfatasa PtpA de Mtb con la proteína humana TFP? (hTFP-ECHA). Para ello, se obtuvo en forma recombinante a la PtpA salvaje y su mutante inactivo PtpA-C11S. Además, se obtuvo en forma recombinante a la hTFP? y al mutante en la Tyr identificada *in silico* como blanco de PtpA (hTFP-ECHA -Y271F). Mediante ensayos de resonancia plasmónica de superficie (SPR) se confirmó la interacción *in vitro* PtpA-hTFP?, demostrando que la misma involucra el sitio activo de PtpA, (KD de 0.31 µM). Se mostró mediante ensayos cinéticos que la hTFP?, tanto la inmunopurificada a partir de macrófagos como la recombinante, es sustrato de PtpA, demostrando que la p-Tyr271 de hTFP-ECHA es el blanco preferencial y específico de la fosfatasa PtpA micobacteriana. Asimismo, identificamos que la Tyr271 de hTFP-ECHA está ausente en las TFPs bacterianas homólogas, está conservada en mamíferos y se localiza en la hélice-10, descrita como relevante para su localización membranal y actividad en la mitocondria. Estos resultados se resumen en las figuras del artículo y material suplementario publicado en *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Margenat et al., 2023, doi: 10.3389/fcimb.2023.1095060).

Por último, en el marco del proyecto ECOS-Sud Francia-Uruguay obtenido recientemente junto al investigador Benjamin Selles, se logró mostrar la interacción PtpA-hTFP-ECHA en un contexto celular eucariota. La estrategia para esto fue la expresión de estas proteínas fusionadas a secuencias peptídicas que si están cerca interaccionan y dan lugar a una proteína fluorescente. Esto motivó a que la estudiante de doctorado del proyecto, Gabriela Betancour, realice una pasantía en su laboratorio en septiembre de 2025, para repetir y analizar mediante microscopía confocal este resultado. En Uruguay, evaluaremos la interacción entre la PtpA y la hTFP-ECHA en macrófagos humanos utilizando la estrategia denominada Duolink® PLA (SIGMA), que permite el estudio de interacciones proteína-proteína, incluso con proteínas endógenas. Además, logramos producir el heterotetrámero de la hTFP, lo que nos permitirá evaluar el efecto de la fosforilación en la actividad de esta enzima tan importante en la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga de las células humanas.

Con respecto al Objetivo 2. La ubiquitina fue una de las moléculas evaluadas como posible regulador de la actividad de la PtpA, ya que existe un artículo en el que se identifica esta proteína como interactor de PtpA, mostrando con ensayos, cuyos resultados son poco concluyentes, que la unión a ubiquitina activaría a PtpA (Wang et al., 2015, doi: 10.1038/ni.3096). Así, en este proyecto, se logró estudiar en profundidad las características de la interacción entre ambas proteínas mediante dinámica molecular, lo que

mostró que, si bien la ubiquitina es capaz de interaccionar con la PtpA, no lo hace con residuos específicos, ya que estos van cambiando a lo largo del tiempo. Además, no se observó un aumento de la estabilidad estructural de estas proteínas al formar el complejo. Por otro lado, en los ensayos cinéticos de actividad de PtpA, utilizando el sustrato artificial pNPP así como la hTFP-ECHA no se detectó aumento de actividad en presencia de ubiquitina. Por el contrario, al usar la hTFP-ECHA como sustrato la actividad en presencia de ubiquitina fue menor, lo que sugiere un potencial rol inhibitor de la ubiquitina. Esto último va en acuerdo con el análisis de los resultados de la dinámica molecular, que muestran que el sitio activo de PtpA en presencia de ubiquitina puede adquirir una conformación cerrada (inactiva). En su conjunto los resultados permitieron demostrar mediante evidencias sólidas que la ubiquitina interacciona con la PtpA pero no es un activador de esta en las condiciones utilizadas. De todas maneras, no se puede descartar que a nivel celular la presencia de otras modificaciones postraduccionales o la presencia de algún factor adicional pueda causar una activación de PtpA mediada por ubiquitina.

Por otro lado, se evaluó mediante acoplamiento molecular e in vitro la interacción y actividad de la fosfatasa PtpA con el ácido oleico, una molécula que al acumularse pensamos pueda actuar como un regulador negativo de la actividad de PtpA. Los resultados mostraron que, in silico, existen dos regiones en PtpA en donde el ácido oleico puede interaccionar. La región más poblada es el sitio activo de PtpA (Cys11, Asp126), en donde la cabeza polar del ácido oleico interacciona con los residuos catalíticos de la proteína PtpA, lo que podría inhibir la actividad de PtpA. En el segundo sitio de interacción, la cabeza apolar del ácido oleico interacciona con la cadena lateral de la Ser 42 de PtpA. Esto va en acuerdo con los ensayos de actividad de PtpA realizados in vitro en presencia de ácido oleico, en los que se observó una tendencia hacia la disminución de la actividad fosfatasa a medida que se aumenta la concentración de ácido oleico, siendo significativa a partir de 80 μ M de ácido oleico.

Con respecto al Objetivo 3. Se logró avanzar en la hipótesis del grupo la que sugiere que PtpA una vez en el citosol del macrófago desfosforila la hTFP-ECHA y de esta manera afecta su localización final en la mitocondria y/o actividad en la β -oxidación de ácidos grasos. Esto causaría la acumulación de ácidos grasos en las gotas lipídicas del citosol del macrófago en TAGs y ésteres de colesterol. Lípidos que se demostró sirven de fuente de energía para la bacteria durante la infección y contribuyen a su persistencia dentro de los macrófagos humanos. Los resultados de los ensayos de infección en macrófagos humanos derivados de monocitos de donantes sanos, con la cepa virulenta MtbCDC1551 y la cepa MtbCDC1551?PtpA, apoyan nuestra hipótesis. Estos resultados aún no han sido publicados pero se incluirán en el manuscrito "Unraveling Mycobacterium tuberculosis Strategies: PtpA-Mediated Modulation of Macrophage Lipid Metabolism" y se describen brevemente a continuación.

Utilizando el anticuerpo anti PtpA generado por el grupo se verificó la presencia y secreción de PtpA en la cepa MtbCDC1551 y su ausencia en la cepa MtbCDC1551?PtpA. Con estas cepas se realizaron ensayos de infección de macrófagos derivados de donantes sanos en los que se evaluó el contenido de gotas lipídicas, citoquinas y metabolitos, y se comparó con los valores obtenidos al utilizar los macrófagos sin infectar. En estos ensayos se observó que en presencia de PtpA (infección con MtbCDC1551) hay un aumento del contenido de gotas lipídicas en el citosol de los macrófagos respecto a cuando la PtpA está ausente (infección con MtbCDC1551?PtpA). Con respecto a las citoquinas, se detectó un aumento en los niveles de IL-1? y IL-6 en los macrófagos infectados con MtbCDC1551 respecto a los macrófagos control, evidenciando una clara respuesta proinflamatoria. Estos niveles disminuyeron en los macrófagos infectados con MtbCDC1551?PtpA, alcanzando valores similares al control. Esto refleja que PtpA actúa como factor de virulencia en la cepa utilizada y concuerda con lo observado para la cepa virulenta M. tuberculosis H37Rv, donde la ausencia de PtpA da lugar a un fenotipo atenuado respecto a la cepa salvaje. Con respecto a los metabolitos glucosa y lactato, los valores sugieren que tanto en los macrófagos control como infectados (MtbCDC1551 o MtbCDC1551?PtpA) la vía glucolítica no representa la vía principal de producción de energía (ATP), sugiriendo un uso preferencial del piruvato y/o aminoácidos presentes en el medio. Además, no se observa una acumulación de lactato, indicando que el poder reductor se está regenerando sin dificultad gracias a la actividad de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa.

Asimismo, se evaluó la actividad de la β -oxidación mediante determinación del consumo de oxígeno en presencia de ácido oleico como fuente principal de energía. A los macrófagos se les introdujo la PtpA-wt o el mutante inactivo PtpA-C11S por pinocitosis. En estos ensayos se utilizaron proteínas sin His-tag, lo que implicó cambiar de vector los genes de interés. Esto se logró con éxito, confirmándose la secuencia mediante secuenciación y lográndose la expresión de las proteínas recombinantes con mayores rendimientos (6-10 mg/gramo de pellet) que los obtenidos utilizando el vector anterior (1-2 mg/gramo de pellet), lo que refuerza la relevancia del cambio de vector. Los rendimientos finales luego de la etapa de SEC y concentración fueron de 1-8 mg/gramo de pellet, obteniéndose proteínas de un alto grado de pureza. En el caso de la estructura cuaternaria, la PtpA-wt y los mutantes fueron monoméricos, tal como se esperaba. Además, las proteínas recombinantes (producidas en E. coli) se pasaron por una columna de polimixina B, con el objetivo de eliminar los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos como contaminantes que puede interferir en las respuestas celulares a evaluar en los ensayos posteriores. Con estas enzimas recombinantes se repitieron con éxito los ensayos de actividad enzimática de PtpA con hTFP-ECHA, y se introdujeron dentro de los macrófagos para las evaluaciones del consumo de oxígeno en presencia de ácidos grasos como fuente principal de carbono. En este modelo se evaluó el efecto en el consumo celular de oxígeno con el agregado de etomoxir (ETO), un inhibidor del catabolismo de los lípidos que

afecta la carnitina palmitoiltransferasa I, enzima implicada en el transporte de los ácidos grasos de cadena larga hacia la mitocondria. Estos ensayos mostraron una disminución significativa de la fracción de células sensibles al ETO en el caso de las células en las que estaba presente la fosfatasa PtpA-wt, y no cuando estaba presente la fosfatasa inactiva PtpA-C11S. Este resultado sugiere que en los macrófagos que contienen la fosfatasa PtpA-wt, esta fosfatasa activa ya se encuentra afectando a la β -oxidación, posiblemente actuando sobre la hTFP-ECHA, y en consecuencia se detecta una menor fracción de células que responden al inhibidor ETO. En conclusión, los resultados obtenidos en el presente proyecto apoyan el papel de la PtpA micobacteriana como factor de virulencia capaz de modular el metabolismo lipídico de los macrófagos durante la infección.

Finalmente, los ensayos de infección con las cepas MtbCDC1551 o MtbCDC1551 Δ PtpA se repitieron utilizando macrófagos humanos derivados de la línea celular de monocitos THP-1, obteniéndose resultados diferentes, lo que refleja que los dos modelos celulares de macrófagos no son equivalentes. Esto debe ser tenido en cuenta para la interpretación de los resultados ya que los macrófagos derivados de monocitos THP-1 son utilizados ampliamente en los ensayos de infección con *M. tuberculosis*. De hecho, en los macrófagos-THP-1 detectamos que el nivel basal de gotas lipídicas es mayor que el observado en los macrófagos derivados de monocitos de pacientes. Además, el perfil metabólico también es diferente, observándose en los macrófagos-THP-1 una vía glucolítica muy activa así como altos niveles de producción de lactato. Este perfil metabólico, coincidente con el descrito para el efecto Warburg, es característico de células cancerosas como las THP-1, que son una línea de células monocíticas de leucemia humana derivadas de la sangre de un individuo con leucemia monocítica aguda. En estas células el poder reductor se regenera en gran parte durante la conversión de piruvato a lactato (fermentación láctica) y la energía (ATP) proviene principalmente de la vía glucolítica, sugiriendo una actividad disminuida de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. En este escenario, en el que se observó un alto contenido basal de gotas lipídicas en los macrófagos-THP-1, nuestro grupo no observó una modulación del contenido de gotas lipídicas asociados a la presencia o no de PtpA durante la infección (como sí se observó al utilizar los macrófagos derivados de donantes sanos). Así, la abundancia de ácidos grasos (que observamos in vitro puede inhibir a PtpA) podría desfavorecer la acción de PtpA sobre la hTFP-ECHA, ya que no es necesario promover la acumulación de lípidos, pues éstos ya están disponibles en el macrófago. Por otro lado, de estos ensayos de infección con macrófagos-THP-1 logramos realizar un análisis comparativo del proteoma, el que nos permitirá evaluar si en este escenario PtpA está actuando sobre alguno de sus otros blancos reportados. Actualmente, esta hipótesis será abordada en el marco de la beca CAP obtenida por parte de la estudiante de doctorado asociada al proyecto y el proyecto CSIC I+D recientemente obtenido.

Conclusiones y recomendaciones

El desarrollo del presente proyecto permitió caracterizar la interacción y actividad de la PtpA de *Mycobacterium tuberculosis* sobre la subunidad alfa de la proteína trifuncional mitocondrial humana (hTFP-ECHA), una enzima clave del metabolismo de los lípidos. Además se logró entender estrategias de *Mycobacterium tuberculosis* aún no reportadas que sugieren la modulación del metabolismo lipídico de los macrófagos mediada por PtpA.

Consideramos que es relevante seguir apoyando el desarrollo de esta línea de investigación, dada la necesidad mundial de acortar los tratamientos contra la Tuberculosis y hacer frente a la aparición de nuevas cepas resistentes a todos los antibióticos disponibles. Así, el conocimiento en ciencia básica generado podrá contribuir con el desarrollo de la ciencia aplicada en pos del desarrollo futuro de nuevas estrategias antituberculosas dirigidas a modular el metabolismo del hospedero y/o inhibir al factor de virulencia PtpA.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Characteristics of Mycobacterium tuberculosis PtpA interaction and activity on the alpha subunit of human mitochondrial trifunctional protein, a key enzyme of lipid metabolism	Margenat M, Betancour G, Irving V, Costábile A, García-Cedrés T, Portela MM, Carrión F, Herrera FE, Villarino A.		https://hdl.handle.net/20.500.12008/43100	Finalizado
Tesis de maestría	Estudio del papel de la fosfatasa PtpA de Mycobacterium tuberculosis en el metabolismo energético de células eucariotas THP-1	Vivian Irving		https://hdl.handle.net/20.500.12008/42122	Finalizado
Tesis de grado/monografías	Puesta en marcha de la técnica de CRISPR-dCas9i en microbacterias, focalizada en el gen de la fosfatasa de tirosina PtpA	Valentina Hergatacorzian		https://hdl.handle.net/20.500.12008/47399	Finalizado
Póster	Interacción y actividad de la fosfatasa PtpA de Mycobacterium tuberculosis con la proteína trifuncional humana, una enzima clave en la oxidación de los lípidos en la mitocondria.	Fernando Herrera; Mariana Margenat; Vivian Irving; Tania García; Gabriela Betancour; Andrea Villarino .		https://hdl.handle.net/20.500.12008/50733	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Póster	Understanding the eukaryotic pathways modulated by mycobacterial phosphatases: Mtb-PtpA interaction and activity on human TFP?, a key enzyme of host-lipid metabolism.	Fernando Herrera , Vivian Irving , Marina Margenat , Tania García , Celia Quijano , Andrea Villarino		https://hdl.handle.net/20.500.12008/50739	Finalizado
Póster	Explorando el papel de la fosfatasa micobacteriana PtpA en la modulación del metabolismo lipídico del macrófago durante la infección con Mycobacterium tuberculosis.	Gabriela Betancour, Marina Forrellad, Mariana Margenat, Alicia Costábile, María Magdalena Portela, Franco Savoretti, Mariano Maio, Joaquina Barros, , Ana María Ferreira, Luciana Balboa, Gabriela Gago, Fabiana Bigi, Andrea Villarino El trabajo recibió premio a mejor póster en categoría doctorado		https://hdl.handle.net/20.500.12008/50763	Finalizado
Póster	Estrategias para la obtención de cepas mutantes de micobacterias aplicadas a generar mutantes para el gen de la fosfatasa PtpA, reconocido factor de virulencia de Mycobacterium tuberculosis.	Hergatacorzian, Gabriela Betancour, Marina Forrellad, Vivian Irving, Valeria Silva-Álvarez, Ana María Ferreira, Mariana Margenat, Gabriela Gago, Fabiana Bigi, Andrea Villarino.		https://hdl.handle.net/20.500.12008/50761	Finalizado
Póster	Characteristics of Mycobacterium tuberculosis PtpA	Gabriela Betancour, Mariana Margenat, Vivian Irving, Alicia		https://hdl.handle.net/20.500.12008/50744	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
	interaction and activity on the alpha subunit of human mitochondrial trifunctional protein, a key enzyme of lipid metabolism.	Costábile, Tania García-Cedrés, María Magdalena Portela, Federico Carrión, Fernando Herrera, Andrea Villarino.			
Póster	Strategies of Mycobacterium tuberculosis during infection: A look at the virulence factor PtpA and its role as a modulator of macrophage lipid metabolism	Gabriela Betancour, Marina Forrellad, Luciana Balboa, Celia Quijano, Mariana Margenat, Fabiana Bigi, Andrea Villarino		https://hdl.handle.net/20.500.12008/50745	Finalizado
Póster	Functional studies of the human protein SQOR, identified as an interactor of the virulence factor PtpA of Mycobacterium tuberculosis.	Valentina Hergatacorzian, Gabriela Betancour, Mariana Margenat, Ernesto Cuevasanta, Andrea Villarino.		https://hdl.handle.net/20.500.12008/50746	Finalizado
Presentación en evento	Estrategias de Mycobacterium tuberculosis durante la infección Una mirada desde el factor de virulencia PtpA y su posible rol como modulador del metabolismo lipídico de los macrófagos	Andrea Villarino		https://www.youtube.com/watch?v=XQe76ev39pk	Finalizado
Tesis de doctorado	Estudio del potencial rol inmunometabólico	Gabriela Betancour			En proceso

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
	de la fosfatasa micobacteriana PtpA en macrófagos				
Tesis de maestría	Estudio del metabolismo y la inmunidad innata en un modelo de macrófagos infectados con Mycobacterium bovis BCG	Tania García-Cedrés			En proceso
Tesis de maestría	Estudios funcionales de la proteína humana SQOR, identificada como interactor del factor virulencia PtpA de Mycobacterium tuberculosis	Valentina Hergatacorzian			En proceso
Nota de prensa	La tuberculosis requiere de un abordaje integral	Gian Franco Laviano			Finalizado
Nota de prensa	Grupo de investigación de tuberculosis de Facultad de Ciencias apuesta a la divulgación de la incidencia de esta enfermedad	La diaria			Finalizado
Nota de prensa	Ante-el-aumento-de-la-tuberculosis-investigadoras-de-la-facultad-de-ciencias-buscan-entender-	Comunicación FCIEN			Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
	su-bacteria- para-combatirla				
Registro audiovisual	Entrevista “Los casos de Tuberculosis aumentan en Uruguay y en el mundo”	Blanca Rodriguez, Wilmar Amaral, Programa Más temprano que tarde de Radio El Espectador, en el marco del 24 de marzo Día Mundial de la Tuberculosis			Finalizado
Registro audiovisual	Tuberculosis-la- pandemia-que- no-se-ve	Gustavo Villa			Finalizado
Nota de prensa	Tuberculosis	frecuencia.abierta.7			Finalizado

Referencias bibliográficas

- [1] Bach H, Papavinasasundaram KG, Wong D, Hmama Z, Av-Gay Y.(2008) Cell Host and Microbe;3(5),316–322.doi:10.1016/j.chom.2008.03.008.
- [2] Wang J, Li BX, Ge PP, et al.(2015) Nature immunology;16(3),237-45.doi:10.1038/ni.3096.
- [3] Wang J, Teng JL, Zhao D, et al.(2016) Scientific Reports;6,1-13.doi:10.1038/srep34827.
- [4] Wang J, Ge P, Qiang L, Tian F, et al.(2017)Nature Communications, 8(1). doi:10.1038/s41467-017-00279-z.
- [5] Wang L, Wu J, Li J et al.(2020)Nature, 577(7792),682–688. doi:10.1038/s41586-019-1915-7.
- [6] Wong D, Bach H, Sun J, Hmama Z, Av-Gay Y.(2011)Proceedings of the National Academy of Sciences;108(48),19371–19376. doi:10.1073/pnas.1109201108.
- [7] Poirier, V, Bach, H, & Av-Gay, Y.(2014)Journal of Biological Chemistry;289(42),29376-29385. doi:10.1074/jbc.M114.582502.
- [8] Margenat M, Labandera AM, Gil M, Carrion F, Purificação M, Razzera G, Portela MM, Obal G, Terenzi H, Pritsch O, Durán R, Ferreira AM, Villarino A.(2015) Scientific reports;5,8819. doi:10.1038/srep08819.
- [9] Sullivan JT, Young EF, McCann JR, Braunstein M.(2012) Infection and Immunity;80(3),996–1006. doi:10.1128/IAI.05987-11.
- [10] Wong, D., Chao, J. D. and Av-Gay, Y.(2013) Trends in Microbiology;21(2),100-109. doi:10.1016/j.tim.2012.09.002.
- [11] Chiaradia L, Lefebvre C, Parra J, et al.(2017) Sci Rep;7(1):12807. doi:10.1038/s41598-017-12718-4.
- [12] Abrahams KA, Besra GS.(2020) RSC Med Chem;6,11(12):1354-1365. doi:10.1039/d0md00261e.
- [13] Mascarello A,Chiaradia LD,Vernal J, Villarino A,Guido RV,Perizzolo P,Poirier V,Wong D, MartinsPG,Nunes RJ,Yunes RA,Andricopulo AD,Av-Gay Y, Terenzi H.(2010) Bioorganic & medicinal chemistry,18(11),3783–9. doi:10.1016/j.bmc.2010.04.051.
- [14] Mascarello A, Chiaradia-Delatorre LD, Mori M, et al.(2016) Current pharmaceutical design;22(12),1561-1569. doi:10.2174/1381612822666160112130539
- [15] Silva A, Tabernero L.(2010) Future medicinal chemistry;2(8),1325–37. doi: 10.4155/fmc.10.214.
- [16] Denu JM, Stuckey JA, Saper MA & Dixon JE.(1996) Cell;87:361-4.
- [17] Madhurantakam C, Rajakumara E, Mazumdar PA, et al.(2005) J Bacteriol;187(6):2175-81. doi: 10.1128/JB.187.6.2175-2181.2005.
- [18] Informes proyecto FCE_1_2017_1_136458 entregados a la ANII (se adjuntan como ANEXO)

- [19] Margenat, M.(2016).Tesis doctorado. FCIEN,UdelaR(Uruguay). <https://hdl.handle.net/20.500.12008/17199>
- [20] Irving, V.(2016).Tesis de Grado. FCIEN,UdelaR(Uruguay).<https://hdl.handle.net/20.500.12008/8879>
- [21] Faguaga, N.(2018).Tesis de Grado.FCIEN, UdelaR(Uruguay).<https://hdl.handle.net/20.500.12008/19145>
- [22] Bykov YS, Rapaport D, Herrmann JM, Schuldiner M.(2020)*Trends Biochem Sci*;45(8):650-667. doi:10.1016/j.tibs.2020.04.001.
- [23] Eaton S, Bursby T, Middleton B, et al.(2000) *Biochem Soc Trans*;28: 177-182. doi:10.1042/bst0280177.
- [24] Xia C, Fu Z, Battaile KP, Kim JP.(2019) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*;26;116(13):6069-6074. doi:10.1073/pnas.1816317116.
- [25] Jamwal S, Midha MK, Verma HN, Basu A, Rao KV, Manivel V.(2013) *Scientific report*;3,1328. doi:10.1038/srep01328.
- [26]Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, et al.(2015) *Nucleic Acids Res*;43(Database issue):D512-20. doi:10.1093/nar/gku1267.
- [27] Stefan, A, Dal Piazz, F, Girella, A, & Hochkoeppler, A.(2020) *Biochemistry*;59(11):1137-1148. doi:10.1021/acs.biochem.0c00059
- [28] Genoula M, Marín Franco JL, Dupont M, et al.(2018)*Front Immunol*;9:459. doi:10.3389/fimmu.2018.00459
- [29] D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, et al.(2006) *J Immunol*;176(5):3087-97. doi:10.4049/jimmunol.176.5.3087.
- [30] Pandey, AK, Sassetti, CM.(2008) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A*;105(11),4376–4380. doi:10.1073/pnas.0711159105.
- [31] Daniel J, Maamar H, Deb C, Sirakova TD, Kolattukudy PE.(2011) *PLoS Pathogens*;7(6). doi: 10.1371/journal.ppat.1002093.
- [32] Singh V, Jamwal S, Jain R, et al.(2012) *Cell Host and Microbe*;12(5), 669–681. doi:10.1016/j.chom.2012.09.012.
- [33] Singh V, Kaur C, Chaudhary VK, et al.(2015) *Scientific Reports*;5:12906. doi:10.1038/srep12906.
- [34] Laval T, Chaumont L, Demangel C.(2021) *Immunol Rev*;301(1):84-97. doi:10.1111/imr.12952.
- [35] Camell C, Smith CW.(2013) *PLoS ONE*;8(9):e75147. doi:10.1371/journal.pone.0075147
- [36] Lim JH, Gerhart-Hines Z, Dominy JE, et al.(2013) *Journal of Biological Chemistry*, 288(10), 7117-7126.
- [37] Makowski L, Hotamisligil GS.(2004) *J Nutr*;134(9):2464S-2468S. doi: 10.1093/jn/134.9.2464S.
- [38] Furuhashi M, Hotamisligil GS.(2008) *Nat Rev Drug Discov*;7(6):489-503. doi: 10.1038/nrd2589.
- [39] Yu J, Ma C, Xu Y, et al.(2020) *Infect Genet Evol*;85:104552. doi:10.1016/j.meegid.2020.104552.
- [40] Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F.(2010) *Nature immunology*;10(9),943–948. doi:10.1038/ni.1781.
- [41] Howard NC, Khader SA.(2020) *Trends Microbiol*; S0966-842X(20)30103-7. doi:10.1016/j.tim.2020.04.010
- [42] Cumming BM, Addicott KW, Adamson JH, Steyn AJ.(2018) *Elife*;7:e39169. doi: 10.7554/eLife.39169.
- [43] Genoula, M; Marín Franco, J L; Maio, M; Dolotowicz, B; Ferreyra, M; Milillo, M A; Mascarau, R; Moraña, E J; Palmero, D; Matteo, M; Fuentes, F; López, B; Barrionuevo P; Neyrolles, O; Cougoule, C; Lugo-Villarino, G; Vérollet, C; Sasiain, MDC; Balboa L.(2020) *PLoS Pathog*;16(10):e1008929. doi:10.1371/journal.ppat.1008929.
- [44] Marín Franco JL, Genoula M, Balboa L. et al.(2020) *Cell Rep*;33(13):108547. doi:10.1016/j.celrep.2020.108547.
- [45] Mondino S, Vázquez CL, Cabruja M, Sala C, Cazenave-Gassiot A, Blanco FC, Wenk MR, Bigi F, Cole ST, Gramajo H, Gago G. (2020) *Front Microbiol*;11:586285. doi:10.3389/fmicb.2020.586285.
- [46] Gleeson, LE, Sheedy, FJ, Palsson-McDermott, EM, et al.(2016) *The Journal of Immunology*;196(6),2444-2449. doi:10.4049/jimmunol.1501612.
- [47] Shin JH, Yang JY, Jeon BY, et al.(2011) *J Proteome Res*;10(5):2238-47. doi:10.1021/pr101054m.
- [48] Somashekar BS, Amin AG, Rithner CD, et al.(2011) *J Proteome Res*;10(9):4186-95. doi:10.1021/pr2003352.
- [49] Somashekar BS, Amin AG, Tripathi P, et al.(2012) *J Proteome Res*;11(10):4873-84. doi: 10.1021/pr300345x.
- [50] Billig, S., Schneefeld, M., Huber, C. et al.(2017) *Sci Rep*;7,6484.
- [51] Segovia D, Haouz A, Porley D, Olivero N, Martínez M, Mariadassou M, Berois M, André-Leroux G, Villarino A.(2017) *J Mol Biol*;429(18):2816-2824. doi:10.1016/j.jmb.2017.07.017.
- [52] Wehenkel A, Bellinzoni M, Graña M, Duran R, Villarino A, Fernandez P, Andre-Leroux G, England P, Takiff H, Cerveñansky C, Cole ST, Alzari PM (2008). *Biochim Biophys Acta*;1784(1):193-202. doi:10.1016/j.bbapap.2007.08.006.
- [53] Castellano M, Silva-Álvarez V, Aversa-Marnai M, Lamas-Bervejillo M, Quartiani I, Perretta A, Villarino A, Ferreira AM.(2020) *Scientific Reports*;10(1):22162. doi:10.1038/s41598-020-79065-9.
- [54] Lamas Bervejillo M, Bonanata J, Franchini GR, et al.(2020). *Redox Biol*;29:101376. doi:10.1016/j.redox.2019.101376.
- [55] Fould B, Garlatti V, Neumann E, et al.(2010) *Biochemistry*;49(39):8608-17. doi:10.1021/bi100742w.
- [56] Muchut RJ, Calloni RD, Herrera FE, et al.(2018) *Biochimie*;154:176-186. doi: 10.1016/j.biochi.2018.09.006.
- [57] Herrera FE, Sevrain CM, Jaffrès PA, et al.(2017). *ACS Omega*;2(10):6361-6370. doi:10.1021/acsomega.7b00936.
- [58] Lázaro M, Melero R, Huet C, López-Alonso JP, Delgado S, Dodu A, Bruch EM, Abriata LA, Alzari PM, Valle M, Lisa MN (2021) *Commun Biol*;4(1):684. doi: 10.1038/s42003-021-02222-x.

- [59] Wagner T, André-Leroux G, Hindie V, Barilone N, Lisa MN, Hoos S, Raynal B, Vulliez-Le Normand B, O'Hare HM, Bellinzoni M, Alzari PM (2019) *Sci Signal*;12(580):eaav9504.
doi: 10.1126/scisignal.aav9504.
- [60] Forrellad MA, Blanco FC, Marrero Diaz de Villegas R, Vázquez CL, Yaneff A, García EA, Gutierrez MG, Durán R, Villarino A, Bigi F. (2020). *Front Microbiol*;11:570794. doi: 10.3389/fmicb.2020.570794.
- [61] Croce V, López-Radcenco A, Lapaz MI, Pianzola MJ, Moyna G, Siri MI (2021) *Front Microbiol*;12:643792. doi:10.3389/fmicb.2021.643792.
- [62] Gago G, Diacovich L, Gramajo H. (2018) *Curr Opin Microbiol*;41:36-42. doi: 10.1016/j.mib.2017.11.020.
- [63] Lara J, Diacovich L, Trajtenberg F, Larrieux N, Malchiodi EL, Fernández MM, Gago G, Gramajo H, Buschiazzi A. (2020) *Nat Commun*;11(1):3703. doi:10.1038/s41467-020-17504-x.
- [64] Silva-Álvarez V, Franchini GR, Pórfido JL, Kennedy MW, Ferreira AM, Córscico B (2015) *PLoS Negl Trop Dis* 9(3): e0003552. doi:10.1371/journal.pntd.0003552.
- [65] Einav T, Mazutis L, Phillips R. (2016) *J Phys Chem B*,120(26):6021-6037. doi:10.1021/acs.jpcb.6b01911
- [66] Savalas LRT, Furqon BRN, Asnawati D, et al. (2020) *Acta Biochim Pol*;67(2):219-223. doi: 10.18388/abp.2020_5201.
- [67] Parish T & Stoker NG. (2010) *Mycobacterium tuberculosis* protocols (Vol.54). Ed Springer Science & Business Media.
- [68] Bligh EG, Dyer WJ. (1959). *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*,37(8).
- [69] García Cedrés, T. (2019) Tesis de grado, Udelar, FCIEN (Uruguay). <https://hdl.handle.net/20.500.12008/24570>
- [70] Finley, D. (2009). *Annual Review of Biochemistry*,78:477. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607

Licenciamiento

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

