

# **Identificación de interactores *in vivo* de la proteína FhaA de *Mycobacterium tuberculosis***

**Estudiante: Bernardina Rivera Soto**

**Director de Tesis: Dra. Rosario Durán**

**Co-director de Tesis: Dr. Carlos Batthyany**

**Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas**

**Institut Pasteur de Montevideo**

**Setiembre 2018**

---

## INDICE GENERAL

	Pág.
<b>1. RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCION</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Tuberculosis: Prioridad global para la investigación y desarrollo</b>	
<b>2.2. Patogénesis</b>	
<b>2.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	
<b>2.4. Envoltura celular de <i>M. tuberculosis</i></b>	
<b>2.5. Elongación y división celular en micobacterias</b>	
<b>2.6. Quinasas de proteínas en Serinas y Treoninas en <i>M.tuberculosis</i></b>	
<b>2.7. PknG como factor de virulencia</b>	
<b>2.8. Interactoma <i>in vitro</i> de PknG</b>	
<b>2.9. Proteína FhaA de <i>M.tuberculosis</i></b>	
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Objetivo general</b>	
<b>3.2. Objetivos específicos</b>	
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Mapeo de los sitios de fosforilación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de FhaA</b>	
<b>4.2. Cepas y Mantenimiento de las mismas</b>	
<b>4.3. Preparación de los cultivos</b>	
<b>4.4. Curvas de crecimiento</b>	
<b>4.5. Formación de biofilms</b>	
<b>4.6. Crioscopia electrónica de transmisión</b>	
<b>4.7. Microscopia electrónica de transmisión</b>	
<b>4.8. Extracción de proteínas de las cepas FhaA y control: Optimización del protocolo</b>	
<b>4.9. Determinación de la concentración de proteínas totales</b>	
<b>4.10. Determinación del proteoma total de la cepa FhaA</b>	
<b>4.11. Identificación de interactores <i>in vivo</i> de FhaA</b>	
<b>4.11.1. Purificación por afinidad sin entrecruzamiento</b>	
<b>4.11.2. Optimización del protocolo de entrecruzamiento con</b>	

---

formaldehído.	
4.11.3. Western Blot	
4.11.4. Interactoma de FhaA utilizando entrecruzamiento <i>in vivo</i>	
4.11.5. Análisis bioinformático de los datos	
4.12. Expresión de una forma truncada de CwsA	
4.13. Experimentos de Resonancia Plasmónica de Superficie.	
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>49</b>
5.1. FhaA es un sustrato de PknG	
5.2 Caracterización fenotípica y proteómica de la cepa que sobre expresa FhaA.	
5.3. Interactoma de FhaA	
5.4. CwsA es un interactor directo de FhaA	
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>79</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>89</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>104</b>
ANEXO 1: Proteoma de FhaA- Proteínas diferenciales	
ANEXO II: Interactoma de FhaA sin entrecruzamiento	
<b>9. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>111</b>

---

## 1. RESUMEN

*Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de la tuberculosis, se sitúa entre las diez principales causas de muerte a nivel mundial de acuerdo a reportes de la Organización Mundial de la Salud. La capacidad de este microorganismo de sobrevivir dentro de los macrófagos del hospedero, inhibiendo la maduración fago-lisosomal, representa un elemento crucial en su patogenicidad. En este sentido, PknG, una quinasa de proteínas en Serinas y Treoninas de *M. tuberculosis*, juega un rol preponderante como factor de virulencia, facilitando la sobrevivencia de la bacteria dentro del hospedero por mecanismos aun no comprendidos. Con el fin de identificar mediadores en la vía de señalización de PknG, llevamos a cabo estudios interactómicos que nos permitieron identificar un nuevo interactor directo de esta quinasa: la proteína FhaA, lo que constituyó el punto de partida del presente trabajo. Si bien la función de esta proteína es aún poco conocida, se postula que regula la síntesis de peptidoglicano a través de su interacción con una proteína de membrana clave de ese proceso, la proteína Mvin. Estructuralmente FhaA posee una organización de dominios que sugiere un papel como proteína de andamiaje, capaz de reclutar mediadores y dirigir el ensamblado de complejos multi-proteicos de señalización. Por tanto, en este trabajo nos propusimos caracterizar el interactoma de FhaA *in vivo*. Para ello utilizamos una estrategia experimental que combina la sobre-expresión de esta proteína con una etiqueta en *Mycobacterium smegmatis*, con el entrecruzamiento químico *in vivo*, la purificación por afinidad y el análisis por espectrometría de masa. Los resultados obtenidos nos permitieron verificar que FhaA es un sustrato de PknG e identificar un conjunto de proteínas que representan interactores directos o indirectos de FhaA *in vivo*. La recuperación de Mvin como parte del interactoma de FhaA nos permitió validar la estrategia experimental. Las proteínas identificadas indican que FhaA participa principalmente en tres procesos: la síntesis de componentes de la envoltura celular, la división celular, y procesos redox. Por último, validamos la interacción directa entre FhaA y uno de los nuevos interactores reportados en este trabajo: la proteína CwsA que cumple un rol clave en la división celular. Estos resultados constituyeron una primera aproximación para la identificación de mediadores en las vías de señalización donde participa FhaA y permitieron abrir nuevas interrogantes que aseguran futuros trabajos en esta área.

---

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1. Tuberculosis: Prioridad global para la investigación y desarrollo.

*Mycobacterium tuberculosis* y el hombre han coexistido con la humanidad durante milenios sin poder ser erradicada, y representa un importante problema de salud global en la actualidad. Múltiples factores asociados a la pobreza, el aumento de enfermedades típicamente inmunodepresoras tales como el VIH, la aparición de cepas resistentes a una amplia gama de antibióticos, la carencia de una vacuna totalmente efectiva, y el estancamiento en la innovación de nuevos tratamientos, contribuyen a su persistencia aún hoy en la población.

La tuberculosis se define como una enfermedad infectocontagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Este bacilo Gram positivo es capaz de generar tanto una infección activa como una infección asintomática y latente; solo el 7% de la población que enfrenta a la bacteria desarrolla la enfermedad de manera inmediata (Global TB control report 2008. WHO, Martino, A., 2008).

Actualmente existen herramientas preventivas contra la enfermedad, tales como la vacuna BCG que presenta una alta efectividad contra las formas graves de tuberculosis, pero no evita en todos los casos la infección primaria. Por otra parte, si bien existen terapias antimicobacterianas, las drogas actuales resultan también parcialmente efectivas debido a la tendencia de *M. tuberculosis* de desarrollar resistencia. Un factor importante que contribuye a los mecanismos de resistencia es la estructura inusual de la envoltura celular, altamente impermeable (Jarlier, V., Nikaido, H., 1994).

Con respecto a la enfermedad, una de las características más importantes es que puede presentarse sin sintomatología alguna, lo que evita una pronta detección de la misma. Esto se debe a que la bacteria puede permanecer de forma latente durante varios años y en cualquier momento este estado puede revertir y reactivar a la sintomatología característica de la tuberculosis activa (Hett, E.C. and Rubin, E.J., 2008), provocando la muerte rápida del individuo infectado en ausencia de un tratamiento efectivo (Tuberculosis, Datos y Cifras 2018, WHO).

La tuberculosis se posiciona como la novena causa de muerte en el mundo y es la causa principal de muerte por un único agente infeccioso, encontrándose por encima del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En 2016, se estimaron 1,3 millones de muertes

---

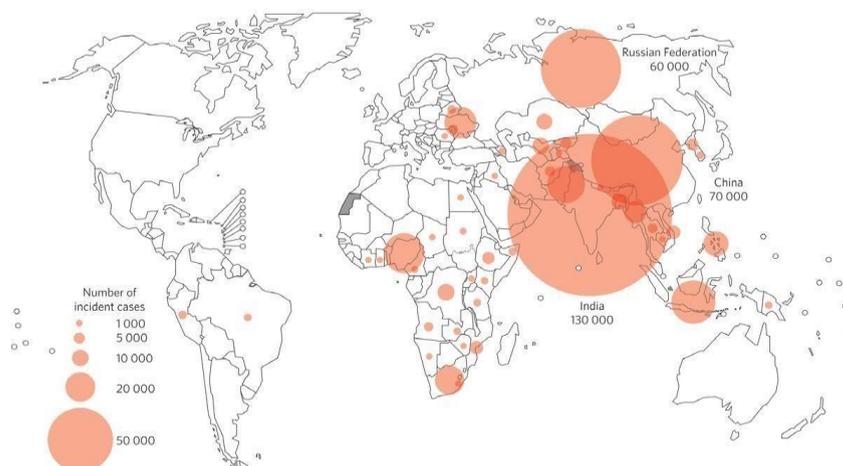
por tuberculosis entre personas VIH negativas y un adicional de 374.000 muertes entre

---

personas VIH positivas. Estas cifras representan un 16 % de la población mundial (Tuberculosis Global Report 2017, WHO). Por un largo período la tuberculosis fue clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad desatendida, situación que se revertiría tiempo después.

Teniendo en cuenta la creciente incidencia de cepas multirresistentes y la falta de nuevas drogas para el tratamiento de la enfermedad, en el año 2015 la OMS estimó que para el año 2030 las muertes por tuberculosis provocarían más muertes que el cáncer. En base a estas estimaciones, la tuberculosis se consideró como una emergencia de Salud Pública. Fue así que en dicho año las Naciones Unidas crearon el programa “Sustainable Development Goals (SDGs) for 2030” dentro del cual se encuentra enmarcada la denominada “End TB Strategy” de la Organización Mundial para la Salud y se definió a la tuberculosis como una prioridad global para la investigación y desarrollo.

En la **Figura 2.1** se muestran datos actuales de la incidencia de casos de tuberculosis multirresistente (Tuberculosis Global Report 2017, WHO).



**Figura 2.1. Incidencia estimada de la Tuberculosis multirresistente según el “Tuberculosis Report, 2017” de la Organización Mundial de la Salud.**

Brevemente la “End TB Strategy” se basa principalmente en tres pilares: el cuidado integrado del paciente para el tratamiento y prevención de la tuberculosis; la implementación de sistemas y políticas de salud que brinden un mayor apoyo y sean más audaces; y por último en la intensificación de la investigación e innovación para permitir el desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces (**Figura 2.2.**).



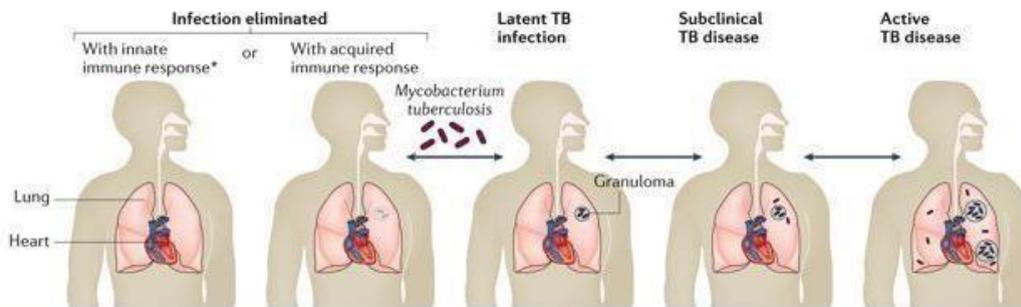
**Figura 2.2. Pilares de la denominada “End TB Strategy” enmarcada dentro del programa “Sustainable Development Goals (SDGs) for 2030” de la Organización Mundial de la Salud.** La intensificación e innovación en el campo de la investigación se presenta como uno de los pilares fundamentales en esta estrategia para combatir la tuberculosis. (Extraído de Tuberculosis Global Report 2017, WHO).

Los tratamientos actuales contra esta enfermedad se caracterizan por administrarse durante largos períodos lo que favorece el desarrollo de mecanismos de multirresistencia desconocidos, comprometiendo su eficacia a largo plazo. Actualmente existe poco conocimiento respecto al estado fisiológico de la bacteria, su adaptación al hospedero, su capacidad de supervivencia en el estado de latencia y los diferentes mecanismos y formas por los cuales revierte del mismo. Todos estos eventos garantizan el éxito de este patógeno y representan por tanto importantes nichos de investigación.

## 2.2. Patogénesis.

La tuberculosis es una enfermedad altamente contagiosa que se transmite principalmente a través de la inhalación del microorganismo presente en aerosoles producidos por hospederos infectados con el bacilo al toser, estornudar o hablar. Si bien la dosis infecciosa es de 1-200 bacilos, cada gota de aerosol puede contener en promedio entre 1 y 400 bacilos lo que lleva a un contagio seguro de la infección al existir contacto con el enfermo. El número de bacilos presentes en el aerosol, así como su grado de virulencia influyen en la transmisión de la enfermedad (Knechel, N.A., 2009).

Una vez ocurrida la inhalación de las bacterias, el hospedero puede desarrollar una infección primaria de manera inmediata en el pulmón (la cual puede o no ser controlada y erradicada por la acción del Sistema Inmune) o puede no darse esta infección inicial y la enfermedad permanece de forma latente dentro del hospedero (Knechel, N.A., 2009,



**Figura 2.3. Infección por *Mycobacterium tuberculosis* (modificada de Pai, M. et al, 2016).** La transmisión del bacilo tiene lugar a partir de la inhalación por parte de un individuo sano, de aerosoles infecciosos provenientes de un individuo infectado. De esta manera los bacilos ingresan por boca o conductos nasales dirigiéndose tanto por tracto respiratorio superior y bronquios hasta llegar a los alvéolos pulmonares. La infección puede ser controlada por el Sistema Inmune, producir una enfermedad activa o permanecer de forma latente hasta su posteriorreactivación.

En el caso de la infección que se desarrolla de manera activa, luego de la inhalación los bacilos viajan hacia los pulmones y en los alvéolos son reconocidos por el Sistema Inmune de hospederos inmunocompetentes como elementos extraños por diferentes receptores que se encuentran en la membrana de los macrófagos residentes para luego ser fagocitados por éstos. (Herrera-Barrios, M.T. et al, 2005, Knechel, N.A., 2009, Svenson, S., et al, 2010). Componentes de la envoltura celular de la micobacteria tales como los Lipoarabinomananos (LAM), los ácidos micólicos, el peptidoglicano y los arabinogalactanos, provocan el reconocimiento del bacilo por los macrófagos, activando la respuesta inmune innata (López, M., et al, 2003).

Trabajos anteriores proponen que el destino dentro del macrófago se ve directamente afectado por el tipo de receptor por el cual fue reconocida la micobacteria (Herrera-Barrios, M.T. et al, 2005). Por otra parte, otras células del Sistema Inmune pueden también fagocitar a la micobacteria, encontrándose en este grupo por ejemplo células dendríticas, neutrófilos y monocitos (Das, B. et al, 2013, Ernst, J. D., 2012).

Debido a que *M. tuberculosis* puede ser fagocitada por diferentes tipos celulares y además dentro de un mismo tipo celular puede ser reconocido por diferentes tipos de receptores, la ubicación de la micobacteria dentro de la célula fagocítica es variable. Esto tiene una incidencia directa en la respuesta inflamatoria y su intensidad, lo que afecta también directamente a la capacidad de eliminación del patógeno (Via, L. E. et al., 2008; Mattila, J. T. et al., 2013).

---

En el caso de ser fagocitada por un macrófago, la micobacteria, será en general incluida dentro de una vacuola endocítica propia del macrófago denominada fagosoma. Si el proceso de maduración fagosomal ocurre de la manera correcta, el fagosoma se fusionará a un lisosoma de manera que el patógeno se enfrentará a condiciones hostiles para su sobrevivencia tales como pH ácido, la presencia de especies reactivas del oxígeno, enzimas lisosomales y péptidos con propiedades tóxicas (Smith, I.; 2003). Toda esta maquinaria tiene como objetivo la destrucción final del patógeno, la cual dará lugar a la obtención de nuevos motivos antigénicos que serán utilizados en el proceso de presentación de antígenos por las moléculas del Sistema de Histocompatibilidad tipo I y II de manera de dar lugar a la activación de la respuesta adaptativa (Schluger, N.W., 2001).

Inmediatamente luego de la fagocitosis, una respuesta pro-inflamatoria local es llevada adelante en torno a la célula fagocítica, lo que desencadenará el reclutamiento de otros elementos del Sistema Inmune, tales como monocitos y linfocitos. Este “complejo multicelular” ensamblado formará una lesión primaria que gradualmente se transformará en lo que se denomina “granuloma” (Ernst, J. D., 2012, Kieser, K.J., Rubin, E.J., 2014). La principal función de esta estructura consiste en evitar la diseminación de la infección a otras regiones pulmonares u otros órganos, concentrando la respuesta inmune únicamente en el sitio de la infección.

La intensidad y eficacia de la respuesta inmune del hospedero determinarán si el patógeno es completamente eliminado o si la infección evoluciona a la etapa siguiente. Si el resultado es una respuesta inmune efectiva, la lesión primaria sanará con el tiempo dejando una marca de tejido fibroso y calcificado.

Como se explicó anteriormente *M. tuberculosis* es capaz de adaptarse al ambiente interno del macrófago y permanecer también en estado de latencia hasta reactivarse en una condición de inmunodepresión. Este estado se caracteriza por carecer de la sintomatología típica de la enfermedad, y el paciente en esta etapa no es capaz de contagiar la enfermedad (Smith, I., 2003). Tanto en el caso de una reactivación, al igual que en una enfermedad inicial no controlada, el centro del granuloma se vuelve un hábitat perfecto para la replicación descontrolada de la micobacteria. Este fenómeno es el resultado directo de un proceso de adaptativo de la micobacteria al ambiente del hospedero. En particular los procesos de elongación celular y división durante la infección, los cuales producen heterogeneidad y continua remodelación de la estructura de la envoltura celular de la micobacteria, son parcialmente responsables de esta capacidad de adaptación (Kieser, K.J., Rubin, E.J., 2014)

---

Todos los cambios generados por la micobacteria promueven la inhibición de la acción del Sistema Inmune o la re-orientación de su respuesta debido a la interferencia con la maquinaria de señalización celular del propio hospedero. Como resultado los bacilos logran escapar del granuloma y se diseminan en el pulmón (Tuberculosis pulmonar activa), y por otra parte se da la presencia de bacilos extracelulares lo que implica una potencial infección en otros tejidos vía linfática y sanguínea (Tuberculosis extrapulmonar) en conjunto con una mayor probabilidad de contagio a través de aerosoles. En este punto la micobacteria garantiza su diseminación intra e inter-hospedero

En definitiva, el resultado de la infección con *M. tuberculosis* dependerá directamente de la interacción dinámica y compleja entre el Sistema Inmune del hospedero, las propiedades del patógeno y su habilidad para adaptarse, además de otros factores tales como la genética del hospedero, la edad, estado nutricional, hábitos tales como el consumo de alcohol o drogas, presencia de otras infecciones y estados de inmunosupresión como el VIH (Svenson, S., et al, 2010).

### **2.3. *Mycobacterium tuberculosis*.**

A finales de 1800 Robert Koch identificó a *M. tuberculosis* como el agente causal de la tuberculosis, mediante el aislamiento y cultivo del microorganismo a partir de muestras de pacientes con tuberculosis (Fenton, MJ. et al, 1996). Este microorganismo se define como un bacilo inmóvil, aerobio facultativo, de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud, que si bien se clasifica como una bacteria Gram positiva, comparte algunas características con bacterias Gram negativas. En el microscopio se detectan con un método sencillo de tinción (tinción de Ziehl-Neelsen) que permite la identificación debido a su capacidad de ser ácido alcohol resistentes.

Con respecto a la velocidad de crecimiento, se caracteriza por ser una bacteria de crecimiento lento, la cual necesita entre 20 y 22 hs para replicarse. Por dicho motivo la obtención de cultivos para su estudio posterior demora entre 4 y 6 semanas (Cole, S.T. et al, 1998) lo que dificulta en muchos casos la obtención de la bacteria aislada. Además, necesita de medios especiales para su crecimiento, que en general son suplementados para lograr el crecimiento óptimo de la micobacteria. La temperatura recomendada de crecimiento es de 37°C en un rango de pH de 7.0 a 7.2. Las micobacterias tienden a presentar un crecimiento en forma de agregados denominados “clumps”, siendo también

---

comunes los crecimientos en filamentos o ramificaciones (Brambilla, C., et al, 2016). Una de las características más distintivas de las micobacterias es la estructura y composición de su envoltura celular, siendo los componentes de la pared celular los principales factores de virulencia de *M. tuberculosis* y hoy en día unos de los más caracterizados (Niederweis, M., et al, 2010).

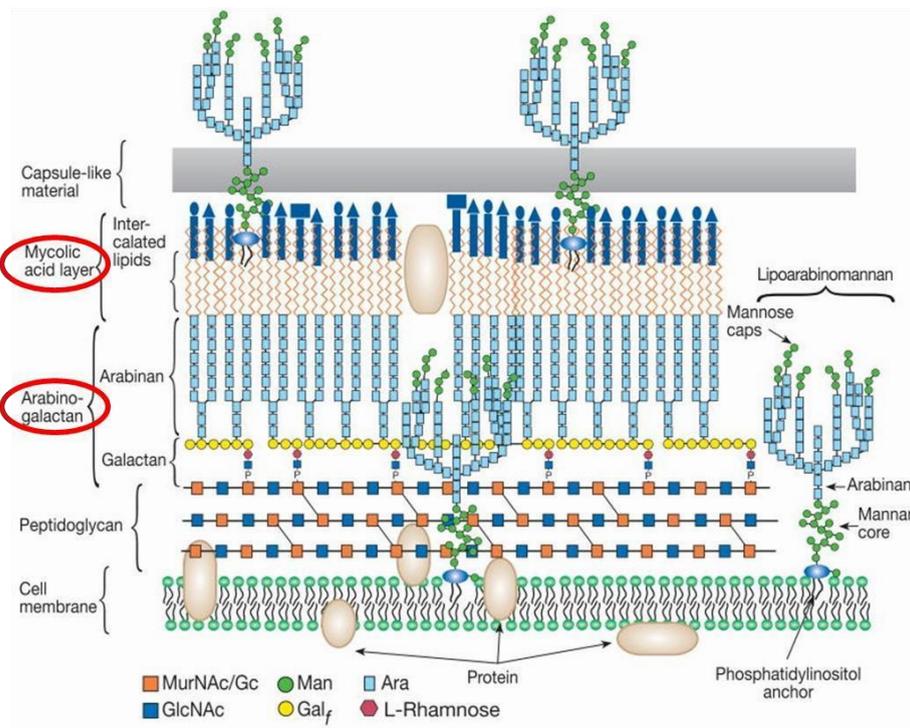
El alto contenido de lípidos es característico de estas bacterias y se vincula con la tendencia a la formación de los agregados antes descritos y la baja permeabilidad de la envoltura celular (Brennan, P.J., Crick, D.C., 2007, Daffé, M., 2008).

#### **2.4. Envoltura celular de *M. tuberculosis*.**

La envoltura de *M. tuberculosis* representa una interfase vital entre la bacteria y el hospedero, que cumple un rol importante durante el proceso de infección y el desarrollo de la enfermedad. En particular esta envoltura provee forma a la micobacteria, y actúa como una barrera impermeable altamente eficiente que regula la transferencia de sustancias fuera y dentro de la bacteria. En este sentido, presenta un rol protector contribuyendo a la resistencia intrínseca a drogas. Por otra parte, posee un rol fundamental en la modulación de la respuesta del Sistema Inmune del hospedero (Draper, P., Daffé, M., 2005, Hett, E.C., Rubin, E.J., 2008, Niederweis, M., et al, 2010).

La robustez e impermeabilidad de la envoltura celular se basa principalmente en sus componentes lipídicos y glucídicos cuya estructura química es característica de la especie *Mycobacterium* (Brennan, P.J., Nikaido, H., 1995, Daffé, M., 2008).

La complejidad de la envoltura celular ha llevado a que *M. tuberculosis* requiera de mecanismos especializados para llevar a cabo procesos tales como la división celular. Estructuralmente la envoltura celular se encuentra compuesta por la membrana celular (denominada también membrana interna), la pared celular (compuesta por ácidos micólicos, arabinogalactanos y péptidoglicano) y la cápsula (Brennan, P.J., Crick, D.C., 2007, Hett, E.C., Rubin, E.J., 2008, Niederweis, M., et al, 2010, Jankute, M., et al, 2015) **(Figura 2.4).**



**Figura 2.4. Esquema de la envoltura de *M. tuberculosis*** (Imagen tomada de Donohue-Rolfe, A., 2013). Se observan los diferentes componentes la cápsula, pared celular y membrana celular.

A continuación, se describirán las características principales de la cápsula y membrana celular para luego profundizar en la pared celular y su biosíntesis.

### **Cápsula**

La cápsula, representa la capa externa de la envoltura celular de la micobacteria y constituye la interfase entre la bacteria y el medio ambiente. Su función principal es la de proteger a la micobacteria contra múltiples factores externos (Kaur, D., et al, 2009). Durante la infección esta estructura interactúa directamente con los elementos de la respuesta inmune lo que le otorga esencial relevancia en el sistema hospedero-patógeno (Warwick J.B., et al, 1994). Si bien sus características y composición varían entre diferentes especies y cepas de micobacterias, estudios de inmuno-citoquímica (Ortalo-Magné, A., et al, 1995, Harth, G., et al, 1996), citometría (Ozanne, V., et al, 1996) y el análisis químico de componentes aislados de cultivos *in vitro* de *M. tuberculosis* tratados con perlas de vidrio y Tween-80 (Ortalo-Magné, A. et al, 1996, Raynaud, C., et al, 1998) han permitido determinar algunos de los componentes capsulares. En particular los resultados obtenidos han demostrado que la cápsula de *M. tuberculosis* se encuentra

---

compuesta principalmente de proteínas, polisacáridos y pequeñas cantidades de lípidos (Ortalo-Magné, A., et al,1995).

Los principales polisacáridos capsulares consisten en  $\alpha$ -D-glucano, D-arabino-D-manano y D-manano (Ortalo-Magné, A., et al,1995). En particular el  $\alpha$ -D-glucano representa el 80% de los polisacáridos presentes, mientras que el heteropolisacárido D-arabino-D-manano, le sigue en cantidad. Este último posee una estructura similar a la del lipoarabinomanano (Chatterjee, D., et al, 1992), componente anclado a la membrana plasmática que puede estar además presente en bajas cantidades o ausente en la cápsula (Ortalo-Magné, A., et al,1996).

### ***Membrana celular***

La membrana celular se encuentra compuesta principalmente de fosfolípidos asociados entre sí formando una bicapa lipídica con proteínas embebidas en su estructura, las cuales participan activamente en el transporte de aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos (Brennan, P.J., Nikaido, H., 1995) (**Figura 2.4.**). Esta descripción coincide con las características generales desde el punto de vista biológico y bioquímico de membranas celulares presentes en otros microorganismos.

Los fosfolípidos típicos que conforman la bicapa lipídica son la cardiolipina, mioinositol-fosfato (o fosfatidil-mio-inositol (PI)) y la fosfatidiletanolamina (Bansal-Mutalik, R., et al, 2014).

Además, se encuentran diferentes formas altamente glicosiladas y aciladas del fosfatidil-mio-inositol (PI) (denominadas fosfatidil-mio-inositol manósidos: PIMs). Estructuralmente el fosfatidil-mio-inositol manosa (PIM) se encuentra constituido por una unidad de fosfatidil-mio-inositol (PI), de uno a seis residuos de  $\alpha$ -D-manopiranosilo (Manp) y hasta cuatro cadenas de acilo. En particular, las formas fosfatidil-mio-inositol dimanósidos, tri y tetra acilados ( $Ac_1PIM_2$  y  $Ac_2PIM_2$ ), fosfatidil-mio-inositol tetramanósidos tri y tetra acilados ( $Ac_1PIM_4$  y  $Ac_2PIM_4$ ) y fosfatidil-mio-inositol hexamanósidos tri y tetra acilados ( $Ac_1PIM_6$  y  $Ac_2PIM_6$ ) representan las especies más abundantes (Jankute, M., et al, 2015) (**Figura 2.5.**).

Si bien la mecánica de ensamblaje y exportación de los fosfatidil-mio-inositol manósidos (PIMs) no se comprende totalmente en la actualidad, se describe que los primeros pasos de esa vía ocurren sobre todo en la cara citoplasmática de la membrana plasmática, mientras que los pasos siguientes se llevan a cabo sobre todo en el periplasma (Bansal-Mutalik, R., Nikaido, H., 2014). El proceso comienza con la transferencia de un único

---

residuo de  $\alpha$ -D-manopiranosilo (Manp) a la posición 2 del anillo de fosfatidili-mioinositol (PI) obteniéndose PIM1 ( $Ac_1/Ac_2$ ) (**Figura 2.5.**). Luego, la glicosiltransferasa PimB es la responsable de la adición del segundo residuo de Manp en la posición 6 del anillo de PI. Posteriormente PimC y PimD catalizan la adición de más residuos de Manp, al extremo no reducido de PIM2( $Ac_1/Ac_2$ ), para generar PIM3( $Ac_1/Ac_2$ ) y PIM4 ( $Ac_1/Ac_2$ ) (Kremer L., et al, 2002). La cadena comienza entonces su ramificación a partir de unidades de poliprenil-fosfomanosa (PPM) donadas por diferentes proteínas tales como la proteína Ppm1 (Rv2051c), hasta llegar a la formación de PIM6 ( $Ac_1/Ac_2$ ) o la obtención de estructuras maduras de lipomananos (LM) y lipoarabinomananos (LAM), otros componentes importantes de la envoltura celular (Gurcha, S.S., et al, 2002) (**Figura 2.5.**). En la biosíntesis de PIM6( $Ac_1/Ac_2$ ), participan enzimas como PimE, que cataliza la adición de un residuo de Manp a PIM4 ( $Ac_1/Ac_2$ ), y una segunda glicosil-transferasa PPM dependiente no caracterizada es la responsable de la segunda adición de otro residuo de Manp (Berg, S., et al, 2007).

Por otra parte, en la elongación de la cadena desde PIM4 ( $Ac_1/Ac_2$ ) hasta la obtención de estructuras maduras de LM y LAM, ocurrirá la transferencia de varios residuos de Manp en ambos extremos de la cadena en elongación llevados a cabo por diferentes proteínas, MptB (Rv1459c): elongación del extremo proximal; MptA (Rv2174): elongación del extremo distal del “core” de manano del LM; y MptC (Rv2181): ramificación de la cadena en ambos lados (Kaur D, et al, 2007; Mishra, A.K., 2011) (**Figura 2.5.**).

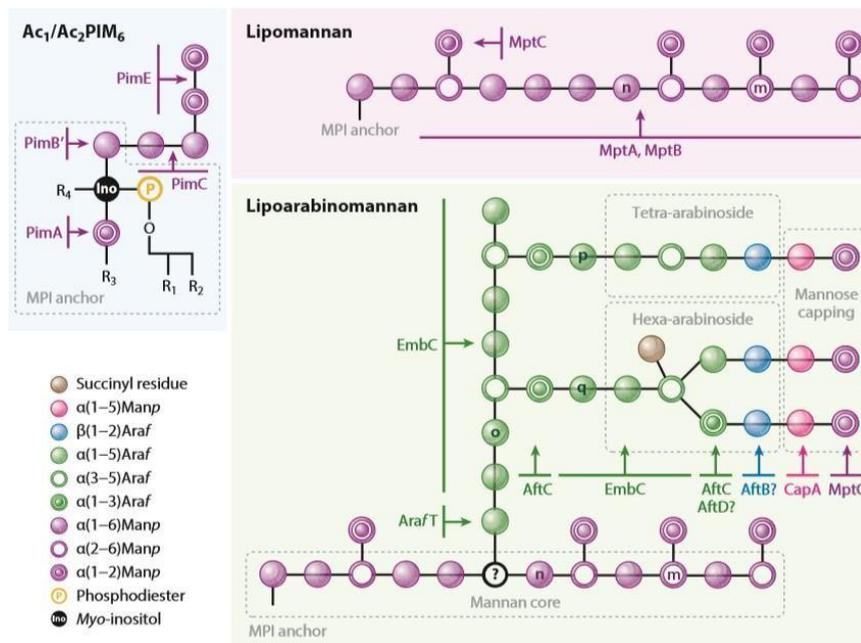
LM y LAM son característicos de las micobacterias y cumplen también un rol principal en la interacción hospedero-patógeno, al igual que los elementos descritos en la cápsula (Gilleron, M., et al, 2008, Ortalo-Magné, A., et al,1996). Ambos se encuentran conformados por una cadena que contiene aproximadamente entre 21 y 34 residuos de  $\alpha$ -D-manopiranosilo (Manp) con enlaces tipo  $\alpha(1-6)$ , y entre 5 y 10 residuos de Manp con enlaces tipo  $\alpha(1-2)$  dispuestos a lo largo de su estructura (Chatterjee D., et al, 1992) (**Figura 2.5.**).

El largo de la cadena principal de mananos así como el grado de ramificación que ocurre en el lipomanano se encuentra estrechamente relacionada con cada especie de *Mycobacterium* (Jankute, M., et al, 2015). La estructura no lineal de estos compuestos, es el resultado de la unión de residuos de manosa con enlaces  $\alpha(1-6)$  a los cuales se les añaden más residuos con enlaces tipo  $\alpha(1-2)$ .

La posterior glicosilación de la estructura del lipomanano resulta en lo que se denomina lipoarabinomanano, el cual posee entre 55 y 72 residuos de arabinosa que se encuentran en la forma de anillos de furanosa (furA) y que se enlazan de forma no lineal a la cadena de mananos por la acción de la proteína EmbC (Rv3793). Luego tiene lugar la ramificación de la cadena por la acción de la enzima AftC. (Zhang, N., et al, 2003, Birch, H.L., et al, 2008). Esta síntesis finaliza al igual que en el caso de los arabinogalactanos por la acción de AftB (Rv3805c) (Seidel, M., et al, 2007).

En particular para el caso de *M. tuberculosis*, en el extremo distal del lipoarabinomanano se encuentran una serie de residuos de  $\alpha$ -D-manopiranosilo (Manp) adicionados por la enzima CapA, que marcan el fin de esa extensión de residuos de azúcar (“motivo cap”) (**Figura 2.5.**) Dichos motivos son especie específicos, mientras que *M. tuberculosis* expone los residuos de manosa la micobacteria no patógena *M. smegmatis* posee residuos de fosfatidil-mio-inositol (PI) al final de sus estructuras de lipoarabinomananos (Chatterjee, D. et al, 1992).

En la **Figura 2.5.** se resumen también todas las enzimas vinculadas a la síntesis de las estructuras antes nombradas y se realiza una descripción en el pie de figura de dicho proceso.



---

**Figura 2.5. Estructura y síntesis del fosfatidil-mio-inositol hexamanosa tri o tetra acilado, lipomananos y lipoarabinomananos. (Imagen tomada de Jankute, M., et al., 2015).** **Fosfatidil-mio-inositol hexamanosa:** PIM6 está compuesto por un anillo mio-inositol al cual se le unen grupos Manp, por la acción de diferentes glicosiltransferasas (PimA y PimE, glicosiltransferasas  $\alpha(1-2)$ , PimB y PimD glicosiltransferasas  $\alpha(1-6)$ ). Los grupos R en la figura representan los posibles grupos acilo que pueden unirse a la estructura. Los pasos de acilación comienzan con la acilación de PIM1 ya sea antes o después de la adición del segundo residuo de manosa. Se observa en la estructura de este subcomponente un “core” común que actúa como base para la formación de dicho glicofosfolípido y también para las formas tetra y hexamanósidas (MPI). Dicho “core” actúa además como precursor en la formación de los lipopolisacáridos fundamentales LM y LAM. **Lipomanano y Lipoarabinomananos.** La cadena PIM4 ( $Ac_1/Ac_2$ ) se elonga por adición de residuos de Manp en ambos extremos hasta la obtención de estructuras maduras de LM. La transición de LM a LAM es el resultado de la adición de unidades de arabinosa y la posterior ramificación de esta cadena.

### ***Pared celular***

La pared celular se encuentra constituida por peptidoglicano, el cual está unido covalentemente a estructuras de arabinogalactanos, esterificadas éstas a su vez en su extremo distal con ácidos micólicos (Brennan, P.J., H. Nikaido, 1995) (**Figura 2.6.**). A continuación, se describirán cada uno de estos subcomponentes.

### ***Ácidos micólicos***

Los ácidos micólicos son ácidos grasos  $\alpha$ - y  $\beta$ - hidroxilados de cadena larga (entre 70 y 90 carbonos) que poseen grupos funcionales complejos tales como ciclopropanos (en posición *cis* o *trans*) o metil-cetonas (Yuan, Y., et al, 1998). Estos componentes contribuyen al bajo grado de fluidez y permeabilidad típicos de las micobacterias (Liu, J., et al, 1996, Daffé, M., 2008).

Existen tres diferentes tipos de ácidos micólicos, ácidos  $\alpha$ -micólicos, ácidos metoxi-micólicos y ceto-micólicos (Minnikin D.E., 1982., Minnikin, D.E. et al, 2002). Estos compuestos considerados importantes factores de virulencia, son dianas de importantes agentes antimicobacterianos y representan potenciales “targets” para el desarrollo de nuevos fármacos (Liu, J., Nikaido, H., 1999).

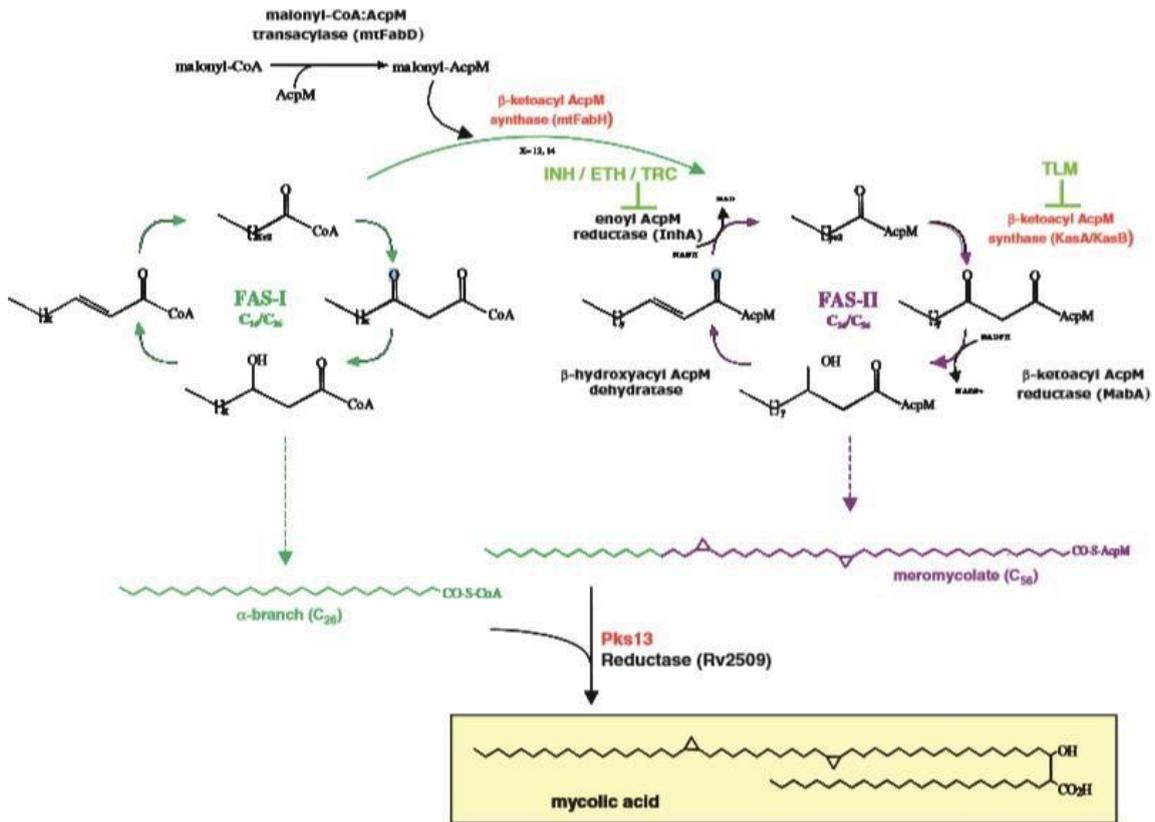
En el proceso de síntesis participan los sistemas enzimáticos FAS I y FAS II. Estos sistemas participan en la síntesis *de novo* y en el alargamiento de las cadenas de ácido graso (Pawelczyk, J., Kremer, L., 2014) (**Figura 2.6.**). Las enzimas que forman parte de ambos sistemas son esenciales para la viabilidad y virulencia de *M. tuberculosis* lo que las ha convertido también en interesantes blancos para el desarrollo de nuevos antibióticos (Nataraj, V. et al, 2015).

---

El complejo de enzimas denominado FAS I participa en la síntesis *de novo* de ácidos grasos de cadena corta conteniendo entre 16 y 26 átomos de carbono derivados de Acetil-CoA. El producto C16 acyl-CoA actúa como un sustrato para la síntesis de ácidos meromíclicos por FAS-II, mientras que el ácido graso C26 constituye lo que se denomina “cadena  $\alpha$ ” del ácido micólico final. Los acil-cebadores se activarán continuamente a través de un enlace tioéster al grupo prostético de la coenzima A (CoA) para FAS-I, o de una proteína transportadora de acilo (ACP) para FAS-II (**Figura 2.6.**). El sistema enzimático FAS-II está compuesto por cuatro enzimas que actúan de manera sucesiva y repetida para alargar la cadena de acilo en crecimiento. Este sistema no es capaz de realizar síntesis *de novo*.

Brevemente, la vía FAS II comienza con una reacción de condensación catalizada por las enzimas FabH y KasA/KasB para producir  $\beta$ -cetoacil-AcpM. Este producto es reducido por la enzima MabA ( $\beta$ -cetoacil-reductasa) produciendo  $\beta$ -hidroxi-acil-AcpM, el cual luego es deshidratado por la enzima Had AB/BC ( $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa) produciendo trans-2-enoil-AcpM (**Figura 2.6.**). Este compuesto será luego reducido por la enzima InhA (enoil-ACP reductasa) produciendo un acil-AcpM con dos carbonos más en su cadena. El acil-AcpM es sustrato de KasA/B dando lugar a un nuevo ciclo. De esta manera el sistema FASII permite alargar la cadena hasta incorporar entre 42 y 56 carbonos formando el meromicolato de cadena larga saturada (Ácido meromíclico). Posteriormente, la cadena de meromicolato sufre de modificaciones tales como la adición de grupos funcionales. Finalmente, la obtención del ácido micólico maduro de cadena larga se da por acción de las enzimas FadD32 y Pks13 y la dehidrogenasa/reductasa de cadena corta Rv2509 que catalizan la carboxilación de la cadena alfa producida por el sistema FAS-I, su unión a la cadena de meromicolato y posterior reducción (**Figura 2.6.**).

La ruta de síntesis de los ácidos micólicos se muestra de manera esquemática en la **Figura 2.6.**



**Figura 2.6. Síntesis de ácidos micólicos (Imagen tomada de Bhatt, A, et al, 2007).** La síntesis de ácidos micólicos implica cuatro etapas : (i) la síntesis de los ácidos grasos C<sub>26</sub> de cadena lineal saturada por FAS-I para dar lugar a la rama  $\alpha$ -alquilo de los ácidos micólicos, (ii) la síntesis de los ácidos grasos C<sub>56</sub> por FAS-II que proporciona la cadena principal de meromicolato, (iii) la introducción de grupos funcionales a la cadena de meromicolato por numerosas ciclopropano sintasas, (iv) la reacción de condensación catalizada por la policétido sintasa Pks13 antes de una reducción final para generar el ácido micólico maduro.

### Arabinogalactanos

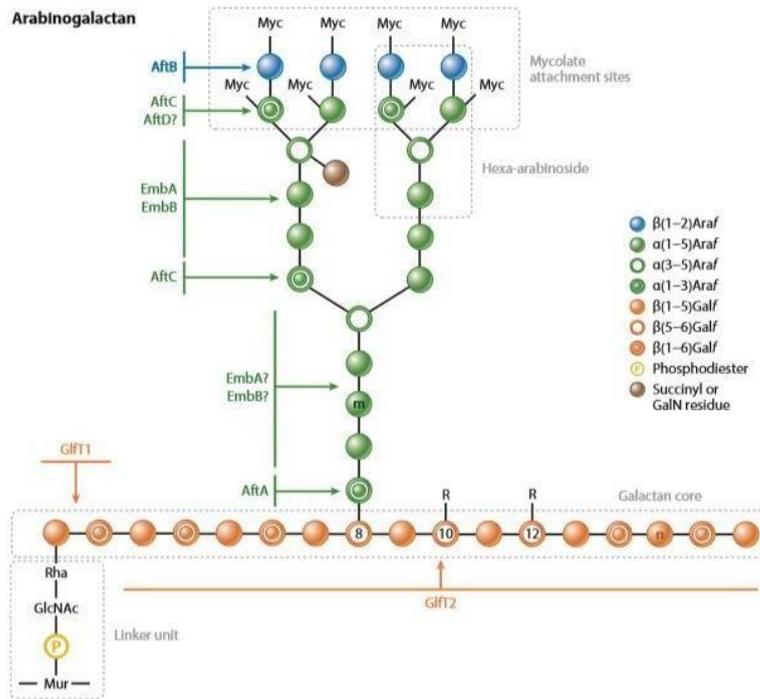
Los arabinogalactanos constituyen la capa intermedia de la pared, uniéndose covalentemente tanto a los ácidos micólicos, como al peptidoglicano (**Figura 2.4.**). Están formados por residuos de azúcar, en particular, galactosa y arabinosa, los cuales se encuentran en su forma de anillo de furanosa (Araf o furA) (McNeil, M., et al, 1987). Los arabinogalactanos presentan gran diversidad en su estructura, pero en forma general se caracterizan por una secuencia lineal de residuos de galactosa (dominio galactano) con ramificaciones laterales formadas principalmente por residuos de arabinosa (dominio arabinano). En la **Figura 2.7.** se muestra esquematizada la estructura de una unidad de arabinogalactano. El dominio galactano (aproximadamente 30 residuos de galactosa) es

---

sintetizado por las enzimas galacto-furanosil transferasas Glf (GlfT1 y GLfT2) y participa en la unión al ácido N-glicolilmurámico (MurNGlyc) del péptidoglicano (Kieser, K.J. et al, 2014).

Estudios previos han propuesto que en *M. tuberculosis* los residuos de galactosa 8, 10 y 12 de la cadena de galactano serían los sitios de unión de las cadenas de arabinosa ramificadas (Bhamidi S, et al, 2008). Sin embargo, estudios más recientes proponen que como máximo solo dos residuos de galactosa pueden unirse a cadenas de arabinosa ramificadas (Bhamidi, S., et al, 2011), quedando incluso cadenas solo formadas por el dominio galactano (Crick, D. C., et al., 2001). La transferencia de las unidades de arabinosa a la cadena de galactano es llevada a cabo por las arabino-furanosil-transferasas AftA, EmbA, EmbB y AftB (Kaur, D., et al, 2009) (**Figura 2.7.**). Esta diversidad en las enzimas responsables de transferir las cadenas de arabinosa es en parte responsable de la diversidad estructural de los arabinogalactanos (Crick, D. C., et al, 2001).

A su vez la ramificación de las cadenas de arabinosa es llevada a cabo por la acción de otras dos enzimas denominadas AftC, AftD y una tercer proteína identificada específicamente en *M .tuberculosis* como Rv1459 (Birch, H.L.,et al, 2010, Skovierova, H., et al, 2009; Kaur, D.,et al,2009) (**Figura 2.7.**). La ramificación de la cadena da lugar a lo que se denomina “motivo hexa-arabinoso”, el cual servirá como sitio de unión para los ácidos micólicos que componen también la pared celular, (McNeil, M., et al., 1991) (**Figura 2.7.**). Por otra parte, este dominio puede ser también modificado por la adición de ciertos residuos como por ejemplo galactosamina, o sustituyentes de succinilo. Este tipo de modificaciones son típicas de micobacterias patógenas y de crecimiento lento y se vinculan con procesos eficientes de infección (Skovierova, H. et al, 2010).



**Figura 2.7. Estructura de arabinogalactano y síntesis (Imagen tomada de Jankute, M., et al, 2015)** El dominio galactano está formado por enlaces tipo  $\beta(1-5)$  y  $\beta(1-6)$  entre unidades de galactosa, hasta alcanzar un total de 30 residuos. Las enzimas AftA (Rv 3792), EmbA (Rv3794) y EmbB (Rv3795) participan en la síntesis del dominio arabinano, siendo además fundamentales para la síntesis del motivo “hexa-arabinoso” y la obtención de estructuras maduras de arabinogalactanos no truncadas. Finalmente, la enzima AftB cataliza la adición de residuos de Araf al extremo terminal del arabinogalactano, específicamente en el motivo “Hexa-arabinoso”.

### *Péptidoglicano*

El péptidoglicano constituye el principal componente de la pared celular. Esta estructura colabora proporcionando resistencia y estabilidad osmótica, además de determinar la forma de la bacteria (Schleifer, K.H., Kandler, O., 1972). El péptidoglicano en las micobacterias, al igual que en otras bacterias, está formado por cadenas de glicanos unidas a péptidos cortos, que mediante su entrecruzamiento le dan rigidez a la estructura. Sin embargo, mientras que en otras bacterias la cadena de glicano está constituida por N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc), el péptidoglicano de las micobacterias contiene además un derivado del MurNAc: el ácido N-glicolilmurámico (MurNGlyc). La incorporación de este ácido murámico hidroxilado le confiere mayor estabilidad y rigidez a la estructura, ya que facilita la formación de puentes de hidrógeno y lo hace más resistente a enzimas como la lisozima (Jankute, M., et al, 2015; Brennan, P.J., Nikaido, H., 1995). Las cadenas peptídicas presentes en la estructura del

---

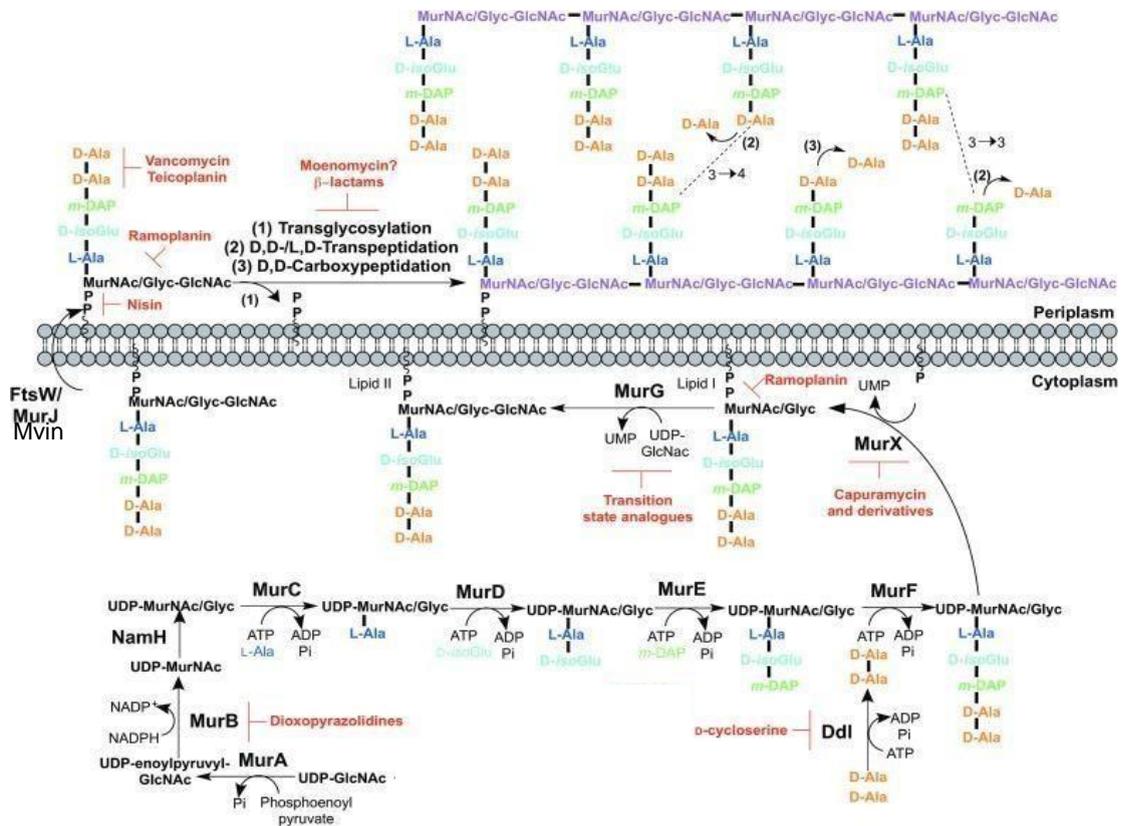
peptidoglicano de las micobacterias tienen la siguiente secuencia: L-alanina-D-isoglutámico-meso diamino pimélico-D-alanina, con entrecruzamientos entre los residuos ácido meso-diamino-pimélico de un péptido y la D-alanina de otro (Schleifer, K.H., Kandler, O., 1972). La forma de entrecruzado de dichos componentes puede ser modificada ante diferentes situaciones como pueden ser la entrada en una fase estacionaria de crecimiento o ante la presencia de endopeptidasas (Lavollay, M. et al, 2008).

La síntesis del peptidoglicano comienza en el citoplasma, donde se sintetiza un precursor formado por el pentapéptido L-Ala-D-isoGlu-mDAP-D-Ala-D-Ala, unido a un residuo de GlcNAc, en un proceso catalizado por un grupo de enzimas ATP-dependientes denominadas Mur-ligasas (**Figura 2.8.**). El proceso comienza con la acción de las enzimas MurA (Rv1315) y MurB (Rv0482) responsables de la formación de UDP-MurNAc (Kim, D.H., 1996; Benson, T.E., 1996). Este producto es hidroxilado por la enzima NamH (Rv3808) para obtener UDP-MurGlyc, al cual se irán agregando los residuos aminoacídicos de la cadena peptídica en formación a través de la acción de las enzimas MurC a Mur F (**Figura 2.8.**). En particular MurC (Rv2151c) adiciona el primer residuo de L-Ala y posteriormente se extiende la cadena por adición sucesiva de los residuos D-isoglutamato, m-DAP, y D-alanil-D-alanina por acción de las enzimas MurD (Rv2155c), MurE (Rv2158c) MurF (Rv2157c) respectivamente (Munshi, T. et al, 2013). En el siguiente paso la enzima MurX (también denominada MraY, Rv2156) cataliza la unión de este precursor a una unidad de decaprenil fosfato inserto en la membrana, resultando en la formación de lo que se conoce como Lípido I (**Figura 2.8.**). La proteína MurG (Rv2153c) adiciona al Lípido I residuos de GlcNAc a partir de UDP-GlcNAc para formar lo que se denomina Lípido II, unidad monomérica del peptidoglicano en formación (Trunkfield, A.E. et al, 2010) (**Figura 2.8.**). Posteriormente el Lípido II debe ser translocado al periplasma, una etapa clave en la síntesis de peptidoglicano que se describirá en detalle más adelante. Después de la translocación del Lípido II, actúan las proteínas PonA1/PBP1 (Rv0050) y PonA2/PBP2 (Rv3682) las cuales poseen actividad trans-glicosidasa y transpeptidasa. Estas enzimas catalizan la formación de enlaces peptídicos de tipo (3-4) entre los residuos de m-DAP y D-Ala, con la consiguiente ruptura del enlace D-Ala-D-Ala (**Figura 2.8.**).

Adicionalmente, otras transpeptidasas no clásicas pueden catalizar la formación de enlaces de tipo (3-3) entre dos residuos de mDAP. Estos cambios en el entrecruzado de péptidoglicano pueden darse en respuesta a distintos estímulos ambientales que enfrenta

la bacteria (Cordillot, M., et al, 2013).

En la **Figura 2.8.** se muestra de manera esquemática la síntesis del péptidoglicano.



**Figura 2.8. Síntesis del péptidoglicano (Modificado de Abrahams & Besra, 2018).** La síntesis de péptidoglicano puede describirse en tres etapas (i) la síntesis de los monómeros de peptidoglicano, la cual ocurre en el citosol, (ii) translocación y (iii) entrecruzamiento de los monómeros de péptidoglicano, la cual ocurre en el periplasma de la micobacteria.

Actualmente el mecanismo de translocación del lípido II antes descrito, no se encuentra totalmente dilucidado en micobacterias. Se han propuesto varias proteínas como responsables de este paso fundamental de la síntesis de peptidoglicano. Entre ellas se encuentra la proteína FtsW (Mohammandi, T., et al, 2011) y la proteína Mvin (Rv3910) (Typas, A., et al, 2012; Gee, C. L. et al, 2012). La proteína Mvin de *M. tuberculosis* es una proteína de membrana que posee:

- 14 hélices transmembrana;
- un dominio C-terminal intracelular de estructura similar al de quinasas de proteínas en Serinas y Treoninas (STPKs) (dominio pseudoquinasa, ya que no tiene actividad fosfo-transferasa);

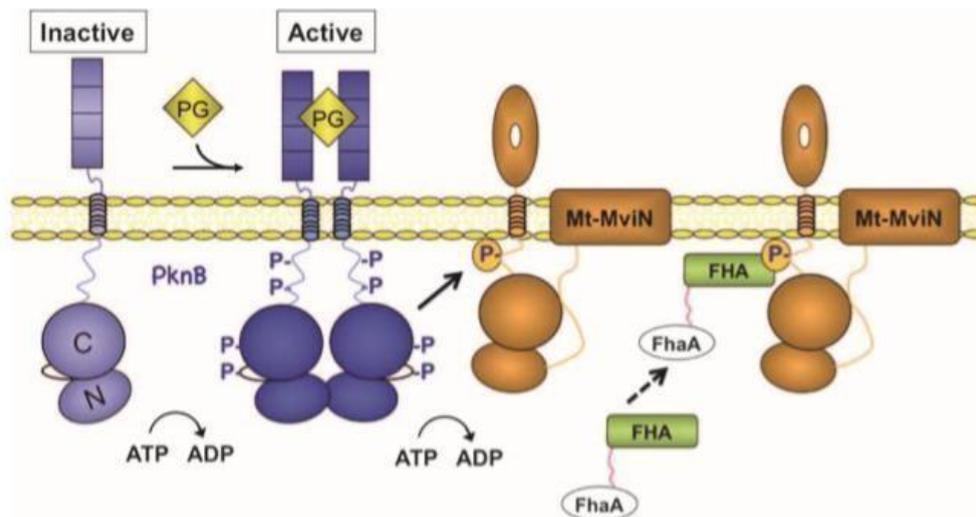
---

-un dominio extracelular que se asemeja en estructura a proteínas de unión a carbohidratos (Gee, L.C. et al, 2013).

Se ha demostrado que el dominio pseudoquinasa no es esencial para la viabilidad *in vitro* de la micobacteria; pero sí cumple un rol regulador de la actividad translocasa de Mvin (Gee, L.C. et al, 2013). En contraposición el dominio transmembrana sí resulta esencial para la micobacteria. En otras bacterias, como *E.coli*, la inhibición de Mvin provoca la inhibición de la polimerización del peptidoglicano y causa acumulación de precursores lipídicos maduros. En el caso de las micobacterias, debido a que dicha proteína es esencial para la vida, se analizaron los efectos de su depleción condicionada a la degradación de la misma. En *M. smegmatis* la depleción condicional provoca una rápida inhibición del crecimiento; alteraciones en la morfología bacteriana (engrosamiento del cuerpo bacteriano y en los polos del mismo); y acumulación de precursores de peptidoglicano en el citosol. Estos resultados confirman el rol de Mvin en la translocación de precursores en la síntesis de peptidoglicano, y además indicarían un rol también en el crecimiento bacteriano y morfogénesis (Gee, L.C. et al, 2013).

Estudios recientes han permitido postular un mecanismo de regulación en la actividad de Mvin a través de la fosforilación del dominio pseudoquinasa (**Figura 2.9**). Se ha propuesto que la quinasa de proteínas en Serinas y Treoninas PknB fosforila un residuo específico en Mvin, y que dicha fosforilación provoca el reclutamiento de la proteína FhaA (Rv0020c) (Gee, L.C. et al., 2013). Esta proteína contiene un dominio “Forkhead association” que reconoce específicamente treoninas fosforiladas y será objeto de estudio de este trabajo.

La unión entre FhaA y Mvin requiere la fosforilación de la Thr<sub>947</sub> del extremo C-terminal pseudoquinasa y su reconocimiento por el dominio FHA de FhaA, y tiene como consecuencia la inhibición de la actividad de Mvin (Gee, L.C. et al., 2013) (**Figura 2.9**). La resolución de la estructura tridimensional del complejo Mvin-FhaA reveló la presencia de otros puntos de contacto entre estas proteínas, más allá de lo predicho a partir de la interacción clásica de un dominio FHA con una Thr fosforilada y sus aminoácidos adyacentes (Gee, L.C. et al, 2013).



**Figura 2.9. Esquema de la interacción entre PknB-Mvin-FhaA y su acción sobre la síntesis de peptidoglicano.** (Imágen tomada de Gee, C.L, et al., 2013). La quinasa PknB se une a fragmentos del peptidoglicano naciente lo que lleva a la activación del dominio quinasa. Esta fosforila la proteína Mvin de manera que la misma es reconocida por el dominio FHA de la proteína FhaA. La formación del complejo Mvin/FhaA provoca la inhibición de la translocación de los monómeros de peptidoglicano, interrumpiendo su síntesis.

## 2.5. Elongación y división celular en micobacterias

La proliferación de las células bacterianas puede dividirse en dos etapas, la elongación de la célula madre y la división de la célula madre elongada en dos células hijas. En la mayoría de las bacterias el proceso de división celular consiste en un proceso simétrico que como resultado produce células hijas del mismo tamaño (Typas, A., et al, 2012).

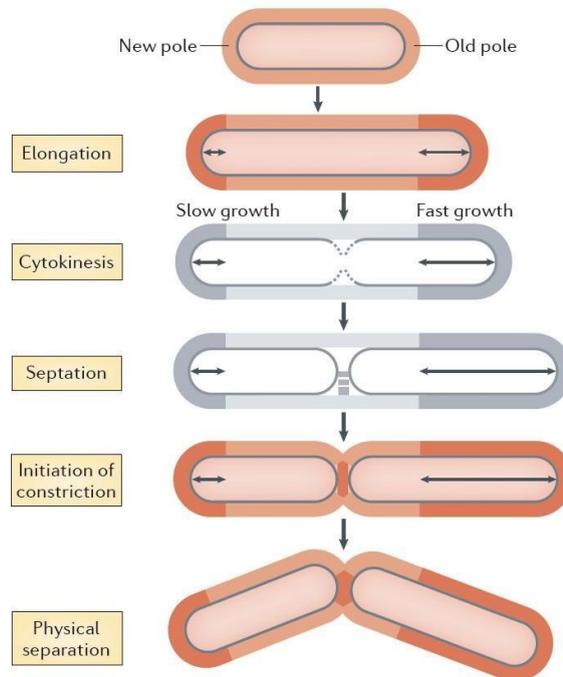
En el caso de las micobacterias la división no tiene lugar de una forma simétrica, de manera que el resultado es la producción de células hijas de tamaños diferentes (Aldridge, B. B., et al, 2012). Algunas características que surgen de esta división desigual son por ejemplo variaciones en el grado de crecimiento y en la composición de la envoltura celular entre células hijas producto de un mismo ciclo de división (Aldridge, B. B., et al, 2012).

Por otra parte dentro del hospedero durante el proceso de infección, la micobacteria también pasa por procesos de remodelación de la envoltura celular de manera de promover su sobrevivencia dentro del mismo, representando un factor de heterogeneidad que se suma a lo ocurrido durante el proceso de división (Seiler, P., et al, 2003).

Mientras que en la mayoría de las bacterias el proceso de elongación tiene lugar a lo largo

---

del cuerpo bacteriano para luego darse la división en el centro de la misma, en *M. tuberculosis* la elongación ocurre en ambos polos del cuerpo bacteriano. Si bien dos mecanismos son planteados para explicar este proceso en las micobacterias (Santi, I., et al, 2013, Joyce, G. et al, 2012; Singh, B. et al, 2013), independientemente del modelo, el resultado sigue siendo la obtención de células hijas con diferentes características referentes a su fenotipo pero exactamente el mismo genotipo (Kieser, K.J., Rubin, E.J., 2014) (**Figura 2.10.**).



**Figura 2.10. Elongación y división en *M. tuberculosis* (Modificado de Kieser, K.J., Rubin, E.J., 2014).** En *M. tuberculosis* la elongación ocurre a partir de los polos celulares. El proceso de división celular genera células hijas de diferente tamaño y composición de su envoltura celular; se ha propuesto que estas diferencias se originan debido a diferencias en la velocidad de crecimiento a partir de los distintos polos de la célula madre.

Con respecto a la síntesis de elementos de la envoltura celular, tanto para el proceso de elongación como para el proceso de división celular la síntesis de precursores del péptidoglicano, como el denominado Lípido II resulta un proceso fundamental.

En el proceso de elongación participan un gran número de proteínas que forman parte del complejo denominado elongasoma. Para poder asegurar que el alargamiento del cuerpo bacteriano será principalmente dirigido por cambios en los polos de la bacteria, es necesario que el complejo de elongación se ancle justamente en este sitio. Mientras que en otras *Actinobacterias* la proteína denominada DivIVA es quien se encarga de anclar en el sitio correcto dicho complejo y de reclutar los demás componentes del complejo de

---

elongación (Hett, E. C., Rubin, E. J., 2008), en *M. tuberculosis* esta acción es llevada a cabo por la proteína homóloga Wag31(Rv2145c) (Kang, C.M., et al, 2008). Esta proteína localizada en los polos y septo de división, es fundamental para la incorporación del péptidoglicano en los polos bacterianos y para el mantenimiento de la forma celular (Kang, C.-M., et al 2008). La depleción de dicha proteína provoca cambios en la morfología celular obteniéndose micobacterias más redondeadas y cuya velocidad de crecimiento se encuentra alterada. Estudios anteriores en *M. smegmatis* demuestran que el correcto anclaje de la proteína Wag31 requiere de su interacción con la proteína CwsA (Rv0008c) quien recluta a Wag31 y estabiliza el anclaje de esta al polo bacteriano. La sobre-expresión de CwsA incrementa la localización en los polos de la proteína Wag31 (Plocinski, P. et al. 2012).

En el proceso de división el complejo multiproteico involucrado se denomina “divisoma”. A diferencia de lo que ocurre en otras bacterias, en micobacterias el septo de división puede ubicarse en varios sitios del cuerpo celular (Singh, B. et al. 2013), promoviendo la obtención de células con diferente tamaño y distribución de proteínas, así como con diferencias en su pared celular (Kysela, D. T., et al, 2013). El proceso de división comienza con la formación de lo que se denomina “anillo Z” constituido principalmente por polímeros de la GTPasa FtsZ (Rv 2150). Este anillo determina el sitio en el cual tendrá lugar la división física para la obtención de dos células hijas, además, actúa como sitio de andamiaje para las proteínas que forman parte del divisoma, incluyendo las enzimas que participan en la remodelación del peptidoglicano (Typas, A., et al 2012; Li, Y. et al. 2013). La micobacteria controla la formación de esta estructura regulando tanto la polimerización de FtsZ como la correcta localización del anillo Z. En el caso de bacterias bien estudiadas, como *E. coli* y *B. subtilis*, la forma de anclaje de Ftsz a la membrana, así como los componentes del divisoma, están bien caracterizados (Jensen, S.O., et al, 2005). Sin embargo, se conoce poco acerca de este proceso en micobacterias, donde no se han podido identificar homólogos de las proteínas involucradas en otras bacterias. Además, la fosforilación de proteínas parece jugar un papel regulador crucial en la división celular en *Corynebacterineae* (Molle, V., Kremer, L., 2010, Wehenkel, A. et al, 2008), lo que constituye otra gran diferencia con los organismos modelo antes mencionados. En micobacterias se han identificado diferentes quinasas de proteínas en serinas y treoninas (Cole, S. T. et al, 1998, Ikeda, M., Nakagawa, S., 2003), que participan en la regulación de la división celular (Molle, V., Kremer, L., 2010, Ikeda, M., Nakagawa, S., 2003, Fernandez, P. et al, 2006). De particular interés es un operón bien conservado

---

que está ubicado cerca del origen de replicación oriC (Fernandez, P. et al, 2006). Este operón codifica entre otras, dos proteínas quinasas (PknA y PknB), una Ser / Thr proteína fosfatasa, y dos proteínas con dominios FHA (FhaA y FhaB) (Wehenkel, A. et al, 2008). Por lo tanto se ha propuesto que este operón cumple un rol en el control de la división celular. Evidencia adicional para la regulación de la división celular por fosforilación proviene del hecho de que, a diferencia de otras bacterias, FtsZ en micobacterias es fosforilada por varias quinasas (incluyendo PknA y PknB), y su fosforilación inhibe la capacidad de FtsZ para polimerizar *in vitro* (Schultz, C. et al, 2009, Thakur, M., Chakraborti, P. K., 2006).

Algunas de las proteínas que se sabe se reclutan, luego de la formación correcta del anillo Z como parte del complejo del divisoma y/o elongasoma, son las proteínas FhaB, FtsW, FtsQ, CrgA y CwsA (Rv0008c). El complejo ternario FtsZ–FhaB–FtsQ es requerido para la formación del anillo Z bajo condiciones de estrés oxidativo y resultados experimentales demuestran que la pérdida de FhaB inhibe la replicación de la micobacteria dentro del macrófago (Sureka, K. et al, 2010).

Por otra parte, la proteína CrgA interacciona con la proteína del complejo de elongación CwsA (Rv0008c), y se ha propuesto que esta interacción coordina la elongación y división durante el ciclo celular de manera de asegurar que la formación del septo ocurra después de la elongación (Plocinski, P. et al, 2012).

## **2.6. Quinasas de proteínas en Serinas y Treoninas en *M. tuberculosis***

Tanto en organismos eucariotas como procariotas, la adición covalente de grupos fosfato a las proteínas en residuos de Serina, Tirosina o Treonina, regula procesos fundamentales para la vida de una célula. En el caso de las micobacterias, se ha demostrado que estas utilizan la fosforilación de proteína para regular procesos claves, como la división celular, el metabolismo bacteriano y la interacción con el hospedero (Wehenkel, A., et al, 2008). El genoma de *M. tuberculosis*, codifica para once quinasas de proteínas en Serinas y Treoninas (STPKs), cuyos genes son nombrados desde pknA a pknL (Cole, S.T. et al, 1998); mientras sólo PknG y PknK son proteínas citosólicas; las otras nueve quinasas son proteínas integrales de membrana (Av-Gay, Y., Everett, M., 2000) (Wehenkel, A. et al, 2008).

Las quinasas pueden ser clasificadas en quinasas RD y quinasas no-RD, basándose en la presencia o ausencia de un residuo de Arginina (fundamental para la activación de dicha enzima) que se encuentra adyacente en la estructura a un Aspartato conservado en el bucle

---

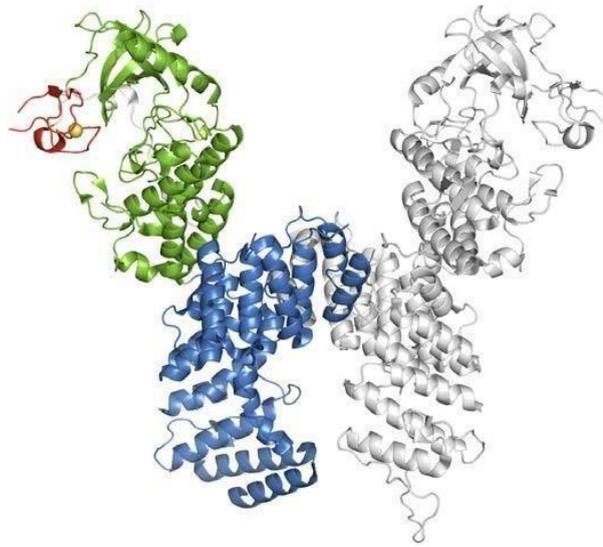
catalítico del dominio quinasa. En el caso de las micobacterias la mayoría de las quinasas son de tipo RD, siendo PknG la única de las once quinasas de proteínas en Serinas y Treoninas que carece de este residuo de Arginina.

Muchas de estas quinasas son esenciales para el crecimiento de la micobacteria (Sasseti, C. et al, 2003); y se ha demostrado que ocho de ellas se expresan durante la infección (Kruh, N.A., et al, 2010) y en particular PknG, ha cobrado gran relevancia como una de las moléculas capaces de facilitar la sobrevivencia de la bacteria dentro del hospedero (Cowley, S., et al, 2004, Walburger, A., 2004)

### **2.7. PknG como factor de virulencia.**

Varios de los factores de virulencia más estudiados han sido descritos a lo largo de la introducción, pero ahora en particular haremos hincapié en un factor de virulencia de origen proteico vinculado directamente a nuestro trabajo, la quinasa de proteínas en Serinas y Treoninas PknG (Walburger, A.,2004; Scherr, et al., 2007).

Desde el punto de vista estructural PknG posee una arquitectura singular de dominios, no reportada en ninguna otra quinasa (**Figura 2.11.**) Además del dominio catalítico conservado, posee dominios N- y C- terminales con funciones aún muy poco estudiadas (Scherr, N., et al, 2007, Lisa, M.N. et al, 2015). En el extremo N-terminal presenta un dominio rubredoxina compuesto por un átomo de hierro coordinado a cuatro residuos de Cisteína, y que se ha descrito en muchas bacterias anaerobias como fundamental para la transferencia de electrones (Sieker, L.C., et al, 1994, Van Beilen, J.B., et al, 2002). En el extremo C-terminal PknG presenta un motivo “tetra-tricopéptido repetido” el cual participa en la formación de dímeros en la estructura cristalina (Scherr, N., et al, 2007) (**Figura 2.11.**). Nuestro grupo demostró que PknG es capaz de autofosforilarse en tres treoninas específicas en la región N-terminal de la proteína (O'Hare, H.M., et al, 2008). Estos residuos fosforilados participan en el reclutamiento de sustratos, pero no en la regulación de la actividad enzimática de PknG. Por otra parte, el dominio rubredoxina interacciona con los dos lóbulos del dominio quinasa y se localiza sobre el sitio activo sin obstruir su acceso. Se ha demostrado que este dominio es el único que es capaz de regular la actividad quinasa de PknG (Gil, M. et al, 2013; Lisa, M.N. et al, 2015).



**Figura 2.11. Representación tridimensional de la estructura de rayos X de PknG de *M. tuberculosis*.** PknG posee tres dominios proteicos, el dominio quinasa con actividad catalítica (verde), el dominio TPR, involucrado en interacciones proteína-proteína (azul) y el dominio Rbx, exclusivo de procariontes y que participa en reacciones de transferencia de electrones en bacterias anaeróbicas (rojo). La estructura corresponde a una forma truncada, donde faltan los 74 aminoácidos iniciales (Tomado de Scherr, N., et al, 2007).

La importancia de esta proteína entre otros puntos, radica en su acción regulatoria en procesos críticos para la micobacteria. Los roles funcionales postulados para PknG incluyen la regulación de procesos metabólicos (O'Hare, H.M., et al, 2008), y la interferencia en vías de señalización de la célula hospedera infectada (Walburger, A., 2004).

Estudios previos comprobaron que la delección génica o inhibición química de este factor de virulencia origina una cepa atenuada de *M. tuberculosis* (Cowley, S., et al, 2004, Scherr, N., et al, 2007). Además, ensayos de fagocitosis mostraron que mientras que la sobreexpresión de PknG en una micobacteria no patógena permite su supervivencia en el macrófago, la cepa salvaje o cepas que sobre-expresan una mutante inactiva de PknG son rápidamente destruidas (Walburger, A., 2004). Estos resultados permiten entonces vincular a la quinasa PknG con el proceso de inhibición de la fusión fago-lisosomal, ya sea planteando un rol directo o indirecto de la proteína en dicho proceso.

Por otra parte, nuestro grupo demostró que esta quinasa participa también en la regulación del metabolismo intermediario a través de la fosforilación de una pequeña proteína llamada GarA (del inglés *Glycogen accumulation regulator*) (O'Hare, H.M, et al, 2008). Esta proteína fue identificada además como sustrato de PknB y de las restantes quinazas de *M. tuberculosis* (Villarino, A., et al, 2005). GarA es una pequeña proteína de 162

---

aminoácidos que posee en su región C-terminal un dominio FHA ("ForkHead Associated") de reconocimiento específico de treoninas fosforiladas (O'Hare, H.M., et al, 2008, Villarino, A., et al, 2005), al igual que la proteína FhaA descrita en este trabajo. Este tipo de dominios es característico de proteínas reguladoras y participa en interacciones proteína-proteína que forman parte de vías de señalización dependientes de STPKs, tanto en eucariotas como en procariontes. Nuestro grupo de investigación demostró que GarA es sustrato *in vivo* e *in vitro* de PknG. Por otra parte, se elucidó el rol de PknG, mediado por la fosforilación de GarA, a partir del estudio de las proteínas interactoras de GarA utilizando aproximaciones interactómicas.

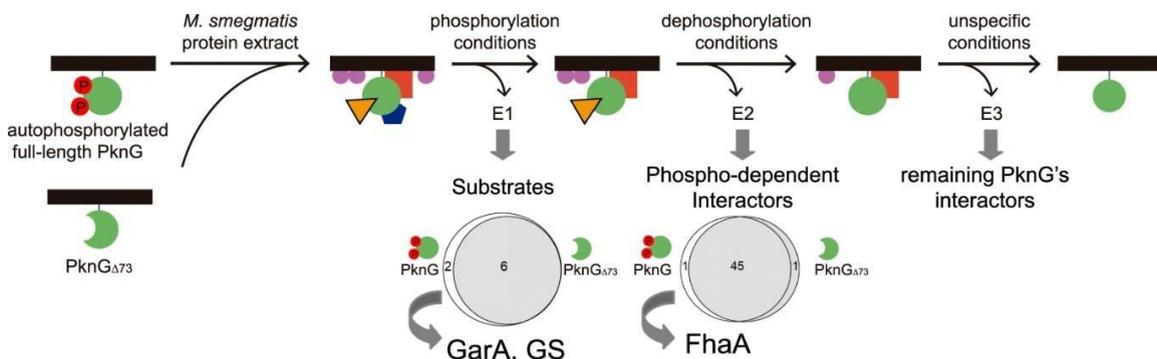
Como resultado se concluyó que a través de la fosforilación de GarA, PknG participa en el control del metabolismo energético y del glutamato en *M. tuberculosis*. En este proceso, el reclutamiento y posterior fosforilación de GarA por parte de PknG es dependiente de los residuos de treoninas presentes en el extremo N-terminal de PknG las cuales son autofosforiladas por la quinasa, para ser luego reconocidas por el dominio FHA de GarA (O'Hare, H.M., et al, 2008, Villarino, A., et al, 2005). GarA, dependiendo de su estado de fosforilación actúa en forma sinérgica sobre tres enzimas del metabolismo intermediario. Así GarA desfosforilada puede interactuar e inhibir a las enzimas 2- oxoglutarato-deshidrogenasa y glutamato-deshidrogenasa-NAD<sup>+</sup> dependiente (O'Hare, H.M., et al, 2008)), y a su vez activar la glutamina-sintasa (Nott, T.J., et al, 2009, Chao, J., et al, 2010).

## **2.8. Interactoma *in vitro* de PknG.**

PknG es una enzima esencial para la infección, para la cual se han reportado muy pocos sustratos fisiológicos. En particular en la actualidad hay solamente dos sustratos bien caracterizados de PknG: la proteína GarA identificada por nuestro grupo de trabajo; y la proteína "50 ribosomal L13" (Wolff, K.A., et al, 2015). Por tanto, en nuestro laboratorio nos propusimos llevar a cabo un abordaje proteómico basado en la purificación por afinidad seguida de espectrometría de masa (AP-MS) con el fin de identificar nuevos sustratos e interactores de esta quinasa en la micobacteria (**Figura 2.12.**).

Brevemente PknG de *M. tuberculosis* o PknG<sub>Δ73</sub> (una forma truncada de la quinasa a la que le falta la región N-terminal involucrada en el reclutamiento de GarA) fueron inmovilizadas en un soporte sólido e incubadas con un extracto citosólico de *M. smegmatis* MC<sup>2</sup>155. Las proteínas retenidas en la matriz fueron eluidas en pasos secuenciales en diferentes condiciones. La primera elución se realizó en condiciones de

fosforilación, de forma tal de recuperar sustratos de la quinasa que al igual que GarA se liberaran una vez fosforilados (**Figura 2.12.**). En la segunda etapa se utilizaron condiciones de desfosforilación con el fin de romper las interacciones mediadas por fosfo-residuos (**Figura 2.12.**). En una tercera etapa se utilizaron condiciones inespecíficas para lograr la elución de las proteínas interactoras de PknG, aun retenidas en la matriz (**Figura 2.12.**). Las proteínas obtenidas en cada paso de elución se analizaron por espectrometría de masa de tipo trampa iónica de alta sensibilidad acoplada a un nano-LC. Además, se realizó el análisis de las proteínas retenidas en una resina utilizada como blanco (sin PknG inmobilizada) como control. La comparación de la lista de sustratos identificados, utilizando tanto PknG como PknG $\Delta$ 73 como proteína cebo, permitió determinar aquellos interactores que requerían del extremo N-terminal fosforilado de la quinasa. Solamente dos proteínas fueron recuperadas exclusivamente cuando se usaba la proteína entera como cebo, y no la proteína truncada. Una de ellas fue la proteína GarA; un hallazgo que no solo validó el abordaje experimental, sino que respaldó la lista de sustratos recuperados. La segunda proteína que identificamos como interactore exclusivo de la proteína entera fue la proteína FhaA, que al igual que GarA contiene un dominio de reconocimiento específico de treoninas fosforiladas (**Figura 2.12.**) (Gil, M., Lima, A., Rivera, B., Manuscrito enviado a *Journal of Proteomics*, Julio 2018).



**Figura 2.12.** Estrategia experimental para la obtención del interactoma *in vitro* de PknG.

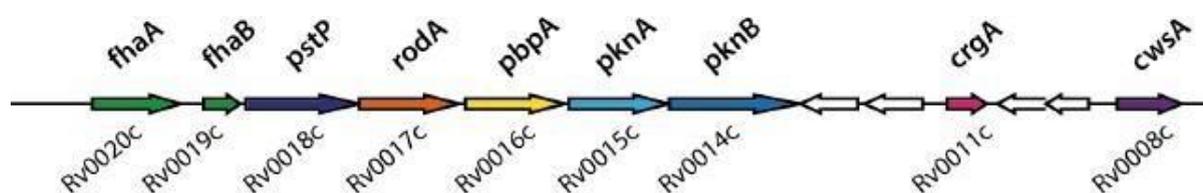
Por tanto, la proteína FhaA fue seleccionada para la posterior validación como interactore directo de PknG a través de experimentos de resonancia plasmónica de superficie. Los resultados obtenidos nos permitieron confirmar que FhaA es un interactore directo de la quinasa PknG y nos permitieron postular que esta proteína podría representar un nuevo sustrato de la misma. Estos resultados constituyeron el punto de partida del presente proyecto, centrado en el estudio de la proteína FhaA.

## 2.9. Proteína FhaA de *M.tuberculosis*.

FhaA de *M. tuberculosis* es una proteína aún poco caracterizada. Consta de 527 aminoácidos y posee una estructura similar a la de las proteínas de andamiaje que participan en vías de señalización de eucariotas, donde el dominio N-terminal de 130 aminoácidos de función desconocida y el dominio C-terminal (dominio FHA) se encuentran unidos por una secuencia de aproximadamente 300 residuos sin estructura definida y con alto grado de flexibilidad (Roumestand, C. et al. 2011).

Al igual que el único sustrato de PknG previamente reportado; la proteína GarA; FhaA posee un dominio FHA ("ForkHead Asociated") que reconoce específicamente treoninas fosforiladas. El genoma de *M. tuberculosis* codifica cinco proteínas con dominios FHA (incluyendo GarA y FhaA) que han sido reportadas como sustratos de múltiples quinasas de proteínas en Serinas y Treoninas *in vitro* (Roumestand, C., et al, 2011, Villarino, A., et al, 2005). Si bien se ha postulado que estos dominios cumplen un papel en las cascadas de señalización dependientes de fosforilación, actualmente se desconocen las proteínas que reconocen y la arquitectura de los complejos de señalización de los que forman parte. El gen *fhaA* forma parte de un operón altamente conservado que cumple funciones esenciales en micobacterias relacionadas a la división celular, el control de la forma celular y latencia (Fernandez, P. et al, 2006) (**Figura 2.13.**). Estudios previos muestran que la depleción de FhaA no afecta el crecimiento de las micobacterias en cultivo pero sí su morfología. Por otro lado, utilizando como modelo macrófagos murinos se demostró que FhaA es necesaria para la supervivencia de la bacteria dentro del hospedero (Sasseti et Rubin, 2003).

Por lo tanto, si bien la función específica de esta proteína es desconocida, actualmente se postula que participa en procesos vitales vinculados principalmente a la división celular y en el mantenimiento de la forma celular.



**Figura 2.13. Estructura del operón al que pertenece el gen *fhaA* (Imagen tomada de Fernandez, P. Et al, 2006).** El operón se compone de los genes codificantes para dos proteínas con dominios FHA (FhaA y FhaB), pSer/pThr fosfatasa PstP, RodA y PbpA (relacionadas a la síntesis de péptidoglicano y división celular) y las quinasas de proteínas en Serinas y Treoninas PknA y PknB.

---

Hasta el momento solamente se ha identificado un interactor de FhaA, la proteína Mvin. Estudios previos proponen la interacción entre FhaA a través de su módulo FHA y un residuo de Treonina fosforilado en la pseudoquinasa MviN, y la participación de este complejo en la biosíntesis de la pared celular de micobacterias a través de la regulación de la síntesis del péptidoglicano (Gee, C. L., et al, 2012). La unión entre FhaA y Mvin provoca la inhibición de la síntesis del péptidoglicano a través de la inhibición del paso de translocación de los monómeros de péptidoglicano (Lípido II) desde el citosol hacia la cara externa de la membrana de la micobacteria.

Por otra parte FhaA ha sido previamente reportada como sustrato *in vitro* de la quinasa PknB y aparece fosforilada en estudios fosfoproteómicos llevados a cabo en micobacterias. En particular si bien FhaA posee varios sitios de fosforilación probables *in vivo* (Calder B, et al, 2016), se ha postulado que PknB es la quinasa responsable de la fosforilación de FhaA en el residuo de Thr<sub>116</sub> (Roumestand, C., et al, 2011), sin embargo, se desconocen las quinasas responsables de otros sitios de fosforilación reportados. Nuestros trabajos previos nos permiten postular que FhaA podría ser un sustrato de PknG, y nos plantean la pregunta de cuál podría ser el rol de esta proteína tan poco caracterizada en las vías de señalización mediadas por fosforilación.

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Trabajos previos de nuestro grupo nos permitieron identificar a FhaA como un interactor directo de PknG, una quinasa de proteínas en Serinas y Treoninas que juega un papel fundamental en la sobrevivencia de la micobacteria en el hospedero. FhaA es una proteína que contiene un dominio que reconoce específicamente treoninas fosforiladas y cuya función es aún poco conocida. Desde el punto de vista estructural FhaA se asemeja a las proteínas de andamiaje que reclutan interactores en vías de señalización de eucariotas. Sin embargo al día de hoy se desconoce la arquitectura de las vías de señalización mediadas por FhaA en las micobacterias, así como los procesos que regulan.

El objetivo general de esta tesis es aportar a la comprensión de las vías de señalización mediadas por FhaA y su regulación en las micobacterias. Para ello nos propusimos caracterizar a nivel molecular los complejos de proteínas de los que forma parte FhaA *in vivo*. La estrategia experimental propuesta se basa en el entrecruzamiento químico *in vivo* junto con purificación por afinidad utilizando etiquetas (Strep-tag) y espectrometría de masa, para obtener una “instantánea” de las interacciones proteína- proteína en la micobacteria e identificar los interactores fisiológicos de FhaA.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Caracterización de FhaA como sustrato de PknG e identificación de sus sitios de fosforilación *in vitro* e *in vivo*.
2. Puesta a punto de una estrategia experimental para la identificación de interactores *in vivo* de FhaA, mediante la sobreexpresión de FhaA con una etiqueta, entrecruzamiento químico y espectrometría de masa.
3. Estudiar el interactoma de FhaA y validar interactores seleccionados.

---

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Mapeo de los sitios de fosforilación *in vitro* e *in vivo* de FhaA.

La purificación de la proteína FhaA-Strep-tag II se realizó utilizando una columna de afinidad [Strep-Tactin Sepharose®, (IBA solutions)] de acuerdo a las directrices del fabricante. Para la determinación de los sitios de fosforilación *in vitro* de FhaA y la confirmación de FhaA como sustrato de PknG, FhaA inmovilizada en la columna de Strep-Tactin se desfosforiló con 0,07 U /  $\mu$ L de fosfatasa alcalina [Alkaline phosphatase from calf intestine, (Roche)] durante 40 minutos a 37° C bajo 1000 rpm de agitación. El sobrenadante se descartó y Strep-tag® II-FhaA se eluyó por competencia con D-destiobiotina. El eluido se dividió en dos fracciones y una de ellas se incubó con 1 mM de MnCl<sub>2</sub> y 250  $\mu$ M de ATP en presencia de PknG 10 nM en buffer de fosforilación durante 30 minutos a 37° bajo agitación de 1000 rpm. El mismo experimento se realizó en ausencia de PknG (control). Para aumentar la significancia estadística de los resultados obtenidos el experimento fue realizado en más de una oportunidad. En la **Figura 4.1.** se muestra de forma esquemática la estrategia utilizada.

Posteriormente la mezcla de proteínas se digirió con 0,5  $\mu$ g de tripsina [Sequencing Grade Modifie Trypsin, (Promega)] y se incubó durante toda la noche a 37° C. Los péptidos obtenidos fueron concentrados, desalados en columnas de fase reversa C18 Zip Tip® (Merck, Millipore) y preparados para su análisis según metodología desarrollada en nuestro laboratorio. Los péptidos se separaron al igual que en el punto anterior utilizando un sistema nano-HPLC Easy-nLC 1000 (Proxeon-Thermo Scientific) y la adquisición y análisis de los espectros de masa se realizó utilizando un espectrómetro de masa LTQ Velos (Thermo Scientific) equipado con una trampa iónica lineal y acoplado al nano HPLC. Los datos crudos de MS

/ MS se interpretaron con el paquete de software Proteome Discoverer (v.1.3.0.339, Thermo) utilizando Sequest como motor de búsqueda. Para localizar los residuos fosforilados en las secuencias asignadas y validar los sitios de fosforilación se utilizó el módulo pRS, además se consideró la identificación de un sitio de fosforilación como positiva cuando se obtuvo más de un espectro para dicho fosfopéptido y el análisis manual del espectro de fragmentación permitió confirmar la correcta asignación del sitio.



---

5 g/L, ZnSO<sub>4</sub> 0.1 mg/L, CuSO<sub>4</sub> 1 mg/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g/L] suplementados al 10%(v/v) con albúmina-dextrosa-NaCl (ADC) o bien dextrosa-NaCl (DC) según la utilización final del cultivo, Tween® 80 al 0,05%(v/v) conteniendo kanamicina (50 µg/mL).

Ambas cepas fueron cultivadas hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionario a 37°C y 220 rpm de agitación (Infors HT Multitron Standard). Dichos cultivos se almacenaron a -80°C en glicerol 20%(v/v) y se mantuvieron para su uso cotidiano en placas de medio sólido (7H10: 7H9+Agar) conteniendo kanamicina (50 µg/mL).

### **4.3. Preparación de los cultivos**

En cada caso se realizó un pre-cultivo de las cepas FhaA y pLAM mantenidas a -80° C. Para ello se colocaron 20µl de cada cepa en 3 ml de caldo Middlebrook 7H9 adicionado con ADC, Tween® 80 y kanamicina en las cantidades antes descritas. Los pre-cultivos se incubaron a 37° C y 220 rpm, hasta obtener una densidad óptica de 0.800 a una longitud de onda de 600 nm (fase logarítmica). De estos cultivos se tomó la alícuota correspondiente para inocular en una dilución 1:100 los cultivos finales (volumen= 300ml). Una vez alcanzada una densidad óptica de 0.2 a una longitud de onda de 600 nm (fase logarítmica temprana), la expresión de la proteína recombinante fue inducida mediante el agregado de 0.2% (v/v) de acetamida durante 18hs a 37°C.

### **4.4. Curvas de crecimiento.**

Para la construcción de las curvas de crecimiento de las cepas FhaA y control, las mismas fueron cultivadas con y sin inductor (0.2% (v/v)) en medio 7H9 Middlebrook suplementado con albúmina-dextrosa-NaCl, 0.05% Tween® 80 y kanamicina (50 µg/mL) por triplicado. Se realizaron mediciones de la densidad óptica a 600nm (Fothometer, Thermo) de cada cultivo a distintos tiempos, y durante 32 horas. En el caso del seguimiento de los cultivos con y sin inductor realizados en medio sólido (7H10), se adicionó a dicho medio kanamicina (50 µg/mL) y 0.2% (v/v) de acetamida y el seguimiento se realizó durante 4 días, mediante la medición de la densidad óptica.

---

#### **4.5. Formación de Biofilms.**

Se realizó un pre-cultivo de las cepas FhaA y control mantenidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para ello se colocaron 20  $\mu\text{l}$  de cada cepa en 3 ml de caldo Middlebrook 7H9 adicionado con ADC y kanamicina en las cantidades antes descritas. Los pre-cultivos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y 220 rpm, hasta alcanzar la fase estacionaria. De estos cultivos, se tomó la alícuota correspondiente para inocular en una dilución 1:100 los cultivos finales (volumen= 1.8ml) llevados a cabo en placas de 12 pocillos por triplicado y utilizando 2 placas por cepa. Dichas placas fueron envueltas en Parafilm e incubadas en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . Pasado un ciclo de replicación se indujo la expresión de proteína FhaA - Strep-tag® II mediante el agregado de 0.2% (v/v) de acetamida, dejando una placa sin inductor para cada cepa. La incubación en estas condiciones se mantuvo durante 3 semanas. Pasado este tiempo, y luego de remover el cultivo remanente, los biofilms se lavaron con agua ultrapura para quitar el exceso de micobacterias no adheridas a la superficie de la placa y se añadió una solución de cristal violeta 0.1% en 50% de etanol, incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se repitieron los lavados con agua ultrapura para quitar el exceso de cristal violeta. Por último se realizó la cuantificación por destinción del biofilm en ácido acético 30% y medida de absorbancia a 570 nm.

#### **4.6. Criomicroscopía electrónica de transmisión.**

Se realizaron cultivos líquidos en 7H9 Middlebrook suplementado con albúmina-dextrosa-NaCl, 0.05% Tween® 80 y kanamicina de la cepa FhaA y la cepa control. Al alcanzar los cultivos una DO<sub>600nm</sub> de 0.05 se indujo la expresión de FhaA con acetamida 0.2%. Las células se colectaron luego de 18 horas y se congelaron en presencia de bolitas de oro. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL-2200FS. Imágenes adquiridas por Annemarie Wehenkel, Unidad de Microbiología Estructural del Institut Pasteur de Paris.

#### **4.7. Microscopía electrónica de transmisión.**

Se cargaron 2  $\mu\text{l}$  de cultivos de las distintas cepas en fase estacionaria sobre grillas de carbón/formvar, se incubó durante 3 minutos y se realizó una tinción negativa utilizando acetato de uranilo 2%. Las imágenes fueron adquiridas en el servicio de Microscopía

---

electrónica de transmisión de Facultad de Ciencias, Montevideo Uruguay, utilizando un microscopio JEOL- JEM 10-10.

#### **4.8. Extracción de proteínas de las cepas FhaA y control: Optimización del protocolo.**

Una vez cumplido el tiempo de incubación con el inductor y habiendo alcanzado una densidad óptica entre 0.900 y 1.2 a 600 nm, se retiran los cultivos del agitador, se recogen las micobacterias en tubos estériles de 50 ml. y se centrifugan durante 10 minutos a 3200 x g a 4°C (Centrífuga refrigerada Beckman Coulter). Se repitió esta acción hasta haber centrifugado los 300 ml de cultivo. El sobrenadante se descartó en cada caso y el sedimento obtenido luego de los diferentes ciclos de centrifugación se resuspendió en 20 ml de PBS. Este lavado permitió eliminar excesos de medio y detritos celulares. Se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 3200 x g a 4°C y posteriormente se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió 3 veces. Luego del último ciclo de centrifugación se descartó el sobrenadante y se pesó el tubo con el sedimento celular al final de los lavados, a fin de determinar el peso húmedo. Finalmente se resuspendió el sedimento en Buffer de interacciones de proteínas (Hepes 25 mM, NaCl 150 mM, 1% de glicerol, EDTA 1 mM, pH 7,4) y se adicionó Cóctel de Inhibidores de Proteasa sin EDTA [Complete mini, protease inhibitor cocktail”, Roche® (Roche)], inhibidor de fosfatasa [PhosSTOP™ (Sigma-Aldrich)] y Tween® 20 0.5% (v/v).

**Protocolo 1:** Se realizó la ruptura de las micobacterias utilizando inicialmente como único método la ruptura mecánica con perlas de vidrio

A los pellets resuspendidos en buffer de interacciones antes obtenidos se les agregó una cantidad equivalente a 450 µg de perlas de vidrio estériles de diámetro  $\leq 106$  µm [Glass beads, acid-washed  $\leq 106$  µm(Sigma-Aldrich)]. Posteriormente las mismas fueron “vortexadas” a máxima velocidad durante un ciclo de 30 minutos con intervalos de descanso de 10 minutos en baño de hielo con etanol 70% (WiseMax VM-10, Laboratory experiments). Se centrifugó la muestra por 15 minutos a 4000 x g a 4° C, se recuperó el sobrenadante y se guardó a -80 °C para su posterior cuantificación y análisis.

**Protocolo 2:** Previa a la ruptura de las micobacterias se agregó al extracto Tritón-X100 a la máxima concentración compatible con la resina que posteriormente se utilizará para la purificación del extracto.

---

La ruptura de las micobacterias se realizó utilizando dos métodos diferentes en forma consecutiva:

- i) Sonicación.
- ii) Ruptura mecánica con perlas de vidrio (método antes descrito)

Las muestras fueron colocadas en baño de hielo con etanol 70 % y sonicadas utilizando un sonicador digital (Branson) y un utilizando ciclo de pulsos de 8 minutos de tiempo efectivo aplicados de a 30 segundos a 25% de amplitud y con intervalos de 1 minuto de descanso. Posteriormente se siguió con el protocolo antes descrito para la ruptura mecánica con las perlas de vidrio y obtención por centrifugado del sobrenadante conteniendo las proteínas de interés.

Se prepararon los extractos proteicos de tres réplicas biológicas independientes para cada una de las cepas (Fha A y cepa control) utilizando cada uno de los protocolos antes descritos. La eficacia en la obtención de proteínas fue determinada en función de la concentración de proteínas totales obtenidos para cada caso luego del análisis de las diferentes muestras.

#### **4.9. Determinación de la concentración de proteínas totales.**

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por densitometría a partir de la utilización de geles SDS-PAGE y un kit de proteínas para calibrar (*Low molecular weight calibration kit*, Amersham). El mismo consiste en marcadores de peso molecular de concentración conocida. En primer lugar se llevó a cabo la electroforesis mono-dimensional en geles de poliacrilamida al 12%. Las muestras a ser cuantificadas se incubaron a 95° C durante 5 minutos con Buffer de muestra 1X (0.25mM Tris, 8% SDS, 40% glicerol, 0.04% de azul de bromofenol, 1%  $\beta$  mercaptoetanol). El gel se corrió bajo corriente constante de 10 mA hasta pasar completamente por el gel concentrador para luego aumentar a 20 mA y mantenerse constante durante el pasaje de la muestra por el gel separador. El gel se fijó en una solución 4:1:5 etanol:ácido acético:H<sub>2</sub>O y se tiñó con azul de Coomassie G-250 (Baker) en etanol. Para la adquisición de las imágenes del gel se utilizó un scanner UMAX Power- LOOK 1120 y el software LabScan v5.0 (GE Healthcare) para realizar la cuantificación de cada lisado por comparación con el marcador de peso. Los resultados obtenidos para la cuantificación de los lisados preparados según los diferentes protocolos de extracción

---

de proteínas permitieron la selección del protocolo 2 como el más eficiente.

#### **4.10. Determinación del proteoma total de la cepa FhaA.**

Para la determinación del proteoma total de la cepa FhaA se partió de 3 cultivos de dicha cepa y 3 cultivos de la cepa control.

Los extractos, obtenidos como se describió anteriormente, se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12.5%, cargando cantidades equivalentes de proteínas totales. El gel fue fijado y teñido y cada carril fue cortado en 7 trozos de tamaño equivalente. Cada trozo de gel fue desteñido con una solución de 0.1 M de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  en Acetonitrilo (ACN) 50% (v/v). Se realizó la reducción y alquilación de cisteínas *in-gel* incubando 1 h a 56° C con DTT 10 mM en agitación. La solución fue removida y el gel se incubó 45 min a temperatura ambiente y en agitación con una solución de iodoacetamida 55 mM. La digestión se llevó a cabo utilizando 0.5  $\mu\text{g}$  de tripsina [*Sequencing Grade Modifie Trypsin*, (Promega)] y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Para la extracción de los péptidos digeridos, se utilizó una solución 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) en 60% de ACN, realizándose 2 extracciones consecutivas de 1 h cada una. Los péptidos extraídos fueron concentrados utilizando una centrifuga de vacío [SpeedVac (Thermo)] hasta evaporar completamente el ACN presente en la muestra para luego ser resuspendidos en 0.1% ácido fórmico (Fase A) y sonicados durante 3 ciclos de 5 minutos. Los péptidos fueron desalados en micro columnas de fase reversa C18 Zip Tip® (Merck, Millipore) previamente lavados con ACN 50% y equilibrados con 0.1% de ácido trifluoroacético. La elución de los péptidos se realizó con 0.1 % de ácido fórmico en 70% ACN (Fase B). Cada muestra se evaporó hasta sequedad nuevamente en centrifuga de vacío y fue resuspendida en Fase A repitiendo los 3 ciclos de sonication. Los péptidos se separaron en un sistema nano-HPLC Easy-nLC 1000 (Proxeon-Thermo Scientific) y la adquisición de los espectros de masa se realizó utilizando un espectrómetro de masa LTQ Velos (Thermo Scientific) equipado con una trampa iónica lineal y acoplado al nano HPLC antes descrito. Para la separación de los péptidos se utilizó una precolumna Acclaim PepMap™ 100 C18 (75 $\mu\text{m}$  x 2cm, nanoViper C18 3 $\mu\text{m}$  100Å), Thermo, y una columna C18 PepMap™ RSLC C18 (2 $\mu\text{m}$  100Å, 50 $\mu\text{m}$  x 15cm), Thermo. La elución de los péptidos se llevó a cabo utilizando un gradiente de ACN: Acido Fórmico 0.1% (Fase B) detallado a continuación:

---

Tiempo (min)	Flujo (nl/min)	% Fase B
00:00	250	0
100:00	250	50
110:00	250	100
120:00	250	100

El análisis on-line se realizó en modo dependiente de los datos, de manera de adquirir en primera instancia un espectro de MS seguido de los espectros de MS/MS de las 10 señales más intensas en el espectro. Además, se utilizó una lista de exclusión dinámica de manera de impedir la fragmentación reiterada de las mismas señales. Para la adquisición de los datos se utilizó el software Xcalibur v2.1 (Thermo).

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el software libre “*PatternLab for Proteomics*” v 4.0.0.84 (<http://patternlabforproteomics.org/>). En primer lugar se obtuvo la lista de secuencias de proteínas de la cepa *Mycobacterium smegmatis mc<sup>2</sup>155* (<http://www.uniprot.org>) y a la misma se agregó la secuencia aminoácidica de la construcción FhaA de *Mycobacterium tuberculosis*. Utilizando *PatternLab for Proteomics* se generó posteriormente una base de datos *target-reverse* que incluye las secuencias reversas de todas las proteínas presentes en la base de datos, junto con las secuencias de los 127 contaminantes más comunes en experimentos proteómicos. Los parámetros de búsqueda utilizados fueron:

Tolerancia de masa del precursor (ppm)	800
Enzima	Tripsina
Especificidad de la enzima	Completa
Máx. cortes salteados permitidos	1
Modificaciones variables	Oxidación de Metioninas
Modificaciones fijas	Carbamidometilación de Cisteínas

El filtrado de los espectros asignados se realizó utilizando también *PatternLab for Proteomics*. Todos los resultados reportados poseen una tasa de falsos positivos FDR [False Discovery rate(FDR)] menor a 2% a nivel de péptidos y menor a 1% a nivel de

---

proteínas. Para comparar los proteomas obtenidos para la cepa FhaA y la cepa control (pLAM) se utilizaron los módulos *Project Organization* y *Approximate area proportional Venn Diagram* del software *PatternLab for Proteomics* respectivamente. Las proteínas presentes en las muestras se consideraron como exclusivamente representadas en una u otra condición si se encontraban presentes en al menos 2 de 3 réplicas de dicha condición pero en ninguna réplica de la otra.

Las proteínas presentes en ambas muestras pero que se encuentran sobre representadas en una u otra condición fueron analizadas utilizando el módulo *TC fold* del software *PatternLab for Proteomics*. Se consideraron aquellas proteínas presentes en al menos 3 réplicas en ambas condiciones.

#### **4.11. Identificación de interactores *in vivo* de FhaA.**

Para la identificación de los interactores *in vivo* de la proteína FhaA fue necesario la puesta a punto previa de una metodología que permitiera captar la mayor cantidad de interactores directos e indirectos de FhaA con relevancia biológica.

##### **4.11.1. Purificación por afinidad sin entrecruzamiento.**

Inicialmente se utilizó la purificación por afinidad de FhaA y sus posibles interactores para el análisis del interactoma. Para ello se partió de 3 cultivos líquidos de 300 ml de cada una de las cepas con el agregado de inductor como se describió anteriormente.

Se aplicó el protocolo número 2 para la obtención del extracto de proteínas y se realizó la cuantificación por densitometría previo a la purificación por afinidad. La proteína FhaA- Strep-tag® II, junto con sus interactores fueron purificados utilizando una columna de afinidad [Strep-Tactin Sepharose®,(IBA solutions)]. La mezcla de proteínas fue analizada mediante nano-HPLC acoplado a espectrometría de masa como se describió anteriormente. El análisis comparativo y la identificación de los interactores de FhaA se realizó utilizando el software Patternlab for Proteomics. Posteriormente, y como resultado del análisis de los resultados obtenidos utilizando esta aproximación, se implementó una estrategia de entrecruzamiento *in vivo*.

##### **4.11.2. Optimización del protocolo de entrecruzamiento con formaldehído.**

Para la optimización del protocolo de entrecruzamiento utilizando formaldehído se ensayó un rango de concentraciones entre 0.2% y 1.5% de este agente entrecruzante y

---

se utilizó un único tiempo de incubación de 20 min. La incubación se realizó a 37°C y 220 rpm. Posteriormente, se agregó al cultivo glicina en frío (concentración final 0.125 M) para inactivar al formaldehído. Los cultivos fueron nuevamente incubados 20 min a 37° C y 220 rpm. Pasado este tiempo se procedió a la obtención de los lisados según la metodología antes detallada.

Las muestras fueron calentadas a 65° durante 20 min previo a su separación por SDS PAGE, a los efectos de no revertir el entrecruzamiento. Se corrieron dos geles por muestra, uno de ellos fue fijado y teñido con azul de coomassie, mientras que el otro se utilizó para realizar un Western Blot según lo que se detalla a continuación.

#### **4.11.3. Western Blot.**

Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF de baja fluorescencia (GE, Healthcare) utilizando un equipo TE22 MiniTank (GE. Healthcare) a 4° C y 250 mA durante 2 hs. Las membranas fueron bloqueadas O.N. a 4° C utilizando 5% BSA, 0.1% Tween 20 en PBS. La membrana fue lavada con 0,1% Tween 20 en PBS, e incubó con el anticuerpo Strep MAB Classic conjugated horse radish peroxidase, (IBA solutions), en 1% BSA, 0.1% Tween 20 en PBS (dil 1/10000) durante 1 h 30 min. El revelado se llevó a cabo utilizando un equipo automático (Hyper procesosr, Amersham Biosciences) y el Kit Super signal West Pico Chemiluminiscent Substrate(Thermo).

#### **4.11.4. Interactoma de FhaA utilizando entrecruzamiento *in vivo*.**

Para la determinación del interactoma de FhaA se partieron de 5 cultivos líquidos de 300 ml de la cepa FhaA y de la cepa control. La inducción de los mismos fue realiza según las metodologías antes descritas. Luego de pasadas las 18hs de inducción, los cultivos fueron incubados con formaldehído 0.5% durante 20 minutos a 37° C y 220 rpm, siendo esta la condición seleccionada de acuerdo a la optimización del protocolo de entrecruzamiento (**Figura 4.2.**). Se obtuvieron los extractos de proteínas y se realizó la cuantificación por densitometría previo a la purificación por afinidad. Los complejos formados se purificaron utilizando una columna de afinidad [Strep-Tactin Sepharose®, (IBA solutions)] (**Figura 4.2.**). El procedimiento descrito por el fabricante se optimizó de manera de disminuir el pegado inespecífico a la columna aumentando el número de lavados y agregando Tritón X-100 (1%) al buffer de lavado. Finalmente para eluir FhaA

---

unida a sus interactores directos e indirectos se utilizó el buffer especificado por el fabricante.

Las muestras obtenidas se procesaron de dos maneras: Por un lado se realizó una digestión de las muestras en geles de poliacrilamida y alternativamente se utilizó la digestión de las muestras líquidas.

En el primer caso, las muestras obtenidas fueron concentradas en centrífuga de vacío, resuspendidas en Buffer de muestra 1X (0.25mM Tris, 8% SDS, 40% glicerol, 0.04% de azul de bromofenol, 1%  $\beta$  mercaptoetanol e incubadas a 95° C durante 5 minutos (a esta temperatura y tiempo de incubación se revierte el entrecruzamiento de manera de facilitar la entrada de proteínas al gel). Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida 12.5% y fueron corridas según los parámetros antes detallados únicamente 1 cm a lo largo del gel separador. La fijación, tinción y escaneo del gel para su registro se realizó como se detalló anteriormente.

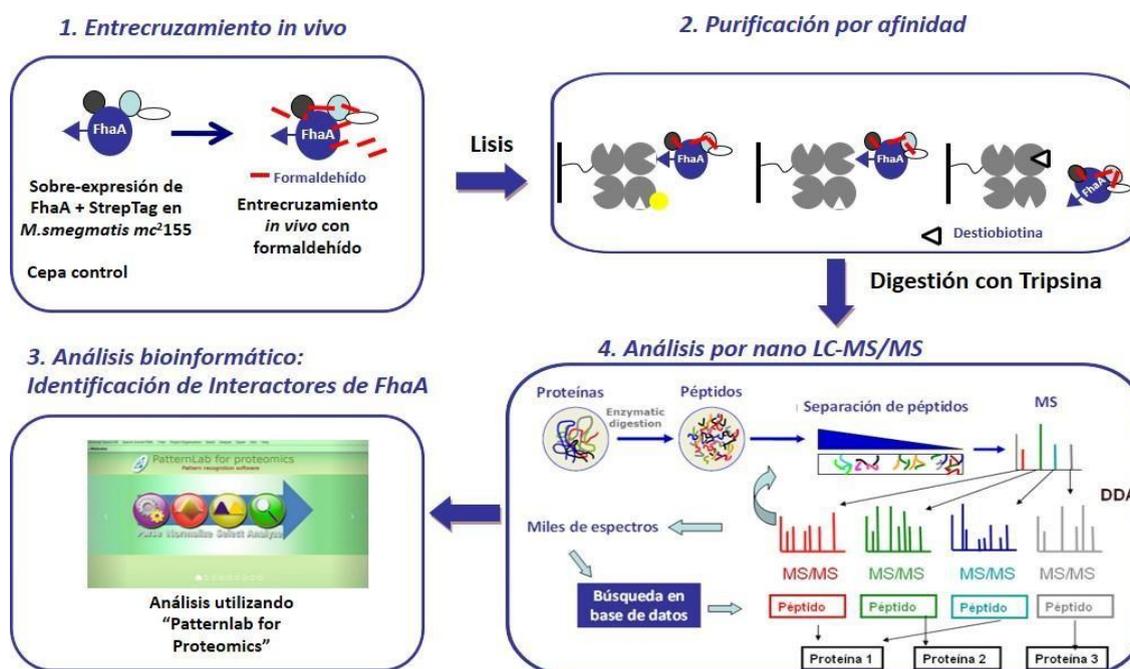
Cada banda fue desteñida, digerida y alquilada *in gel* previo a su digestión trípica del mismo modo que las muestras procesadas para el análisis del proteoma total. La extracción de los péptidos trípticos, así como el procesamiento final de concentrado y desalado, también se realizó siguiendo el procedimiento antes descrito.

Como se señaló anteriormente se utilizó también un protocolo de digestión en solución con el objetivo de evaluar la posible pérdida de proteínas de membrana que pudiesen precipitar en las etapas de preparación de la muestra para el gel.

Las muestras fueron reducidas y alquiladas en solución para luego ser concentradas en centrífuga de vacío. Finalmente, el *pellet* obtenido se resuspendió en 0.1% ácido fórmico y se sonicó durante 3 ciclos de 5 minutos. Posteriormente las muestras fueron desaladas en micro columnas de fase reversa C18 Zip Tip® (Merck, Millipore) previamente lavadas con ACN 50% y equilibradas con 0.1% de TFA. Se realizaron 2 lavados de los péptidos retenidos en la micro columna con 0.1% TFA. La elución de los péptidos se realizó con 0.1% de ácido fórmico en 100% ACN. Cada muestra se evaporó hasta sequedad en centrífuga de vacío y fue resuspendida en 0.1% de ácido fórmico repitiendo los 3 ciclos de sonicado. Los péptidos se separaron en un sistema nano-HPLC acoplado a un espectrómetro de masa LTQ Velos (Thermo Scientific) equipado con una trampa iónica lineal según lo descrito anteriormente (**Figura 4.2.**).

#### 4.11.5. Análisis bioinformático de los datos.

Finalmente se procedió a la identificación de las de proteínas que forman parte de los complejos por comparación de los datos obtenidos con bases de datos de secuencias, utilizando el programa “Patternlab for proteomics” y los módulos de análisis antes descritos (Figura 4.2.).



**Figura 4.2. Estrategia experimental para la identificación de interactores *in vivo* de FhaA.** La combinación de la sobre- expresión controlada de proteínas marcadas (etiquetas) con el uso de agente entrecruzantes para fijar por unión covalente las interacciones *in vivo* permite una mejor aproximación a las interacciones funcionalmente relevantes en la célula. 1. Entrecruzamiento *in vivo*, 2. Purificación de los complejos de proteínas formados por FhaA 3. Análisis por nano-HPLC- espectrometría de masa 4. Análisis bioinformático de los datos

#### 4.12. Expresión de una forma truncada de CwsA.

En colaboración con Mariano Martínez de la Unidad de Microbiología Estructural del Institut Pasteur de Paris y Magdalena Portela integrante de nuestro Laboratorio, se expresó y purificó una construcción de una forma truncada de CwsA de *M. smegmatis* que carece del segmento transmembrana C- terminal (CwsA Ms  $\Delta$ CT). La secuencia de la construcción se muestra a continuación (en color verde: secuencia Histag, en color negro: secuencia SUMO utilizada para purificar CwsA, en color rojo CwsA)

---

**CwsA\_de *M. smegmatis*, forma truncada (CwsA\_Ms\_DCT):**

MGHHHHHGGSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLR  
RLMEAFKRQKGEMDSLRFYLDGIRIQADQAPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGM  
PARADVRLAPRQRLTRGLKYTAVGPVDITRGLVIGADTAQATAAELRRRYAS  
GKLQRQLAAAEAVAALPETIQEAVQEVVSPPKRRRR

Células químicamente competentes (*Escherichia coli* BL21) se transformaron con el plásmido de expresión en condiciones de temperatura previamente optimizadas. Brevemente, los pellets de *Escherichia coli* BL21 cultivados en medio 2YT más antibiótico a diferentes temperaturas, se resuspendieron en tampón de lisis (tampón PBS NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, lysozime 1 mg / ml, benzonasa, cóctel inhibidor de proteasas, reactivo de extracción de proteína BugBuster®, Millipore) y se incubaron en agitación durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. La expresión total de la proteína fue evaluada mediante SDS-PAGE. Para obtener la fracción soluble, se utilizaron placas filtrantes Multiscreen, 0.6  $\mu$ m (Millipore) con 190  $\mu$ l de extracto total y se centrifugó durante 20 minutos a 3000 g. La fracción soluble se recuperó del flujo continuo y se analizó también mediante SDS PAGE. CwsA se purificó a partir de la fracción soluble utilizando cromatografía de afinidad IMAC (20  $\mu$ l de perlas de agarosa Ni-NTA). La elución se realizó usando imidazol 500 mM y se analizó por SDS PAGE. Para fines preparativos, se utilizó una temperatura de crecimiento de 22 °C. Los pellets de *Escherichia coli* se resuspendieron en tampón de lisis (tampón PBS NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM, Lysozime 1 mg / ml, benzonasa, cóctel inhibidor de proteasa, reactivo de extracción de proteína BugBuster®, Millipore) y se sonicaron 10 minutos (secuencia 1 min ON, 1 min OFF). Luego, los extractos se centrifugaron a 5000 g, 30 min a 4 °C. El sobrenadante, que contiene el extracto de proteína soluble, se recuperó. El extracto de proteína se cargó en una columna IMAC (Cromatografía de afinidad metálica inmovilizada) y la elución se realizó en un gradiente de imidazol de 20 a 500 mM. Las fracciones recuperadas se analizaron mediante SDS PAGE, y las que contenían la proteína de interés se dializaron y se trataron con SUMO proteasa. Las proteínas se purificaron adicionalmente en una columna de exclusión por tamaño y la proteína se eluyó en condiciones isocráticas. Las proteínas purificadas (pureza evaluada por SDS-PAGE) se alicuotaron y se almacenaron a 80 °C.

---

Por último se confirmó la identidad de la secuencia de la proteína recombinante CwsA utilizando espectrometría de masas MALDI TOF (Bruker) por comparación de los espectros obtenidos y sus fragmentaciones en comparación con espectros depositados en bases de datos públicas.

#### **4.13. Experimentos de Resonancia Plasmónica de Superficie.**

El experimento de Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR) fue llevado a cabo en colaboración con Federico Carrión integrante del Laboratorio de Inmunovirología del Institut Pasteur de Montevideo. Dicho experimento se realizó en un equipo Biacore 3000 (GE Healthcare) utilizando como buffer de corrida PBS adicionado con 0.005 % P20 (GE Healthcare). Brevemente, la proteína CwsA se inmovilizó en la superficie de un sensorchip CM5 (GE Healthcare) mediante unión covalente de grupos amino según recomendaciones del fabricante. Para la inmovilización, la superficie fue activada con una mezcla 1:1 de 0.2M N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) y 0.05M N-hydroxysuccinimide (NHS) a un flujo de 5  $\mu$ l/min. La proteína fue diluida en buffer Acetato Sodio 10 mM, pH 4.5. Posteriormente se inyectó sobre la superficie activadas y finalmente los grupos reactivos se inactivaron con una inyección de 1.0 M HCl- etanolamina, pH 8.5. La densidad obtenida fue de 140 RU (Unidades de respuesta) para CwsA. Disoluciones de FhaA a dos concentraciones diferentes (0.2 $\mu$ M y 0.4 $\mu$ M) se prepararon en buffer de corrida y se inyectaron sobre ambas superficies y una superficie control sin derivatizar. Los sensorgramas fueron obtenidos a 25°C con un flujo de 20 L/min, mediante sustracción de la señal de la superficie control y la señal obtenida de inyecciones de buffer de corrida sobre ambas superficies. Los datos obtenidos fueron procesados con el software BIAevaluation (GE Healthcare, versión 4.1) y re-graficados mediante la utilización de GraphPad Prism v.7.00.

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. FhaA es un sustrato de PknG.

Trabajos previos de nuestro grupo nos permitieron identificar a FhaA como un interactor directo de PknG, una Ser/Thr quinasa de *M. tuberculosis* que juega un papel fundamental en la sobrevivencia de la micobacteria en el hospedero. Con estos antecedentes decidimos evaluar si FhaA era un sustrato fosforilable por PknG siguiendo la estrategia que se muestra en la **Figura 4.1**. Inicialmente se produjo y purificó FhaA recombinante a partir de una cepa de *Mycobacterium smegmatis*. La cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 fue transformada con el plásmido pLAM12 conteniendo la región codificante del gen Rv0020c (*fhaA*) de *Mycobacterium tuberculosis*, más una secuencia de 8 aminoácidos (WSHPQFEK, (Strep-tag® II). La proteína fue purificada mediante cromatografía de afinidad utilizando un soporte con una variante de estreptavidina inmovilizada (columna de Strep-Tactin Sepharose®) que presenta afinidad por la secuencia del Strep-tag. Para la identificación de los sitios de fosforilación por PknG, la proteína inmovilizada fue tratada con fosfatasa alcalina con el fin de eliminar cualquier posible fosforilación *in vivo* por quinasas de proteínas presentes en la micobacteria, y posteriormente eluída y analizada por LC MS/MS luego de su digestión con tripsina. Este análisis permitió corroborar la secuencia de FhaA, y que ninguno de los péptidos asignados a esta secuencia estaba fosforilado. Finalmente la proteína recuperada fue incubada con PknG en presencia de ATP y Mn<sup>2+</sup>, de manera de permitir la reacción de fosforilación. El análisis posterior por espectrometría de masa de los péptidos trípticos nos permitió identificar de forma sistemática dos péptidos fosforilados <sub>14</sub>KLEQpT<sub>18</sub>VGDAFAR<sub>25</sub> (ion detectado con triple carga, m/z observado= 472.3) y <sub>108</sub>FEQSSNLHpT<sub>116</sub>GQFR<sub>120</sub> (ion detectado con doble carga, m/z observado= 816.2). Como se muestra en la **Figura 5.1.A**, los espectros de MS/MS permiten inequívocamente identificar a la T<sub>18</sub> y T<sub>116</sub> como los residuos fosforilados. La asignación de los fosfo-residuos se realizó también utilizando un algoritmo especialmente desarrollado para tal fin: phosphoRS. Este programa calcula, para cada “Peptide Spectrum Match” tres parámetros: 1. el “score” pRS que indica la probabilidad de que la asignación sea un evento aleatorio (pRS scores>50 generalmente se consideran buenas asignaciones); 2. Probabilidad de secuencia pRS: indica la probabilidad de que el sitio asignado sea correcto; y 3. probabilidad de sitio pRS: indica

---

la probabilidad de que cada residuo fosforilable en la secuencia sea el único fosforilado. Por lo tanto, se informa un valor de probabilidad del sitio pRS para cada Ser, Thr o Tyr en la secuencia. Por lo general, una probabilidad de sitio pRS superior al 75% para cualquier residuo se considera confiable (Taus, T. et al, 2011, Oehlenschläger, C. et al, 2017).

El análisis mediante el algoritmo pRS para un espectro representativo se muestra en la **Tabla 5.1.**, donde los valores obtenidos de pRS score fueron de 79 y 110 respectivamente; y 100% de probabilidad de pRS en cada caso. En ambos casos además se realizó la inspección manual de los espectros; la presencia de varios iones permite identificar de manera inequívoca a los fosforesiduos (T<sub>18</sub>: iones serie b: b<sub>5</sub><sup>+</sup>-b<sub>11</sub><sup>+</sup>; T<sub>116</sub>: iones serie y: y<sub>5</sub><sup>+</sup>; y<sub>6</sub><sup>+</sup>; y<sub>6</sub><sup>+</sup>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; y<sub>7</sub><sup>+</sup>; y<sub>8</sub><sup>+</sup>).

Para determinar posibles sitios de fosforilación *in vivo*, FhaA- Strep-tag purificada a partir de extractos de *M. smegmatis* se digirió con tripsina y los péptidos resultantes se separaron en un nano-HPLC y se analizaron mediante espectrometría de masa. Este análisis permitió identificar tres fosfopéptidos en la proteína FhaA, dos de ellos coincidentes con los previamente identificados en ensayos de fosforilación *in vitro* (<sub>14</sub>KLEQpT<sub>18</sub>VGDAFAR<sub>25</sub> (ion detectado con triple carga, m/z observado=472.1), <sub>108</sub>FEQSSNLHpT<sub>116</sub>GQFR<sub>120</sub> (ion detectado con doble carga, m/z observado =816.1)). Un tercer sitio de fosforilación *in vivo* fue detectado en este trabajo y corresponde al péptido <sub>368</sub>QDYGGGADYpT<sub>377</sub>R<sub>378</sub> (ion detectado con doble carga, m/z observado= 641.9) donde el residuo T<sub>377</sub> fue identificado como el sitio de fosforilación (**Figura 5.1.B**). El análisis mediante el algoritmo phosphoRS proporcionó los valores de pRS de 84, 106 y 91 respectivamente; y 100% de probabilidad de pRS en los casos de T<sub>116</sub> y T<sub>18</sub> y 99.5 en el caso de T<sub>377</sub> (**Tabla 5.1. y Tabla 5.2**).

A continuación, se muestran los datos referentes a los sitios de fosforilación de FhaA *in vitro* e *in vivo* encontrados en este trabajo.

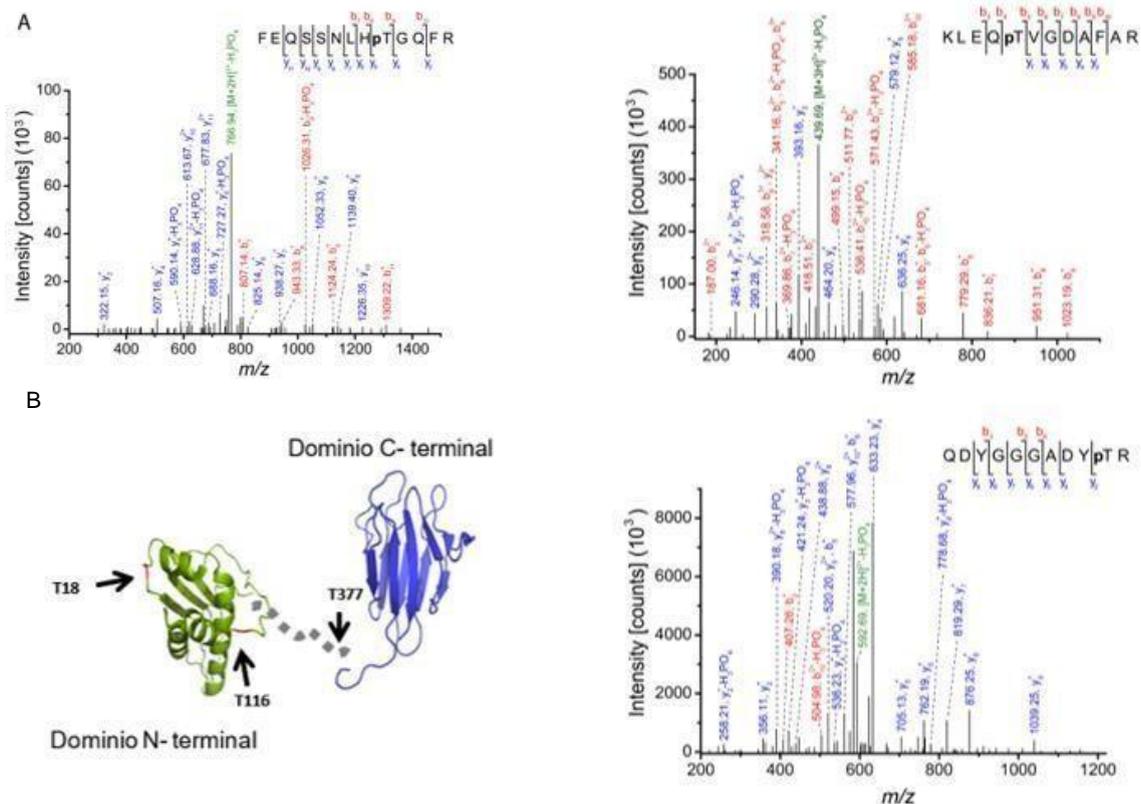
**Tabla 5.1.**

<b>Sitios de Fosforilación <i>in vitro</i> en FhaA de <i>M. tuberculosis</i></b>							
Secuencia	Residuo/Modificación	Probabilidad (pRS)	Probabilidad de sitio (pRS)	pRS Score	Xcorr	Carga	m/z (Da)
FEQSSNLH <b>p</b> TGQFR	T116(Phospho)	100.00%	S(4): 0.0; S(5): 0.0; T(9): 100.0	110	3.90	2	816.2
KLEQ <b>p</b> TVGDAFAR	T18(Phospho)	100.00%	T(5): 100.0	79	4.31	3	472.3

**Tabla 5.2.**

<b>Sitios de fosforilación <i>in vivo</i> en FhaA de <i>M. tuberculosis</i></b>							
Secuencia	Residuo/Modificación	Probabilidad (pRS)	Probabilidad de sitio (pRS)	pRS Score	Xcorr	Carga	m/z (Da)
FEQSSNLH <b>p</b> TGQFR	T116(Phospho)	100.00%	S(4): 0.0; S(5): 0.0; T(9): 100.0	106	4.35	2	816.1
KLEQ <b>p</b> TVGDAFAR	T18(Phospho)	100.00%	T(5): 100.0	84	4.25	3	472.1
QDYGGGADY <b>p</b> TR	T377(Phospho)	99.50%	Y(3): 0.0; Y(9): 0.5; T(10): 99.5	91	3.54	2	641.9

Nuestros resultados permiten afirmar que FhaA es sustrato *in vitro* de PknG y apuntan a un rol de esta quinasa en la fosforilación *in vivo* de FhaA ya que los residuos fosforilados por PknG también fueron detectados *in vivo*. Sin embargo, estos resultados no nos permiten concluir fehacientemente que FhaA sea un sustrato fisiológico de PknG.



**Figura 5.1. Identificación de sitios de fosforilación de FhaA por espectrometría de masa (Imágenes tomadas de Gil, M., Lima, A., Rivera, B., Manuscrito enviado a Journal of Proteomics, Julio 2018). A) Identificación de sitios de fosforilación de FhaA *in vitro*.** FhaA fue purificada de *M. smegmatis*, desfosforilada con fosfatasa alcalina y re-fosforilada utilizando PknG como quinasa. El análisis por espectrometría de masa reveló dos secuencias fosforiladas en el dominio N- terminal de FhaA. Los residuos fosforilados en ambos péptidos fueron inequívocamente identificados por MS/MS como T<sub>18</sub> y T<sub>116</sub>. **B) Identificación de los sitios de fosforilación de FhaA *in vivo*.** Izquierda: localización de los sitios de fosforilación identificados en la estructura de FhaA. FhaA presenta un dominio N-terminal de función desconocida y un dominio C-terminal FHA unidos por una secuencia de aproximadamente 300 residuos. Los dos residuos identificados *in vitro* se ubican en el dominio N-terminal. Un tercer sitio de fosforilación ubicado en la región “linker” entre los dominios N- y C- terminal fue identificado solamente *in vivo* (T<sub>377</sub>) Derecha: espectro MS/MS correspondiente al péptido QDYGGGADYpT<sub>377</sub>R donde la T<sub>377</sub> se identifica como el sitio de fosforilación.

## 5.2 Caracterización fenotípica y proteómica de la cepa que sobreexpresa FhaA.

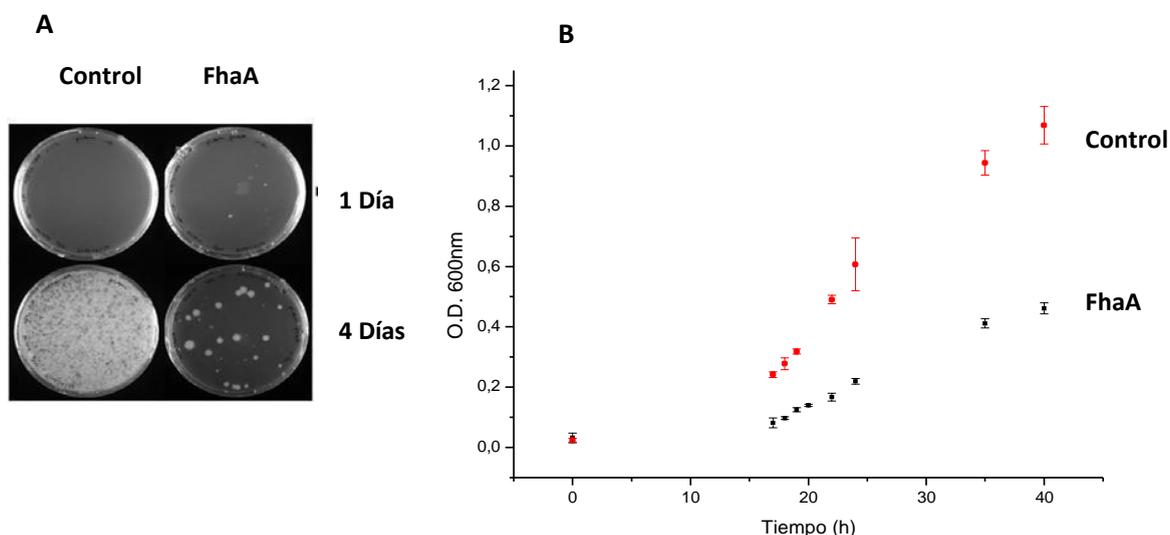
Para estudiar el interactoma de FhaA, se utilizó *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 transformada con el plásmido pLAM12 conteniendo la región codificante del gen Rv0020c (*fhaA*) de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv, más una secuencia de 8 aminoácidos (Strep-tag® II) (denominada en este trabajo cepa FhaA). Como control se utilizó *M. smegmatis* transformada únicamente con el plásmido pLAM12. Para realizar una caracterización

---

inicial de la cepa a utilizar, se analizó el efecto de la sobre-expresión de FhaA en el crecimiento y la morfología de *M. smegmatis*. Por otro lado, como la cepa FhaA se utiliza para el aislamiento y caracterización de complejos multi-proteicos en los que esta proteína se encuentra involucrada, evaluamos si la sobre-expresión del gen Rv0020c introducía cambios importantes a nivel del proteoma y que pudiesen invalidar el modelo experimental.

### **5.2.1. La sobre-expresión de FhaA produce un cambio en la velocidad de crecimiento de la micobacteria.**

Con el fin de determinar posibles diferencias en la morfología macroscópica o en el patrón de crecimiento, inicialmente se realizaron cultivos en medio sólido 7H10 de ambas cepas los cuales fueron inducidos y se comparó el crecimiento entre las 24 y 96 h. Los resultados mostraron que la cepa FhaA crece en forma más lenta, detectándose algunas colonias después de 4 días de incubación. En el caso de la cepa control se observa crecimiento a partir de las 48 h., mientras que a las 96 h se observan placas con crecimiento confluyente. Con el fin de confirmar los cambios en la velocidad de crecimiento ocasionados por la sobre-expresión de FhaA, se realizaron las curvas de crecimiento de ambas cepas en presencia de acetamida, agente inductor de la sobre-expresión. Para ello se registró la densidad óptica a 600 nm hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria en medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con albúmina-dextrosa-NaCl (ADC), Tween® 80 y conteniendo kanamicina. Al alcanzar una  $D.O_{600nm}=0.2$ , se agregó el agente inductor. Los resultados obtenidos muestran que la velocidad de crecimiento de ambas cepas en presencia de inductor es diferente. La comparación de las curvas de crecimiento de la cepa control y la cepa FhaA en presencia de acetamida muestra un cambio en la pendiente y una clara diferencia en la  $D.O_{600nm}$  máxima alcanzada a las 40 hrs. Estos resultados revelan una disminución en la velocidad de crecimiento de la micobacteria cuando se sobre-expresa el gen Rv0020c. Las curvas de crecimiento de ambas cepas en presencia de acetamida se muestran en la **Figura 5.2**.



**Figura 5.2. Efecto de la sobreexpresión de FhaA sobre el crecimiento celular. Panel A)** Crecimiento de *M. smegmatis* en medio 7H10 suplementado con albúmina- dextrosa-NaCl y kanamicina. *Izquierdo:* cepa transformada con vector pLAM12 vacío (cepa control) después de un día (superior) o cuatro días (inferior) de incubación a 37 °C. *Derecha:* cepa transformada con vector pLAM12 conteniendo gen *fhaA* (cepa FhaA) después de un día (superior) o cuatro días (inferior) de incubación a 37 °C. **Panel B)** Curva de crecimiento de la cepa FhaA y cepa control en presencia de acetamida (inductor de la expresión de *fhaA*). Los cultivos fueron realizados en medio 7H9 Middlebrook suplementado con albúmina- dextrosa-NaCl, 0.05% Tween® 80 y kanamicina.

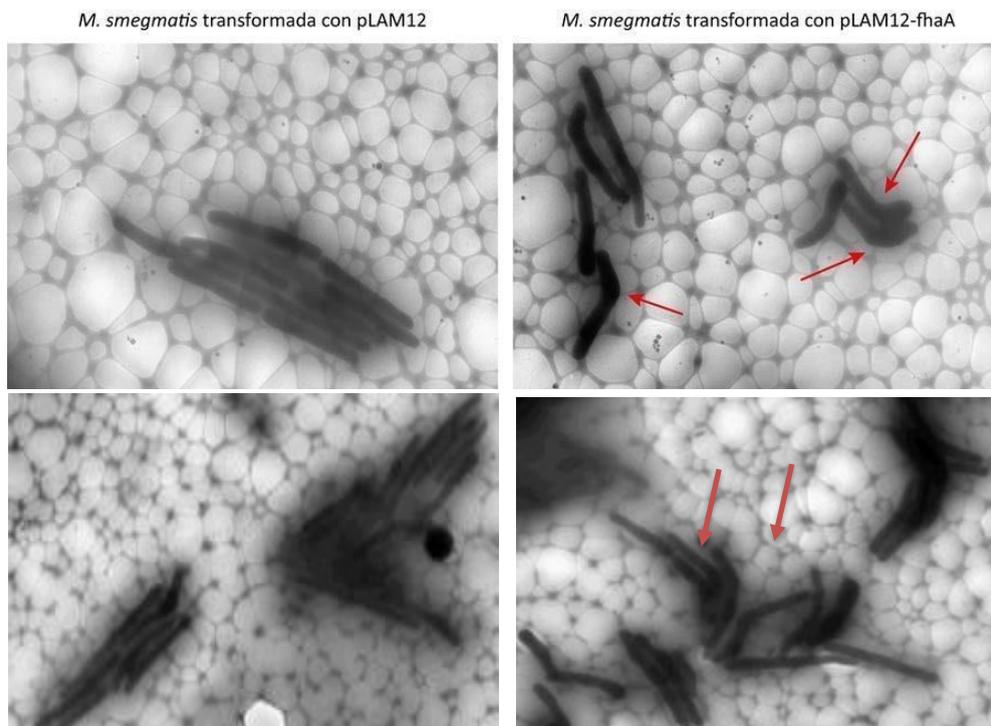
En el caso de los cultivos en medio líquido se observó la presencia en forma sistemática de un halo resultante de la ruptura de biopelículas en la interface medio-aire. Es interesante destacar que la consistencia de estas estructuras era diferente en ambas cepas, sugiriendo que la cepa FhaA podría tener algún defecto en la formación de biopelículas o biofilms.

### 5.2.2. La sobre-expresión de FhaA produce una alteración en la morfología celular.

Si bien la morfología macroscópica de las colonias obtenidas por cultivo en medio sólido de ambas cepas parece idéntica, para ahondar en la comprensión de los resultados obtenidos a partir de las curvas de crecimiento en medio líquido, se realizó la observación de las bacterias inicialmente por criomicroscopía electrónica de transmisión en experimentos realizados en colaboración con la Dra. Annemarie Wehenkel de la Unidad de Microbiología Estructural del Institut Pasteur de Paris (Paris, Francia) y el Dr. Sylvain Tréput del Institut Curie (Orsay, Francia). El análisis de las imágenes permitió identificar

---

la presencia de bacterias con una morfología aberrante, caracterizada por el engrosamiento de los polos bacterianos, así como por la deformación del cuerpo bacteriano (bacilos en forma de “palo de golf”) señalada con flechas rojas en la imagen. La **Figura 5.3.** muestra las imágenes obtenidas tanto para las cepa FhaA como para la cepa control.



**Figura 5.3. Imágenes de criomicroscopía electrónica de transmisión.** Izquierda: Cepa control. Derecha: Cepa FhaA. Cultivos líquidos en 7H9 Middlebrok suplementado con albúmina-dextrosa-NaCl, Tween® 80 y kanamicina. Al alcanzar los cultivos una DO<sub>600nm</sub> de 0.05 se indujo la expresión de FhaA. Las células se colectaron luego de 18 horas y se congelaron en presencia de bolitas de oro. *Imágenes adquiridas* por Annemarie Wehenkel, Unidad de Microbiología Estructural del Institut Pasteur de Paris.

Para corroborar estos resultados utilizamos microscopía electrónica de transmisión utilizando tinción negativa, y realizando las tomas de imágenes con mayor magnificación de manera de poder analizar más en detalle los defectos antes señalados. En las micrografías obtenidas para la cepa FhaA puede observarse un claro defecto en la morfología de la micobacteria, donde resalta el engrosamiento del bacilo hacia los polos celulares. En la micrografía a mayor magnificación además se observa una bacteria con una morfología sugerente de una división aberrante, ya que puede apreciarse el septo de división celular el cual no termina de cerrarse lo que provoca el fenotipo observado en ambas micrografías. Cabe destacar que la mayoría de las bacterias que se pudieron

observar de la cepa FhaA presentaban estas características, ausentes en las bacterias observadas para la cepa control. Los resultados obtenidos nos permiten corroborar que la sobre-expresión de la proteína FhaA provoca defectos en la morfología celular, y sugieren que dicha proteína participa en los procesos de síntesis de la pared y/o división celular de la micobacteria como había sido previamente propuesto (Gee, C. L.,2012).

La **Figura 5.4.** muestra las imágenes obtenidas para las cepas FhaA y control, teñidas negativamente.

*M. smegmatis* transformada con pLAM12  
(Cepa control)

*M. smegmatis* transformada con pLAM12-fhaA  
(Cepa FhaA)



**Figura 5.4. Microscopía electrónica de transmisión de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 cepa control. Derecha: Microscopía electrónica de transmisión de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 cepa FhaA.** Magnificación 15.000X y 80.000X. Los cultivos de *M. smegmatis* cepa control y cepa control fueron lavados y diluidos con PBS. Una alícuota fue cargada en una grilla de carbón/formvar realizándose luego una tinción negativa utilizando acetato de uranilo al 2%.

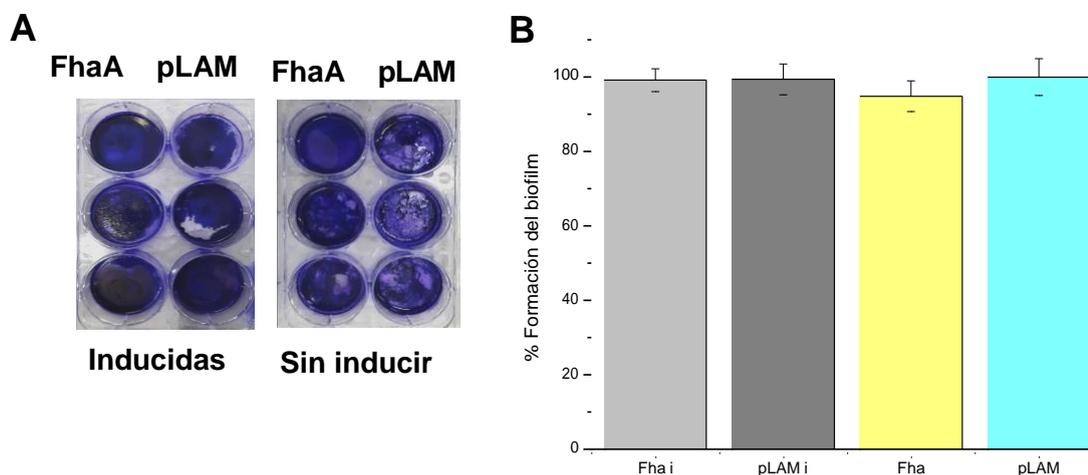
### 5.2.3. La sobre-expresión de FhaA no afecta la capacidad de formación de biofilms.

Nuestros resultados previos sugieren que la cepa FhaA podría tener un defecto en la capacidad de formar biofilms. Por este motivo y para continuar con la caracterización fenotípica de la cepa que sobre-expresa la proteína FhaA se analizó el efecto de su sobre-expresión sobre la formación de biofilms. En la **Figura 5.5.** se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de formación de biofilms para las cepas FhaA y control en presencia y ausencia de acetamida, utilizando triplicados para cada condición. La formación de dichas “estructuras” fue evidenciada mediante la tinción con cristal violeta. La posterior cuantificación fue realizada a partir de medidas de absorbancia a 570 nm en un fotómetro de placas como se detalló en el apartado materiales y métodos.

Nuestros resultados indican que la cepa que sobre-expresa FhaA no presenta alteraciones en la capacidad de formación del biofilm, ya que no existen diferencias significativas entre

---

las diferentes condiciones analizadas.



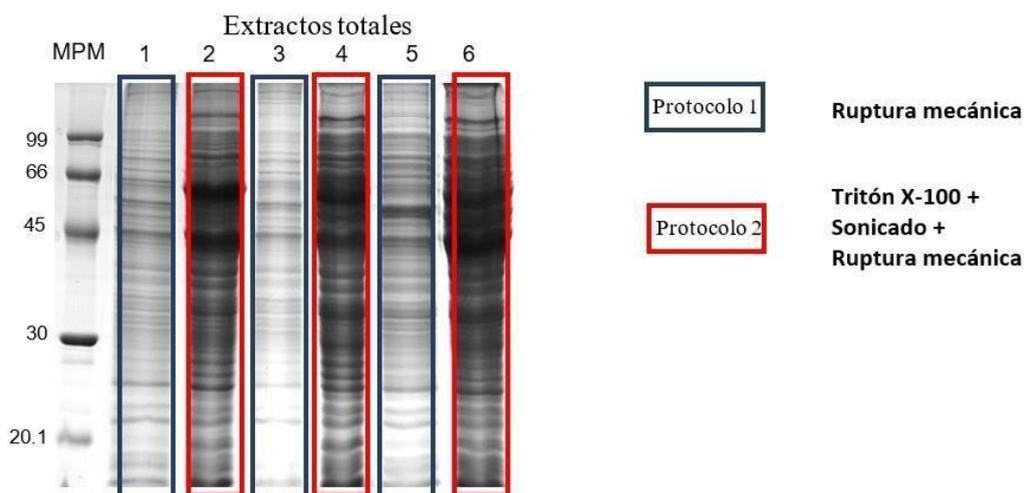
**Figura 5.5. Efecto de la sobre-expresión de FhaA sobre la formación de biofilms.** Panel A). Triplicados de cultivos de la cepa FhaA y la cepa control fueron llevados a cabo en placas de 12 pocillos por triplicado e incubados a 37° C durante 3 semanas. Los biofilms formados para dichos cultivos fueron lavados y teñidos con cristal violeta 0.1% en etanol. Posteriormente, los mismos fueron recogidos de las placas utilizando una solución de ácido acético 30% para su cuantificación. Panel B) En el gráfico se representan el porcentaje de la absorbancia a 570 nm de los biofilms de cada cepa con respecto a la cepa control sin inducir expresado como % formación de biofilm. Se realizaron los análisis por triplicado; las barras de error representan el desvío estándar. Fha i y pLAM i, representan los gráficos obtenidos para la cepa FhaA y la cepa control inducidas respectivamente. Fha y pLAM representan los gráficos obtenidos para la cepa FhaA y cepa control sin inducir respectivamente.

#### 5.2.4. Efecto de la sobre-expresión de FhaA en el proteoma celular.

Con el fin de realizar los análisis proteómicos comparativos, en primer lugar se optimizó el método de extracción de proteínas. Un método ampliamente utilizado es la ruptura mecánica utilizando perlas de vidrio, lo cual permite romper los agregados característicos que se forman en los cultivos micobacterianos (denominados “clumps”) así como su compleja envoltura celular. (Grange, J.M., Yates, M.D., De Kantor, I.N., 1996). Sin embargo en experimentos preliminares obtuvimos cantidades de proteínas totales menores a las esperadas, por este motivo se modificó este protocolo y se compararon los resultados obtenidos. Para ello se procedió realizar cultivos de prueba de la cepa FhaA, cosechar las células y extraer las proteínas, usando tres replicas biológicas en cada caso. Los extractos fueron cargados en un gel monodimensional junto a un marcador de peso molecular del cual se conoce la concentración de cada una de las proteínas que lo conforman, y posteriormente se realizó un análisis densitométrico para cuantificar las proteínas totales presentes en cada extracto proteico obtenido mediante

cada uno de los métodos de ruptura celular probados.

En la **Figura 5.6.** se muestra el gel utilizado para la densitometría. El mismo revela diferencias notorias a simple vista en cantidad de proteínas obtenidas en cada caso, lo que se verifica mediante la cuantificación por densitometría. En la **Tabla 5.3.** se muestran los resultados de la cuantificación de proteínas totales, así como el desvío estándar.



**Figura 5.6.** Gel utilizado para el análisis por densitometría de los extractos totales de dos cultivos de la cepa FhaA cuya extracción de proteínas fue llevada a cabo mediante dos protocolos diferentes. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por densitometría a partir de la utilización de geles SDS-PAGE 12% y un kit de proteínas. MPM: marcador de peso molecular; Carriles 1, 3 y 5: réplicas de extractos de proteínas obtenidos utilizando el protocolo de ruptura mecánica. Carriles 2, 4 y 6: réplicas de extractos de proteínas obtenidos utilizando el protocolo de ruptura mecánica y sonicado.

**Tabla 5.3. Determinación de la concentración de proteínas en los extractos de la cepa FhaA obtenidos mediante dos protocolos diferentes.**

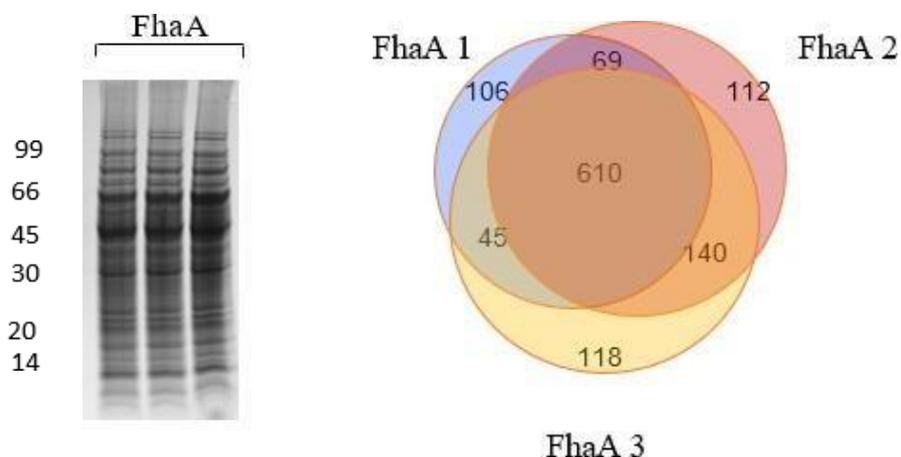
Modo de ruptura	Concentración de proteínas ( $\mu\text{g/l}$ )
Mecánica con perlas de vidrio	$0.80 \pm 0.20$
Sonicación + Ruptura mecánica (Triton X-100)	$1.8 \pm 0.050$

Los resultados obtenidos para los diferentes protocolos de extracción de proteínas indican que cuando se utiliza un paso de sonicado seguido de ruptura mecánica con perlas de vidrio en presencia de detergente (Protocolo 2) se obtienen mejores rendimientos de proteínas, partiendo de cultivos realizados en condiciones idénticas, mismo inóculo de partida y densidad óptica, así como peso húmedo de los *pellets* obtenidos post-centrifugación comparable.

---

Por lo tanto, se seleccionó este método para la obtención de los extractos celulares (tres réplicas biológicas de cada cepa) para realizar los análisis proteómicos. Estos extractos de proteínas fueron primero separados en geles monodimensionales y posteriormente cada banda fue recortada, digerida con tripsina y los péptidos resultantes analizados por LC MS/MS (ver **Figura 5.7.**).

El análisis por espectrometría de masa de estas réplicas junto con el análisis bioinformático utilizando el software PatternLab for Proteomics, y sus módulos *Project Organization* y *Approximate area proportional Venn Diagram* permitieron identificar 830, 931 y 913 proteínas para las réplicas 1, 2 y 3 de la cepa FhaA respectivamente, considerando como mínimo dos péptidos por proteína y un FDR<1% a nivel de proteínas. Además de haberse obtenido réplicas con un número de proteínas totales similar, 610 proteínas se identificaron en las 3 réplicas, lo que deja de manifiesto la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

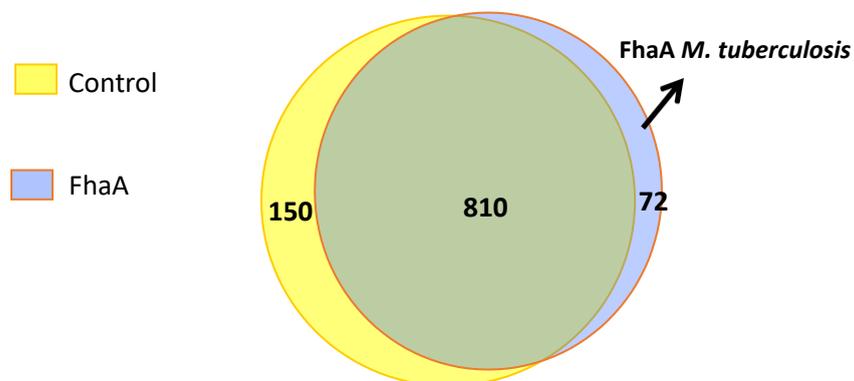


**Figura 5.7. Izquierda: SDS-PAGE.** Gel monodimensional de los extractos de proteínas obtenidos para la cepa FhaA para cada una de sus réplicas. **Derecha: Diagrama de Venn de proteínas totales identificadas utilizando PatternLab for Proteomics en tres réplicas biológicas de la cepa FhaA**

Para identificar las proteínas diferenciales entre la cepa FhaA y cepa control se utilizó nuevamente el software PatternLab for Proteomics, y los módulos antes descritos. Las proteínas se consideraron como exclusivamente representadas en una u otra condición si se encontraban presentes en al menos 2 de 3 réplicas de dicha condición pero en ninguna réplica de la otra. Utilizando este criterio se identificaron 810 proteínas comunes a ambas cepas, mientras que 150 proteínas se identificaron sólo en el control

---

y 72 proteínas sólo en FhaA (**Figura 5.8**).



**Figura 5.8. Caracterización proteómica de la cepa FhaA.** Se analizó y comparó el proteoma de la cepa Control y la cepa FhaA utilizando 3 réplicas biológicas de cada una. Se encontraron 810 proteínas comunes, 150 proteínas sólo en la cepa control y 71 proteínas sólo en la cepa FhaA. Las proteínas diferenciales, a excepción de FhaA, fueron identificadas con un bajo número de espectros.

La gran mayoría de las proteínas diferenciales entre ambas cepas (ver **Anexo 1**) se identificaron con un bajo número de espectros. Por ejemplo la proteína “Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase 1” se identifica solo en FhaA, en 2 de 3 réplicas pero con 7 espectros en total, mientras que para el caso de la proteína FhaA el número de espectros detectado es 1026. Es importante destacar que el análisis de muestras complejas utilizando una aproximación de nanoLC acoplada a espectrometría de masa usualmente se encuentra asociada a problemas de muestreo, donde una señal puede o no ser seleccionada para su fragmentación en forma dependiente de los datos. Diferencias en proteínas identificadas con bajo número de espectros son usualmente encontradas en análisis proteómicos, sin embargo, se necesita evidencia adicional para saber si reflejan diferencias reales en niveles de expresión.

Por lo tanto, considerando aquellas proteínas identificadas con más de 20 espectros (sumando los espectros de todas las réplicas de esa condición); sólo se detectan 7 proteínas exclusivamente en FhaA y 32 proteínas solo en la cepa control. Las diferencias a nivel del proteoma considerando sólo las proteínas detectadas en una u otra condición se resumen en las **Tablas 5.4 y 5.5**. La lista de proteínas que se encontraron sobre-representadas en la cepa FhaA se tuvo en cuenta a la hora de analizar los complejos aislados, considerando la posibilidad de que su recuperación fuese una consecuencia de un pegado inespecífico debido a sus niveles elevados de expresión y no de la interacción específica con FhaA.

**Tabla 5.4. Proteínas detectadas sólo en la cepa FhaA.**

Identificador UNIPROT	Nro. De réplicas	Nro. De espectros	Descripción
P71590	3	1062	Fha A M.tuberculosis (strain H37Rv)
A0QYH7	3	45	LysM domain protein
A0R3V8	3	41	Amino-acid acetyltransferase
A0QXA1	2	27	Ferredoxin-dependent glutamate synthase
A0R4L1	3	24	DNA-binding response regulator PhoP
A0QWK5	3	23	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
A0QQY3	2	20	Transcriptional regulator, XRE family

**Tabla 5.5. Proteínas detectadas sólo en la cepa control.**

Identificador UNIPROT	Nro. De réplicas	Nro. De espectros	Descripción
A0R2V431	3	200	Uncharacterized protein
A0QUM5	3	120	Uncharacterized protein
A0QZ96	3	81	Universal stress protein family protein
A0R478	3	72	Putative universal stress protein UspA
A0R2V2	3	71	LuxR family two-component response regulator
A0QUM7	3	69	Hydrogenase-2, large subunit
A0QVQ8	3	67	Alanine dehydrogenase
A0R4B3	3	60	Acyl-acyl-carrier protein desaturase DesA1
A0R609	3	48	Catalase-peroxidase 1
A0R2J4	3	41	Helix-turn-helix motif
A0QRB0	3	35	Immunogenic protein MPB64/MPT64
A0R343	2	35	Amidate substrates transporter protein
A0R2V1	3	32	Helix-turn-helix motif
A0QPN1	3	32	Topoisomerase subunit TopoM
A0R2C3	3	31	Bacterial extracellular solute-binding protein
A0R087	3	28	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase
A0QW19	3	28	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase
A0R5R9	3	27	Trypsin
A0QZA2	3	27	Uncharacterized protein
A0QX80	3	26	Uncharacterized protein
A0QZ83	3	25	14 kDa antigen
A0QQK0	3	24	Phosphate acetyltransferase

A0QQD0	3	24	Chaperone protein DnaJ
A0R4D8	2	24	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase
A0QRD5	3	23	Uncharacterized protein
A0R1R5	2	22	Transcriptional regulator, TetR family
A0R627	2	22	Putative decaprenylphosphoryl-5-phosphoribose phosphatase
A0R584	3	21	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylidihydropteridine pyrophosphokinase
A0QPX4	3	21	ABC nitrate/sulfonate/bicarbonate transporter, ATPase subunit
A0QSM3	2	21	Cutinase
A0QPJ9	2	21	Hsp20/alpha crystallin family protein
A0R4E0	3	20	Amidophosphoribosyltransferase

Para cuantificar la sobre-expresión de FhaA de *M. tuberculosis* consideramos el número de espectros totales asignados a diferentes secuencias de esta proteína y lo comparamos con el número de espectros asignados a FhaA de *M. smegmatis* en la cepa control, considerando éstos como los niveles basales de expresión de dicha proteína. El número de espectros que se asigna a una proteína está relacionado con su abundancia y por tanto nos permite comparar los niveles relativos de la misma en distintas condiciones. Para ello utilizamos el parámetro NSAF (Normalized Spectral Abundance Factors). El NSAF de FhaA se define como número de espectros que se asignan a su secuencia (SpC, el número total de espectros MS/MS) dividido la longitud de la proteína (L), dividido la suma de SpC/L de todas las otras proteínas identificadas en el experimento. La utilización de dicho parámetro permite relativizar el número de espectros obtenidos a la masa molecular de FhaA de *M. smegmatis* o *M. tuberculosis*, y así evitar la sobre- estimación en el cambio de aquellas proteínas que generan mayor número de péptidos (**Tabla 5.6.**).

$$(\text{NSAF})_{\text{FhaA}} = \frac{(\text{SpC}/L)_{\text{FhaA}}}{\sum_{i=1}^N (\text{SpC}/L)_i}$$

En nuestro caso es importante utilizar esta corrección ya que la región “linker” de FhaA de *M. smegmatis* es más corta que la de *M. tuberculosis*. Mediante la comparación de los valores obtenidos para FhaA de *M. tuberculosis* expresada en *M. smegmatis*, y los valores endógenos de FhaA de *M. smegmatis* en la cepa control estimamos que la sobre-expresión

---

de FhaA Strep-tag® II es aproximadamente 67 veces respecto a la cepa control.

**Tabla 5.6. Factor de normalización de abundancia en un espectro (Normalized Spectrum Abundance Factor (NSAF)) determinados para FhaA en las distintas muestras.**

Muestra	NSAF	Promedio	Cociente
FhaA 1(Msmeg) Cepa control	0.00023	0.00021 ± 0.000020	67
FhaA 2(Msmeg) Cepa control	0.00018		
FhaA 3(Msmeg) Cepa control	0.00021		
FhaA 1 (Mtb)	0.013	0.014± 0.0020	
FhaA 2(Mtb)	0.012		
FhaA 3(Mtb)	0.016		

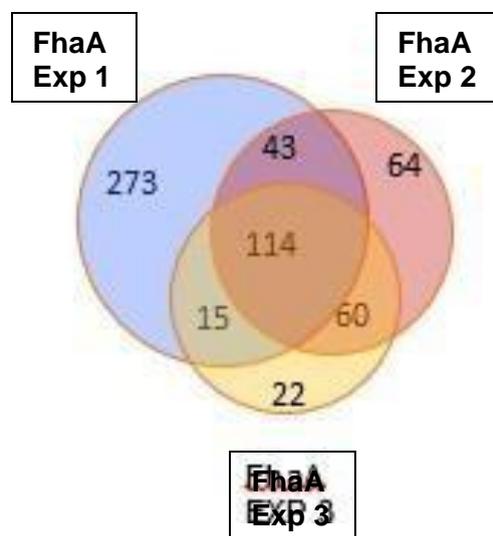
### 5.3 Interactoma FhaA.

#### 5.3.1. Interactoma de FhaA sin entrecruzamiento.

Para obtener el conjunto de proteínas interactores de FhaA de *M. tuberculosis* se utilizaron 3 extractos independientes de la cepa FhaA. Mediante cromatografía de afinidad se purificó FhaA junto con sus posible interactores a partir de estos extractos y se realizó además el mismo procedimiento con 3 extractos de la cepa control de manera de poder identificar proteína que interaccionan con el soporte utilizado y poder de manera certera definir el interactoma de FhaA.

Las proteínas eluidas en cada caso fueron identificadas mediante el análisis de los péptidos trípticos por nano-HPLC acoplado a espectrometría de masa.

El análisis entre réplicas de la cepa FhaA de diferentes experimentos llevados a cabo de la misma forma permitió identificar 445, 281 y 211 proteínas considerando como mínimo 2 péptidos y un FDR<1% a nivel de proteínas. Además de haberse obtenido réplicas con un número de proteínas totales diferente, sólo 114 proteínas se presentaban como comunes en las tres réplicas analizadas. Estos resultados sugieren una baja reproducibilidad del método utilizado (**Figura 5.9.**).



**Figura 5.9. Diagrama de Venn de proteínas interactoras identificadas utilizando “PatternLab for proteomics” en tres réplicas experimentales de la cepa FhaA.** Se identificaron 445, 281 y 211 proteínas usando un criterio de máxima parsimonia de las cuales sólo 114 proteínas se identificaron en todas las réplicas.

Para definir la lista de proteínas que podrían representar interactores específicos de FhaA se compararon las identificaciones realizadas usando los extractos de proteínas de las cepas FhaA y control. Las proteínas se consideraron como exclusivamente presentes en una u otra condición si se identificaban en al menos 2 de 3 réplicas de dicha condición pero en ninguna réplica de la otra. Utilizando este criterio se identificaron 224 proteínas comunes a ambas cepas, mientras que 130 proteínas se identificaron sólo en el control y 4 proteínas sólo en FhaA. Cabe destacar que si bien el método de purificación utilizado está especialmente diseñado para recuperar específicamente proteínas con Strep-tag, también se recuperan proteínas que se encuentren biotiniladas, que constituyen las proteínas más abundantes entre aquellas identificadas en ambas cepas. Solamente cuatro proteínas fueron recuperadas exclusivamente a partir de los extractos de la cepa FhaA, y una de ellas es la propia FhaA, que se indentifica en las 3 réplicas de la cepa FhaA con un gran número de espectros asignados a su secuencia (Anexo II). Si bien las otras tres proteínas representan interactores putativos de FhaA, solamente una de ellas se encontró en las tres réplicas de la cepa FhaA, y en ningún caso se recuperó el único interactor reportado de FhaA, la proteína Mvin. Este hecho podría explicarse

---

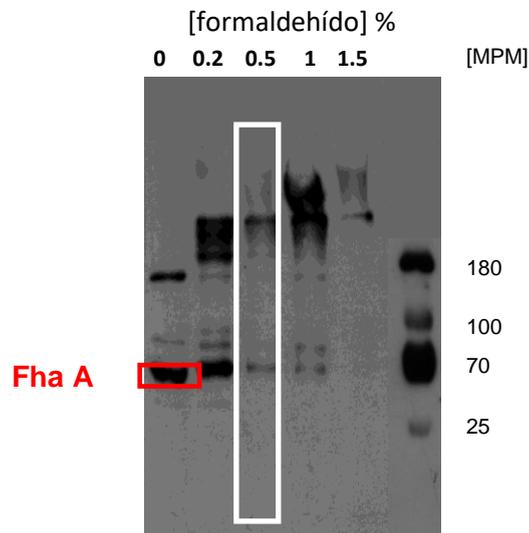
quizás porque este interacto es una proteína de membrana y por tanto es difícil de recuperar utilizando esta aproximación. Todo lo anteriormente expuesto indica que la estrategia experimental utilizada no nos estaba permitiendo identificar en forma confiable interactores directos o indirectos de FhaA. Una de las desventajas más importantes del estudio de un interactoma utilizando afinidad es la detección sistemática de falsos positivos, ya sea por interacciones que se pueden generar luego de la ruptura de la célula, como por interacciones inespecíficas con los soportes sólidos utilizados, sumado al uso de un método muy sensible para detectar las proteínas. A su vez interactores fisiológicos que presenten baja afinidad o interacciones transitorias, así como interacciones con proteínas de membrana, son difíciles de detectar. Por este motivo, utilizamos una estrategia alternativa donde se incorporó un paso de entrecruzamiento *in vivo* con formaldehído.

### **5.3.2. Interactoma de FhaA utilizando entrecruzamiento con formaldehído.**

La combinación de la sobre expresión de FhaA marcada con una etiqueta (Strep-tag II) con el uso de agentes entrecruzantes para fijar por unión covalente las interacciones *in vivo* se utilizó como una aproximación para estudiar interacciones funcionalmente relevantes en la micobacteria. Para ello se utilizó como agente entrecruzante formaldehído, ya que éste compuesto es capaz de penetrar fácilmente en la compleja pared celular de la micobacteria y unir proteínas que están en contacto próximo (Lougheed, K.E., M.H. Bennett (2014)).

#### **5.3.2.1. Puesta a punto de entrecruzamiento de proteínas *in vivo* con formaldehído y su análisis por espectrometría de masa.**

Para poner a punto la cantidad de formaldehído a utilizar en los cultivos, se utilizaron cultivos de la cepa FhaA los cuales fueron incubados con diferentes concentraciones del agente entrecruzante según lo detallado en el apartado Materiales y métodos. Luego de la obtención de los extractos, los mismos se separaron en geles monodimensionales y se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo anti-Strep-tag II recombinante (**Figura 5.10.**).



**Figura 5.10. Western Blot anti Strep-tag II de extractos de la cepa FhaA.** Cultivos de la cepa FhaA fueron incubados con diferentes concentraciones de agente entrecruzante. Luego de la lisis, purificación de los extractos y gel SDS-PAGE, la transferencia de proteínas fue realizada en un equipo de transferencia TE22 MiniTank (GE. Healthcare). Las membranas fueron bloqueadas O.N. previo a la incubación con el anticuerpo Strep MAB Classic conjugated horse radish peroxidase, (IBA solutions). El revelado se llevó a cabo de forma automática utilizando el Kit Super signal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo).

En la figura se observa que al aumentar la concentración de agente entrecruzante desaparece gradualmente la banda de FhaA y comienzan a aparecer bandas a pesos moleculares mayores. Usando una concentración de formaldehído de 0.2% se observa la presencia de bandas de mayor peso molecular, sin embargo la intensidad de la banda de FhaA prácticamente no cambia. Por otro lado, utilizando concentraciones mayores de 1% disminuye la señal total, debido probablemente a la formación de complejos de gran tamaño que no entran en el gel. Por este motivo, se seleccionó como concentración de trabajo 0.5% de formaldehído.

Una vez optimizada la estrategia del entrecruzamiento se prosiguió con la estrategia para la obtención y análisis de los complejos formados *in vivo*.

Se analizaron los complejos aislados utilizando entrecruzamiento mediante dos aproximaciones diferentes, utilizando tres réplicas biológicas de cada cepa para cada caso. Por un lado los complejos purificados fueron previamente separados en un gel monodimensional para luego ser analizados por LC MS/MS. Alternativamente los complejos aislados fueron digeridos en solución y analizados mediante LC MS/MS.

Un primer resultado interesante que surge de este análisis es la presencia de Mvin en 4 de las 6 réplicas de complejos mediados por FhaA analizados, pero en ninguno de los controles. En particular este interactador ya reportado se identificó en las tres muestras digeridas en solución, y en una de las réplicas separadas previamente en geles. Este resultado nos indica por un lado que el uso de un agente entrecruzante *in vivo* nos permitió recuperar interactores fisiológicos de FhaA, y por otro lado que la digestión en solución era una mejor estrategia para la identificación de los interactores de FhaA, ya que permitía la identificación de un mayor número de proteínas, y recuperar en forma reproducible el único interactador reportado de FhaA (proteína Mvin). Los resultados se muestran en la **Tabla 5.7**.

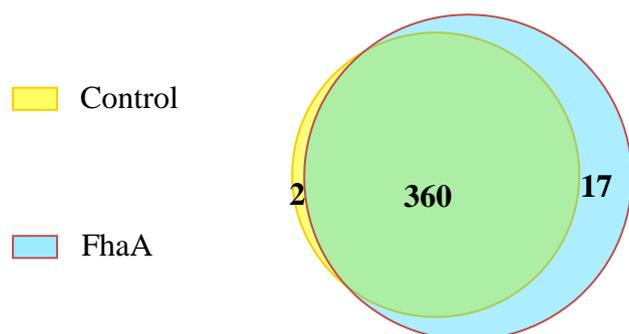
**Tabla 5.7. Comparación de los resultados obtenidos utilizando diferentes métodos de digestión para la optimización del protocolo.**

	N° de proteínas ID en FhaA (promedio en tres réplicas)	N° de réplicas donde se detecta Mvin	N° total de espectros asignados a Mvin
<b>Digestión en solución</b>	38	3	56
<b>Digestión en gel</b>	30	1	37

### 5.3.2.2. Interactoma de FhaA utilizando entrecruzamiento *in vivo*

Para caracterizar el interactoma de FhaA *in vivo* se identificaron y compararon las proteínas recuperadas a partir de las cinco replicas biológicas la cepa FhaA, y 5 réplicas de la cepa control. Se definió el interactoma FhaA considerando las proteínas presentes en al menos cuatro réplicas de FhaA y ausentes en todas las réplicas del control. Utilizando el Software PatternLab for Proteomics se identificaron 17 proteínas exclusivamente detectadas en los complejos purificados a partir de la cepa FhaA, las cuales representan posibles interactores directos o indirectos de FhaA. Por otro lado, 360 proteínas se identificaron a partir de los extractos de ambas cepas, y son por tanto resultantes del pegado inespecífico y la co-purificación con FhaA de proteínas de *M. smegmatis* endógenamente biotiniladas. (**Figura 5.11**).

La lista de proteínas diferenciales para la cepa FhaA se presenta en la **Tabla 5.8**.



**Figura 5.11. Interactoma *in vivo* de Fha A: Proteínas identificadas exclusivamente en los complejos aislados de la cepa FhaA.** “*PatternLab for proteomics*” se utilizó para comparar las proteínas recuperadas de cinco replicas biológicas de cada condición. Para definir el interactoma FhaA se consideran las proteínas presentes en al menos cuatro réplicas de FhaA y ausentes en todas las réplicas del control. 17 proteínas se identifican exclusivamente en la cepa FhaA y representan posibles interactores directos o indirectos de FhaA.

**Tabla 5.8. Proteínas exclusivamente identificadas en los complejos aislados de la cepa FhaA.**

Identificador	Nº réplicas	Nº espectros	Descripción	Proteínas en fracción de membrana (Mycobrowser. epfl.ch)	Proteínas de membrana (UNIPROT)
P71590	5	2194	Fha A M.tuberculosis (strain H37Rv)		
A0QP93	5	101	Uncharacterized protein	X	X
A0R5R5	5	80	Cyclopropane fatty-acyl-phospholipid synthase	X	ND
A0R316	5	62	Uncharacterized protein		ND
<b>A0R715</b>	<b>5</b>	<b>56</b>	<b>Integral membrane protein (MviN)</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
A0R1Z9	5	50	ATP synthase epsilon chain	X	X
A0QSL0	5	45	Thioredoxin reductase	X	
A0QRP7	4	32	TROVE domain protein		ND
A0QQI4	4	30	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	X	ND
A0QW27	4	28	Methionine-R-sulfoxide reductase	X	ND
A0QNF5	5	27	Cell wall synthesis protein CwsA	X	X
A0QZ12	4	27	Polyprenol monophosphomannose synthase	X	X
A0QS52	4	22	ABC1 family protein	X	ND
A0R1H3	4	19	Antioxidant, AhpC/TSA family protein	X	X

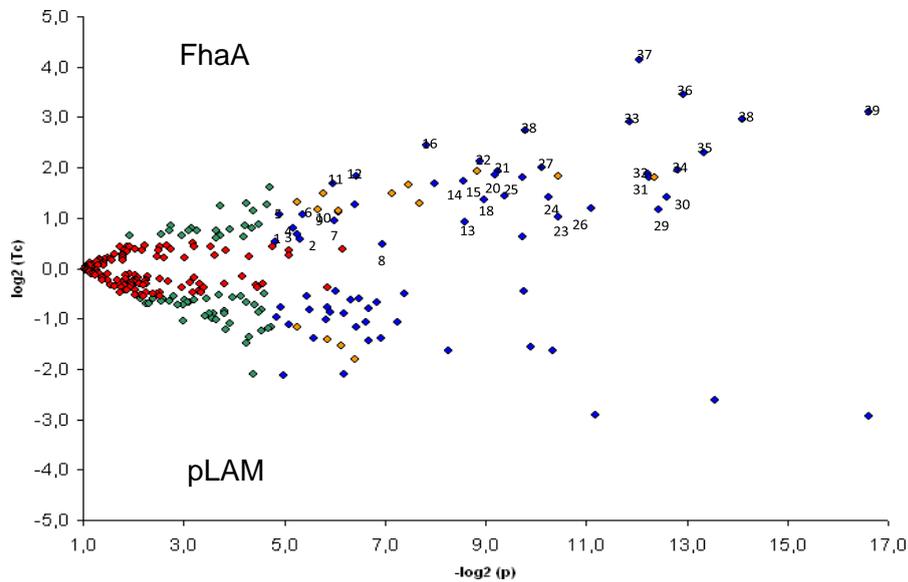
A0R157	4	15	Saccharopine dehydrogenase	X	ND
A0QQF4	4	13	Putative conserved secreted protein	X	X
A0QSL1	4	11	SPFH domain / Band 7 family protein	X	X

Una de las proteínas identificadas con mayor número de espectros, y en las 5 réplicas de la cepa FhaA, es Mvin, el único interactor previamente reportado de FhaA, lo que valida nuestra estrategia experimental.

Por otra parte, evaluamos la abundancia relativa de aquellas proteínas presentes en ambas cepas de manera de poder definir otros posibles interactores directos o indirectos de la proteína FhaA. Se ha demostrado que esta estrategia cuantitativa resulta útil para identificar interactores que también se unen al soporte sólido (Trinkle-Mulcahy L, et al, 2008).

Para ello se realizó un análisis utilizando el *módulo TC fold* del software PatternLab for Proteomics. Este módulo permite realizar la comparación del número de espectros asignados a cada proteína y en cada una de las réplicas de las distintas condiciones. El número de espectros asignados a una determinada proteína representa una medida de la abundancia relativa de la misma en la mezcla (Liu, Z. et al, 2004).

Los resultados se muestran en el gráfico de tipo volcán en el cual se correlacionan la tasa de cambio y la significancia estadística para cada proteína involucrada, siendo cada una de éstas representada por un punto de color (**Figura 5.12**). Las proteínas representadas en rojo y verde no cumplen con la significancia estadística, mientras que las proteínas marcadas en azul y naranja satisfacen tanto con el criterio de tasa de cambio como con el estadístico (**Figura 5.12**). En particular las proteínas indicadas con azul se consideraron como diferenciales entre ambas condiciones, mientras que las proteínas indicadas con naranja, si bien cumplen también con ambos criterios, se identifican con bajo número de espectros y por lo tanto requieren una validación experimental adicional.



**Figura 5.12. Interactoma de FhaA. Análisis cuantitativo de las proteínas identificadas en ambas condiciones.** Alguno de los inerectores de FhaA podría ser detectado también en la cepa control debido al pegado inespecífico y a la utilización de un método muy sensible como es la espectrometría de masa. Por ello se analizaron los niveles de las proteínas comunes a ambas condiciones usando conteo de espectros. Aquellas proteínas sobre-representadas en FhaA en forma estadísticamente significativa se consideran también como parte del interactoma. Se muestra el “*Volcano plot*” generado utilizando el módulo “*TC fold*” del programa “*PatternLab for proteomics*” donde se representa  $\log_2(\text{tasa de cambio})$  (eje y) en función de  $\log_2(p)$  (eje x). Cada punto en el gráfico representa una proteína identificada. Las proteínas indicadas por puntos rojos no satisfacen el criterio de tasa de cambio, las verdes no satisfacen el criterio estadístico. Las proteínas indicadas en azul y en naranja satisfacen ambos criterios. Debido al bajo número de espectros, las diferencias en las proteínas marcadas en naranja requieren validación experimental. Las proteínas identificadas en azul se consideran posibles interactores directos o indirectos de FhaA. La identidad de estas proteínas (de acuerdo a la numeración en la figura) se lista de en la **Tabla 5.9**.

**Tabla 5.9. Proteínas identificadas en ambas cepas, sobrerrepresentadas en forma estadísticamente significativa en los complejos proteicos aislados de la cepa que sobre-expresa FhaA.**

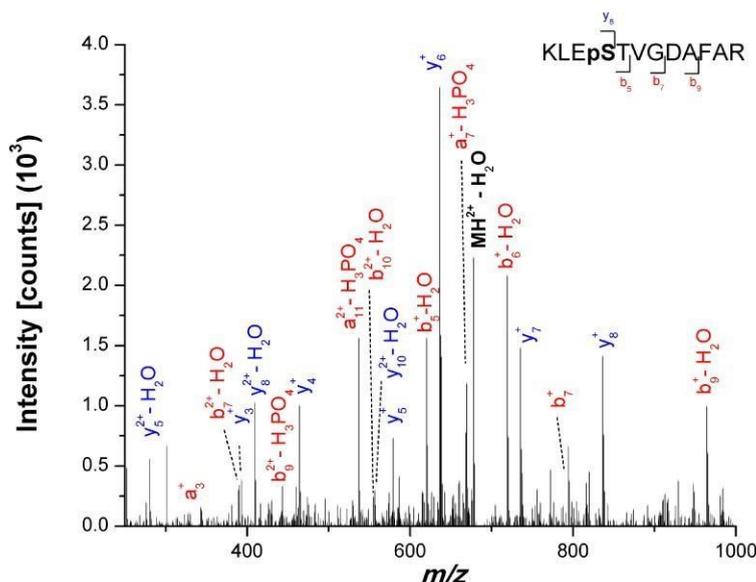
Nº	Identificador	Tasa de cambio	valor p	Descripción	Proteínas en fracción de membrana (Mycobrowser.epfl.ch)	Proteínas de membrana (UNIPROT)
1	A0R342	1,44	3,52E-02	Formamidase		ND
2	A0R1E4	1,48	2,51E-02	Short-chain dehydrogenase	X	ND
3	A0QP11	1,59	2,61E-02	Metallopeptidase MSMEG_0234	X	ND
4	A0R3Y5	1,75	2,74E-02	Enoyl-CoA hydratase	X	ND
5	A0QYD5	2,10	3,29E-02	Putative luciferase-like oxidoreductase	X	ND
6	A0R577	2,08	2,41E-02	Lysine--tRNA ligase	X	
7	A0R0R9	1,92	1,56E-02	Glycine--tRNA ligase	X	
8	Q50441	1,40	8,07E-03	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD	X	ND
9	A0QWQ4	2,15	1,47E-02	Alanine--tRNA ligase	X	
10	A0R012	2,39	1,18E-02	Cell division protein FtsZ	X	
11	A0R203	3,21	1,59E-02	ATP synthase subunit b-delta	X	X
12	A0QYD6	3,55	1,16E-02	Membrane NADH dehydrogenase NdhA	X	X
13	A0QSV0	1,90	2,61E-03	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	X	ND
14	A0QVU2	3,23	3,95E-03	35 kDa protein	X	ND
15	A0R461	3,34	2,62E-03	Luciferase-like protein	X	ND
16	A0R051	5,49	4,37E-03	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	X	X
17	A0QQC8	1,55	1,18E-03	Chaperone protein DnaK	X	ND
18	A0QYW6	2,57	1,99E-03	Universal stress protein family protein, putative	X	ND
19	A0R033	2,73	1,51E-03	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase AroG 1	X	X
20	A0QVM4	3,60	1,71E-03	Transcription termination/antitermination protein NusA	X	
21	A0R3N8	3,83	1,65E-03	Succinate semialdehyde dehydrogenase	X	ND
22	A0QNJ7	4,39	2,13E-	Conserved hypothetical	X	ND

			03	proline and alanine rich protein		
23	A0QR89	2,04	7,11E-04	Geranylgeranyl reductase		ND
24	A0R4J1	2,65	8,12E-04	Phosphoribosylamine--glycine ligase	X	ND
25	A0QQB0	3,52	1,18E-03	Iron-sulfur cluster-binding protein	X	X
26	A0R202	2,27	4,54E-04	ATP synthase subunit alpha	X	X
27	Q9AFI5	4,04	8,91E-04	Single-stranded DNA-binding protein	X	ND
28	A0QV18	6,66	1,12E-03	Uncharacterized protein		ND
29	A0R006	2,25	1,82E-04	Cell wall synthesis protein Wag31	X	
30	A0R200	2,68	1,60E-04	ATP synthase subunit beta	X	X
31	A0QQJ4	3,49	2,06E-04	F420-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase	X	ND
32	A0QR91	3,71	2,11E-04	Cyclohexanone monooxygenase		ND
33	A0R588	7,53	2,66E-04	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	X	X
34	A0QX24	3,85	1,38E-04	ATPase, MoxR family protein	X	ND
35	A0QP27	4,90	9,71E-05	Drug exporters of the RND superfamily-like protein	X	X
36	A0R201	10,85	1,29E-04	ATP synthase gamma chain	X	X
37	A0QNG7	17,70	2,35E-04	FHA domain protein (FhaA <i>M. smegmatis</i> )	X	ND
38	A0QVL2	7,73	5,65E-05	Probable malate:quinone oxidoreductase	X	ND
39	A0QPE7	8,57	1,00E-05	3-oxoacyl-acyl-carrier protein reductase FabG4	X	ND

---

Cabe destacar que una de las proteínas recuperadas junto con FhaA de *M. tuberculosis* fue FhaA de *M. smegmatis*. Entre las secuencias identificadas de FhaA de *M. smegmatis*, se encontraba al péptido KLESTVGDAFAR fosforilado, donde la Ser19 es el residuo que mas probablemente se encuentra modificado. La secuencia KLES<sub>19</sub>TVGDAFAR corresponde a la secuencia KLEQT<sub>18</sub>VGDAFAR de FhaA de *M. tuberculosis*, la cual fue detectada como fosforilada *in vivo* en la FhaA de *M. tuberculosis* producida en *M. smegmatis*. La identificación de este sitio de fosforilacion en la FhaA endógena, con niveles normales de expresion podría señalar que el mismo representa un verdadero sitio de fosforilación *in vivo* (**Figura 5.13**).

También encontramos la proteína Wag31 (proteína relacionada a la síntesis de elementos de la pared de la micobacteria) y Ftsz (involucrada en la división celular y en el reclutamiento del divisoma).



**Figura 5.13. Sitio de fosforilación *in vivo* de FhaA de *M. smegmatis*.** Espectro MS/MS de la secuencia KLEpSTVGDAFAR. Se indican los iones del fragmento C-terminal (azul) y N-terminal (rojo) asignados a la secuencia. Los iones que presentan pérdida neutra debido a la fosforilación están indicados. La presencia de un ion intenso correspondiente a  $y_8 +$  sugiere fuertemente que la Ser<sub>19</sub> representa un sitio fosforilado en la secuencia.

Considerando las proteínas detectadas solamente en los complejos aislados de la cepa FhaA (Tabla 5.8.), y aquellas proteínas que estando presentes en ambas situaciones están enriquecidas en los complejos aislados a partir de la cepa FhaA (Tabla 5.9.), se elaboró una lista de 55 proteínas que constituye el interactoma de FhaA.

Cabe destacar además que un número importante de las proteínas identificadas en el interactoma de FhaA corresponden a proteínas de membrana (identificadas en la Tabla 5.8). lo cual podría explicar en parte porque no se obtuvieron resultados con la estrategia sin entrecruzamiento.

Un primer análisis de las proteínas encontradas en el interactoma de FhaA nos permite evidenciar la presencia entre los interactores de proteínas que participan en dos procesos relacionados y vitales para la micobacteria: la división celular (por ejemplo CwsA, Wag 31, FtsZ, FtsH) y la síntesis de elementos de la envoltura celular (Mvin, CwsA, Uncharacterized protein -A0QP93, Polyprenol monophosphomannose synthase, Cyclopropane fatty-acyl-phospholipid synthase). Mvin es el único interactor caracterizado de FhaA y se ha descrito que el complejo Mvin-FhaA participa en la biosíntesis de la pared celular de micobacterias, a través de la regulación de la síntesis del péptidoglicano (Gee, C. L., et al. 2012). Dentro de los nuevos interactores de FhaA identificados en este trabajo encontramos a la proteína CwsA, la cual participa en el

---

proceso de división celular, e interacciona con Wag31 y CrgA (dos proteínas también relacionadas con la síntesis de péptidoglicano). Esta última proteína se reporta en la literatura como proteína interactora de FtsZ, otra proteína de gran relevancia en la división celular. Por su parte la proteína Wag31 se asocia al proceso de formación del péptidoglicano en el septo de división (Polcinski, P., et al., 2012). En este sentido es interesante destacar que la proteína Wag31 así como la proteína FtsZ también forman parte del interactoma de FhaA definido en este trabajo. Otra proteína que también encontramos en nuestro interactoma es la proteína FtsH la cual se postula interactúa con FtsZ regulando los niveles de ésta (Kiran et al., 2011).

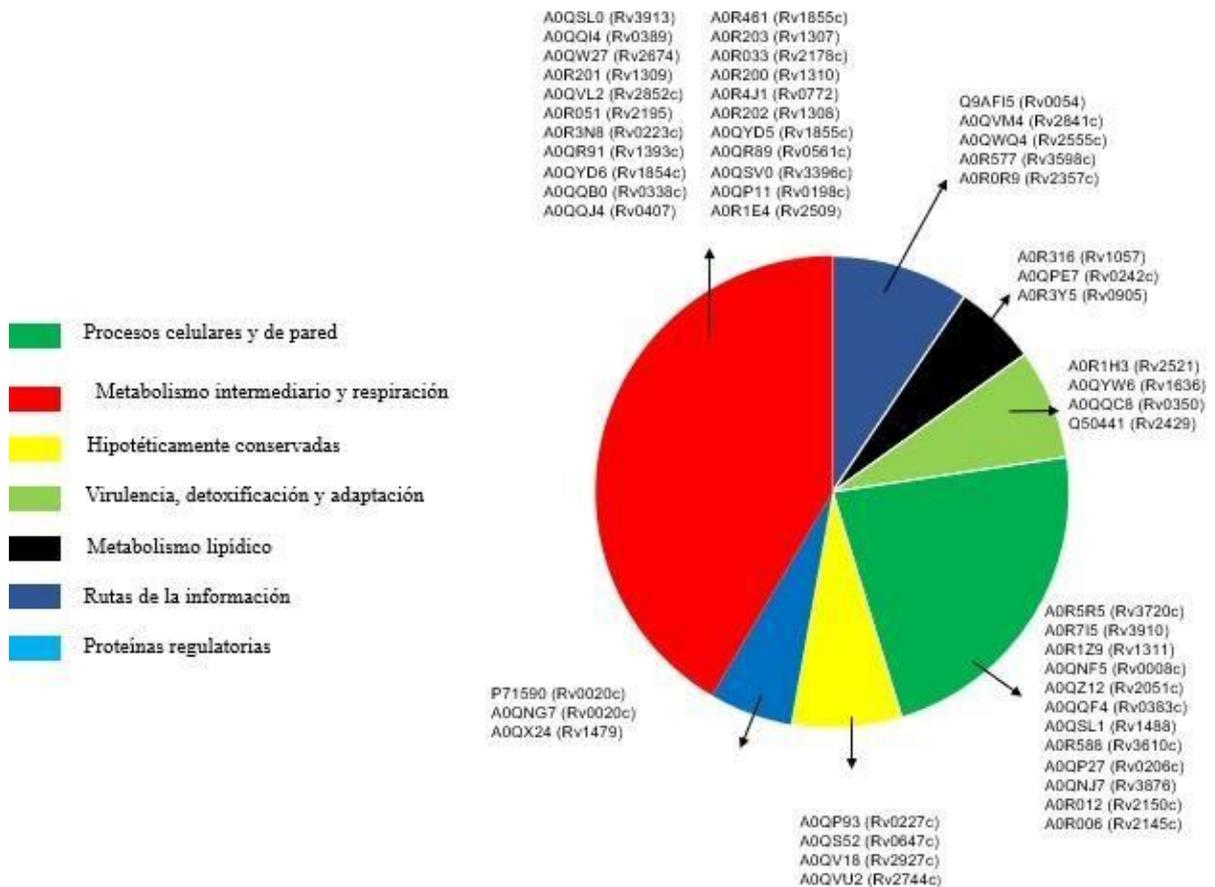
Estos resultados, por un lado, nos confirman que utilizando la estrategia experimental propuesta estamos identificando proteínas que interaccionan entre sí *in vivo* de acuerdo a reportes previos. Además, la identificación de proteínas que participan en la división celular está de acuerdo tanto con datos de trabajos previos, como con las observaciones realizadas previamente en este trabajo.

Por otro lado, identificamos en el interactoma de FhaA proteínas relacionadas a la biosíntesis de otros componentes de la envoltura celular de la micobacteria. En particular, la proteína A0R5R5, una sintasa de ácidos micólicos (Grover, S., et al, 2016). Otro de los interactores identificados con mayor número de espectros es la proteína de membrana antes nombrada (A0QP93), y descrita en la base de datos como proteína no caracterizada. Esta proteína juega un rol fundamental en la elongación de la cadena principal de mananos tanto en mycobacterias como en corinebacterias (Cashmore et al, 2017).

Además identificamos como interactor de FhaA a la “Polyprenol monophosphomannose synthase” que participa en la síntesis de lipoarabinomananos, actuando como donante de unidades de poliprenil-fosfomanosa para las glicosiltransferasas durante la etapa de ramificación del precursor PIM4 (Ac<sub>1</sub>/Ac<sub>2</sub>) tanto para la formación de PIM6(Ac<sub>1</sub>/Ac<sub>2</sub>) como para la obtención de estructuras maduras de lipomananos y lipoarabinomananos, tal y como se describió en la introducción en el apartado Envoltura celular (Gurcha, S.S, et al, 2002).

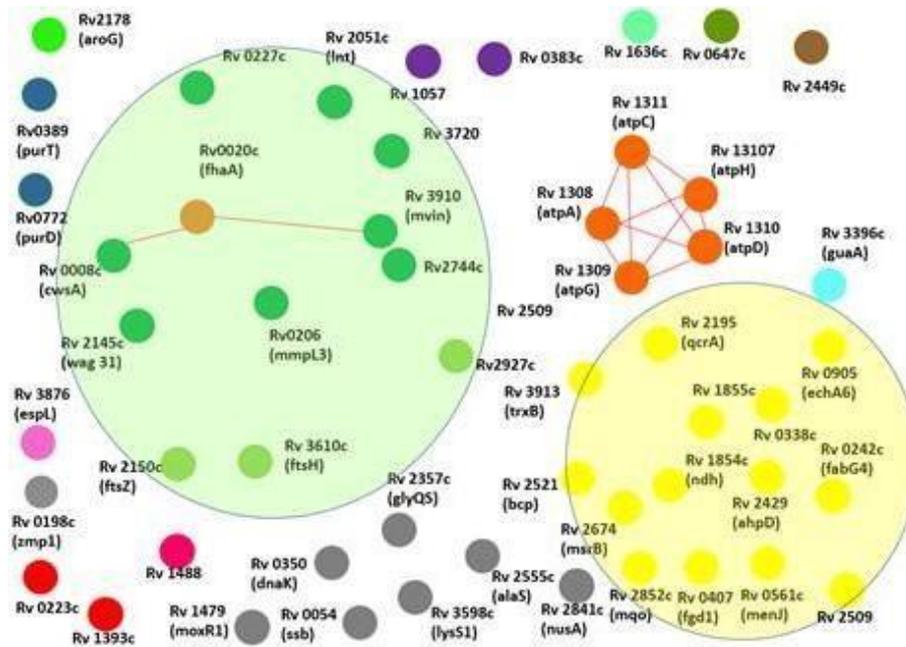
En su conjunto estos resultados nos permiten postular que FhaA participa en los procesos de división celular y síntesis de componentes de la pared de la micobacteria. Con el fin de determinar si FhaA participa en otro tipo de procesos, el grupo de proteínas identificadas como interactores se analizó utilizando diferentes softwares, y fueron clasificadas según los procesos en los que participan, sus características funcionales, ubicación celular, etc. Utilizando el Software libre Panther ([www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org)), la base

de datos Mycobrowser (<http://mycobrowser.epfl.ch>) y determinando la proteína homóloga en *Mycobacterium tuberculosis* se clasificaron inicialmente los interactores de FhaA según su categoría funcional. Como se observa en el gráfico de la **Figura 5.14**. La mayoría de las proteínas participan en procesos vinculados al metabolismo intermediario y la respiración, así como a procesos celulares y de la pared celular.



**Figura 5.14. Gráfico circular mostrando la clasificación funcional de los interactores de FhaA.** Utilizando la base de datos Mycobrowser (<http://mycobrowser.epfl.ch>) y determinando la proteína homóloga en *Mycobacterium tuberculosis* es posible clasificar las proteínas de las tablas 5.8 y 5.9 según su categoría funcional. Como se observa en el gráfico la mayoría de las proteínas presentes participan en procesos vinculados al metabolismo intermediario y la respiración, así como a procesos celulares y de la pared celular.

De la misma forma utilizando el Software String (String.org) y recopilando la información con los softwares antes descritos, se analizó el grupo de interactores así como los procesos en los que participan. Los resultados obtenidos mediante este análisis se muestran en la **Figura 5.15**



**Figura 5.15. Análisis de los procesos en los que participan los interactores de FhaA.** Utilizando los software Panther ([www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org)) y String ([String.org](http://String.org)) se realizó un enriquecimiento funcional y un análisis de interacciones, con el objetivo de clasificar los 55 interactores de FhaA código de colores: Verde: división celular y síntesis de componentes de la envoltura celular; Amarillo: procesos redox; Gris: ligasas de aminoácidos al ARNt; Naranja: subunidades del ATP. Los datos muestran la recuperación de proteínas que son capaces de interactuar entre si, y que están asociadas fundamentalmente a dos procesos: división celular y síntesis de componentes de la envoltura celular (verde); y procesos redox (amarillo).

Este análisis nos permitió observar que además de la biosíntesis de componentes de la envoltura celular, la proteína FhaA puede vincularse también con otro proceso relevante para la célula, como es la homeostasis redox.

Es interesante notar que entre las proteínas redox encontradas está la proteína FabG, la cual participa también en la síntesis de componentes de la envoltura celular, y en particular se encuentra relacionada al crecimiento ante condiciones de escasez de fuentes de carbono (Beste et al, 2009).

Dentro del grupo de proteínas redox identificadas otras proteínas presentes son la tiorredoxina reductasa (A0QSL0) y la alquil-hidroperóxido reductasa (AhpC (A0R1H3), AhpD (Q50441). En particular estas proteínas se vinculan en primer lugar con la resistencia a fármacos actuando como potentes sistemas de detoxificación.

#### 5.4. CwsA es un interactor directo de la proteína FhaA.

Los resultados anteriores apuntan claramente a que FhaA cumple un rol importante en la división celular, y nos permite postular que las proteínas identificadas que participan en ese proceso podrían representar interactores directos/indirectos de FhaA. Con el fin de validar interactores seleccionamos a la proteína CwsA y utilizamos resonancia plasmónica de superficie para evaluar la interacción directa FhaA-CwsA. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con Federico Carrión integrante del Laboratorio de Inmunovirología del Institut Pasteur de Montevideo. Para dicho experimento en primer lugar se expresó y purificó una forma truncada de CwsA, que carece de la hélice transmembrana. Este paso se realizó en el Institut Pasteur de Paris, con la colaboración de Magdalena Portela y Mariano Martinez. La secuencia de la proteína CwsA fue verificada por espectrometría de masa, los datos de cobertura y número de espectros para cada péptido obtenido por digestión trípica se muestran en la **Tabla 5.10**.

**Tabla 5.10. Resultados de la digestión trípica de CwsA**

Proteína	Masa Mol.	Nro. Espectros	NSAF	% Cobertura	Score	Descripción
CwsA	9933.5	1380	0.9641	0.82	4693.7	<i>M. smegmatis</i> (formatrunca)
Péptido		Nro. de espectros				
GVLGIGADTAQATAAELR		605				
YTAVGPVDITR		240				
QLAAAAEVAALPETIQEAVQEVVSPPK		227				
QLAAAAEVAALPETIQEAVQEVVSPPK		89				
GVLGIGADTAQATAAELRR		81				
GLKYTAVGPVDITR		67				
YTAVGPVDITRGVLGIGADTAQATAAELR		20				
LTRGLKYTAVGPVDITR		14				
QLAAAAEVAALPETIQEAVQEVVSPPKR		13				
GLKYTAVGPVDITRGVLGIGADTAQATAAELR		8				
YASGKLQR		5				
RYASGKLQR		4				
LQRQLAAAAEVAALPETIQEAVQEVVSPPK		3				
GVLGIGADTAQATAAELRRR		2				
ADVRLAPR		1				
LQRQLAAAAEVAALPETIQEAVQEVVSPPK		1				

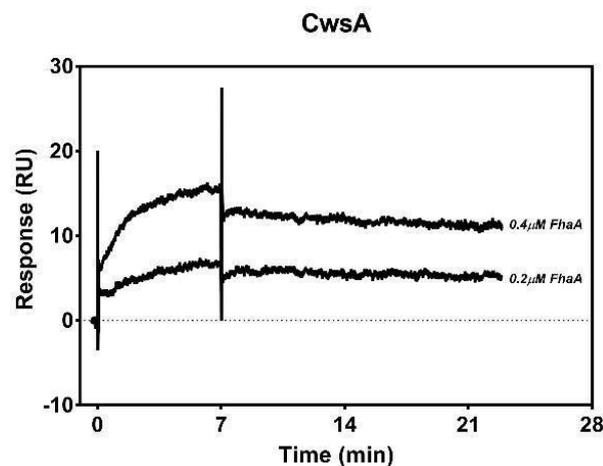
La secuencia de la proteína, con los péptidos identificados marcados en rojo, se muestran en la **Figura 5.16**.

---

MPARADVRLAPRQRLTRGLKTYAVGPVDITRGVVLGIGADTAQATAAELRRRY  
ASGKLQRQLAAAAEAVAA LPETIQEAVQ EVVSPPKKRRRR

**Figura 5.16. Verificación de la secuencia de CwsA.** A partir de la digestión tróptica de la proteína y el análisis utilizando PatternLab for Proteomics se verificó la secuencia de la proteína obteniendo una cobertura de secuencia del 82%. En rojo se señalan los péptido identificados durante el mapeo peptídico.

CwsA fue inmovilizada a la superficie en un sensor por reacción directa de los grupos amino de la proteína y se inyectaron diferentes concentraciones de FhaA y se registraron los sensogramas correspondientes. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.17. donde se puede observar la formación de un complejo estable entre CwsA inmovilizada y FhaA. La presencia de una pendiente en el inicio del gráfico indica una reacción de asociación entre ambas proteínas, la cual se mantiene estable entre los 7 y 14 minutos para luego producirse la disociación de la interacción.



**Figura 5.17. Análisis por Resonancia Plasmónica de Superficie de la interacción entre FhaA y CwsA.** CwsA fue inmovilizada en un sensor por reacción directa de los grupos amino de la proteína. Diferentes concentraciones de FhaA (0.2 μM y 0.4 μM) fueron inyectadas a un flujo de 20 μl/min y se registraron los sensogramas correspondientes.

Los resultados obtenidos nos permiten demostrar que FhaA interacciona directamente con la proteína CwsA. Esto nos indica por un lado que la estrategia experimental utilizada fue exitosa para la identificación de nuevos interactores de FhaA, y además refuerza el rol postulado para esta proteína en el proceso de división celular.

---

## 6. DISCUSIÓN

El genoma de *M. tuberculosis* codifica varias proteínas que contienen módulos FHA y todas ellas se han identificado como sustratos de múltiples quinasas de proteínas en Serinas y Treoninas *in vitro* (Villarino, A., Duran, R., 2005, Grundner, C., 2005, Gupta, M., Sajid, A., 2009, Molle, V., Soulat, D., 2004, Sharma, K., Gupta, M., 2006) .

En este trabajo nos centramos en una de estas proteínas, FhaA, que fue descrita por nuestro grupo como interactor *in vitro* de la quinasa de proteínas en Serinas y Treoninas PknG (Gil, M., Lima, A., Rivera, B., Manuscrito enviado a *Journal of Proteomics*, Julio 2018), una de las 11 quinasas de proteínas en Serinas y Treoninas codificadas en el genoma de *M. tuberculosis* y que participa en procesos críticos para la supervivencia en el hospedero (Cowley, S. et al, 2004, Walburger, A. et al, 2004). Estudios fosfoproteómicos mostraron que FhaA se fosforila *in vivo* tanto en residuos de Thr como en Tyr, sin embargo, la(s) quinasa(s) responsable(s) de cada evento de fosforilación aún se desconocen (Calder, B., et al, 2016).

En este trabajo confirmamos que además de un interactor, FhaA es también un sustrato de PknG. En particular la incubación de FhaA con PknG en condiciones de fosforilación nos permitió identificar dos residuos de Thr fosforilados en FhaA ubicados en el dominio N-terminal de esta proteína: Thr<sub>116</sub> y Thr<sub>18</sub>. Además, experimentos *in vivo* permitieron corroborar que estos dos residuos se encuentran fosforilados en la micobacteria, e identificar un tercer sitio de fosforilación: Thr<sub>377</sub>. Reportes previos indican que el residuo de Thr<sub>116</sub> puede ser fosforilado *in vitro* por la Ser/Thr quinasa PknB (Roumestand, C., Leiba, J., 2011), y en este trabajo reportamos este residuo como un sitio también fosforilable por PknG. Sin embargo, la Thr<sub>18</sub> representaría un sitio de fosforilación exclusivo de PknG.

Es importante destacar que en lo que refiere a la arquitectura de la proteína FhaA ambas secuencias fosforiladas pertenecen al dominio N-terminal de FhaA.

Además, con respecto a este último residuo (Thr<sub>18</sub>), si bien no es posible excluir una modificación no específica debido a la sobreexpresión de FhaA, la co-purificación de FhaA de *M. smegmatis* junto FhaA de *M. tuberculosis* en los experimentos de interactómica llevó a confirmar la fosforilación del residuo Ser<sub>19</sub> (perteneciente a la secuencia KLES<sub>19</sub>TVGDAFAR de la proteína FhaA de *M. smegmatis*, homóloga a la

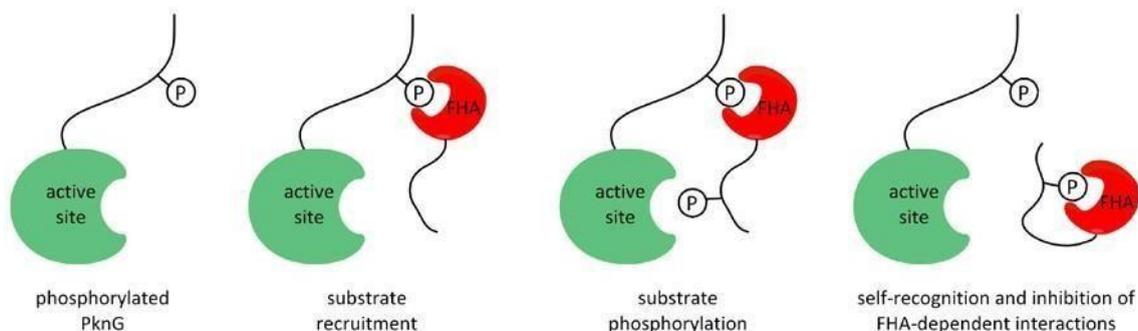
---

secuencia KLEQT18VGDAFAR en FhaA de *M. tuberculosis*). La identificación de este sitio de fosforilación en la proteína FhaA endógena, con niveles normales de expresión, podría señalar que el mismo representa un verdadero sitio de fosforilación *in vivo*.

Para confirmar que FhaA es un sustrato fisiológico de PknG llevamos a cabo como parte de otro trabajo un análisis comparativo del estado de fosforilación de FhaA en *M. tuberculosis* salvaje y una cepa knock-out para PknG. Para ello contamos con extractos celulares obtenidos en el laboratorio del Dr. Brosh (Instituto Pasteur, París). Sin embargo, en estos extractos los niveles de FhaA son muy bajos, y si bien la proteína pudo ser detectada en ambas cepas, no pudimos detectar péptidos fosforilados de manera de corroborar la fosforilación diferencial en presencia o ausencia de PknG.

Con respecto al modelo de interacción entre FhaA y PknG los resultados previos de nuestro grupo, apuntan a un modelo de interacción diferente al descrito para PknG y GarA (interactor previamente reportado de PknG) (**Figuras 5.18 y 5.19**).

En el caso de GarA su estado de fosforilación regula la interacción con otras proteínas (**Figura 5.18**). PknG es capaz de reclutar a GarA mediante la interacción específica de los residuos autofosforilados en la región N-terminal de PknG con el módulo FHA de GarA. PknG fosforila entonces una Thr específica (Thr<sub>21</sub>) en la extensión N-terminal de GarA, lo que desencadena el autoreconocimiento de este residuo fosforilado por el módulo FHA. De esta manera la fosforilación de GarA gatilla el encendido/apagado de las interacciones mediadas por el dominio FHA.

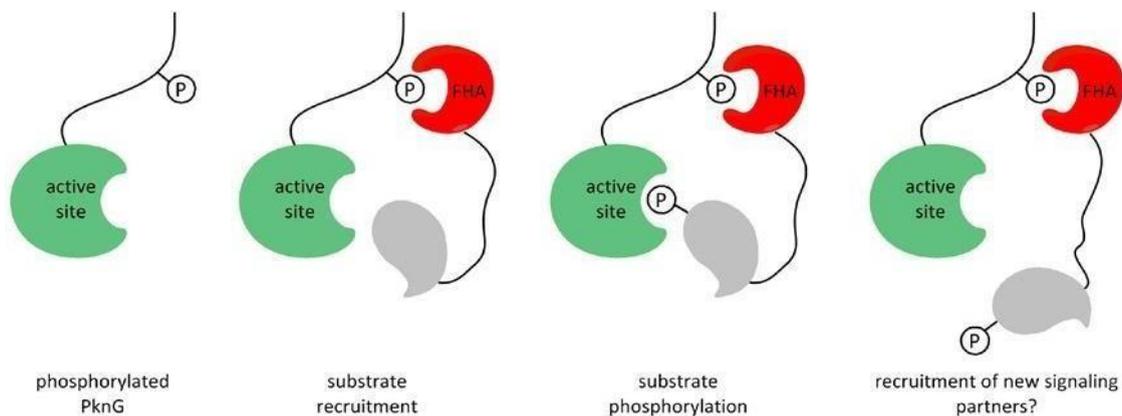


El modelo de interacción se esquematiza en la **Figura 5.18**.

**Figura 5.18. Modelo de interacción entre PknG y GarA** (Tomado de O'Hare, H.M., et al, 2008). La autofosforilación PknG resulta en el reclutamiento de GarA. La acción de la quinasa sobre GarA provoca la fosforilación del residuo Thr<sub>21</sub> y el consiguiente autorreconocimiento del mismo por el módulo FHA, llevando a a un cambio conformacional que impide a GarA interactuar con otras proteínas.

Para el caso de FhaA, los resultados obtenidos previamente indican que la extensión N-terminal fosforilada de PknG resulta indispensable para la interacción con FhaA (Gil, M., Lima, A., Rivera, B., Manuscrito enviado a *Journal of Proteomics*, Julio 2018). Si embargo, en el interactoma secuencial descrito en la introducción, FhaA no se recupera en el mismo paso de elución que GarA. Mientras que GarA se recupera en condiciones de fosforilación (porque la misma provoca el autoreconocimiento del residuo fosforilado y la disrupción de la interacción con PknG), FhaA se recupera solo usando condiciones de desfosforilación. Los resultados obtenidos en este trabajo, que demuestran que FhaA es un sustrato de PknG, nos permiten completar los resultados previos y postular un modelo para la interacción entre PknG y FhaA que es diferente del descrito para GarA.

En el modelo propuesto (que se muestra en la **Figura 5.19**) los sitios de autofosforilación de PknG reclutan FhaA, lo que desencadena la fosforilación en el dominio N-terminal de FhaA. Sin embargo, esta fosforilación no genera la disrupción de la interacción con la quinasa, indicando que probablemente el autoreconocimiento del sitio fosforilado no es una interacción favorecida. En base a este modelo cabe preguntarse cual es el rol de la fosforilación en el N-terminal de FhaA, y si puede representar un sitio de unión para otras proteínas interactoras en vías de señalización mediadas por PknG.



**Figura 5.19. Modelo de interacción entre PknG y FhaA** (Adaptado de M.Gil, tesis de Doctorado). La autofosforilación de PknG resulta en el reclutamiento de FhaA, por interacción entre los residuos autofosforilados en la quinasa con el módulo FHA presente en FhaA. A diferencia de la interacción PknG-GarA, la fosforilación de FhaA por parte de PknG no es capaz por sí sola romper la interacción entre estas proteínas.

---

En este trabajo obtuvimos y caracterizamos una cepa de *M. smegmatis* que sobre-expresa FhaA con una etiqueta (Strep-tag II) con el fin de utilizarla para la identificación de interactores de FhaA

La utilización *M. smegmatis* como modelo para el estudio de *M. tuberculosis* se encuentra ampliamente validada (Mayuri, et al., 2002; Shiloh, M.U. and P.A. Champion, 2010) y en particular tanto PknG como FhaA y su operón se encuentran conservados en ambas bacterias. *M. smegmatis* posee algunas ventajas que facilitan su manejo, tales como las condiciones de bioseguridad necesarias y la velocidad de crecimiento.

Datos previos permitían postular que FhaA juega un rol importante en la división celular. Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan también a la participación de FhaA en estos procesos, ya que la sobre-expresión de esta proteína afecta la velocidad de crecimiento de la bacteria y genera cambios en la morfología celular. Las bacterias que sobre-expresan FhaA presentan deformaciones hacia los polos celulares y se observan como bacterias más elongadas que no logran concretar el proceso de división. Estos cambios morfológicos e irregularidades sugieren directamente defectos en la división celular y/o la síntesis de pared. La morfología aberrante resultado de la sobre- expresión de FhaA observada en nuestro trabajo coincide con la morfología reportada en micobacterias que sufren una depleción condicional de la proteína Mvin (Gee, L.C. et al, 2013). Como se explicó en la introducción, la unión entre FhaA y Mvin lleva a la inhibición de la actividad de Mvin, y en este sentido sería esperable obtener el mismo fenotipo para bacterias que sobre-expresan FhaA y aquellas que tienen una expresión disminuida de la proteína Mvin.

FhaA posee una arquitectura de dominios que se asemeja a las proteínas de andamiaje que participan en el ensamblaje de complejos de señalización en eucariotas. En base a esta observación, y dado que Mvin es el único interactor reportado al día de hoy, nos propusimos identificar los interactores de FhaA en la micobacteria como un primer paso hacia la elucidación del rol que esta proteína cumple en su fisiología y/o en la fisiopatología de la enfermedad.

Mientras que las estrategias clásicas para estudiar interacciones proteína-proteína por espectrometría de masa se basan en co-inmunoprecipitación o cromatografía de afinidad a partir de lisados celulares (Yang., W., et al, 2008), la estrategia aquí seleccionada

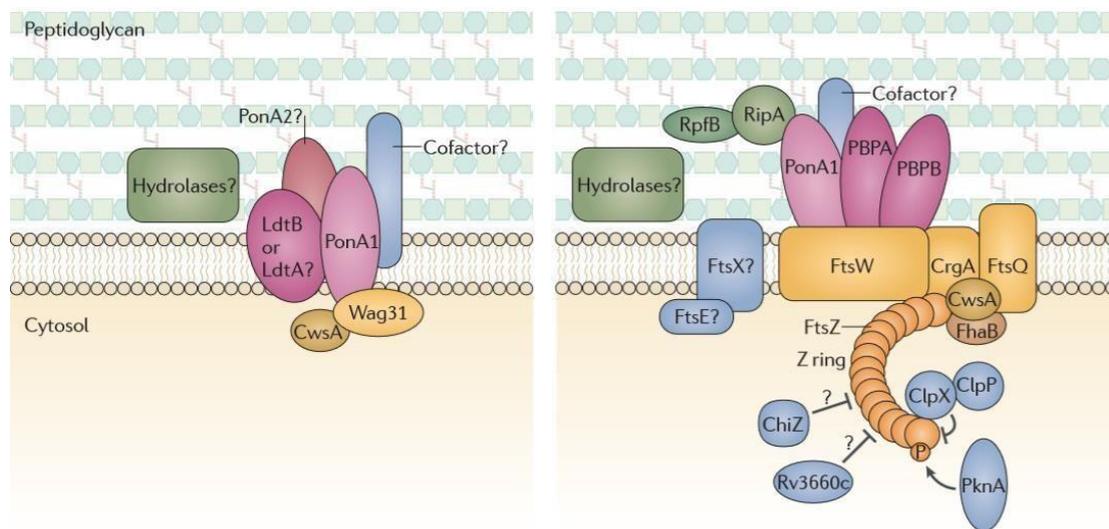
---

resulta diferente, combinando el entrecruzamiento *in vivo* con la purificación específica de proteínas conteniendo etiquetas (“Strep tags”) y el análisis por espectrometría de masa. El por qué de esta elección radica en que las aproximaciones clásicas tienen varias limitaciones. Por un lado, la disrupción de la célula lleva a la formación de muchas interacciones moleculares que no ocurrían *in vivo*, generando falsos positivos. Por otro lado, interacciones que son fisiológicamente relevantes, pero débiles y/o transitorias *in vitro*, se pierden durante la purificación de los complejos (Yang., W., et al, 2008). Finalmente, estas aproximaciones en general no son las más indicadas para recuperar proteínas de membranas.

Por estos motivos, nuestro protocolo incluye la utilización de un agente capaz de atravesar la pared de la micobacteria y entrecruzar proteínas que están formando complejos *in vivo*, lo que permite obtener una “instantánea” de las interacciones proteína- proteína en la bacteria y representa una mejor aproximación para identificar las interacciones fisiológicamente relevantes. La elección del formaldehído como agente entrecruzante se basó en que éste es uno de los pocos agentes entrecruzantes que es capaz de atravesar fácilmente la compleja envoltura celular de la micobacteria y unir proteínas que están en contacto próximo (aproximadamente 2Å) (Lougheed, K.E. et al,2014).

Utilizando la estrategia planteada identificamos una lista de 55 proteínas que constituye el interactoma de FhaA, entre las cuales se incluye la proteína Mvin, único interactor reportado de FhaA. Esta proteína fue recuperada en cada una de las réplicas de la cepa FhaA analizadas, y en ninguna del control. Esto no solo sugiere una alta reproducibilidad de la técnica, sino que también nos permite validar nuestra estrategia experimental, y postular que el interactoma reportado representa una lista confiable de interactores fisiológicamente relevantes.

Algunas de las proteínas identificadas en el interactoma de FhaA corresponden a proteínas de membrana y participan principalmente de dos procesos fundamentales para la micobacteria: síntesis de componentes de la envoltura celular y división celular. En particular destacamos la proteína CswA, la cual forma parte de los complejos multiproteicos que dirigen los procesos de división celular y elongación en la micobacteria (Kieser, K.J., Rubin, E.J., 2014) (**Figura 5.20.**).



**Figura 5.20. Elongasoma y divisoma en *M. tuberculosis* (Tomado de Kieser, K.J., Rubin, E.J., 2014).** Se muestran los distintos componentes del elongasoma (Izquierda) y divisoma (Derecha). Las proteínas que participan en la síntesis y hidrólisis de péptidoglicano se indican en violeta y verde respectivamente. Las proteínas estructurales se muestran en amarillo y los factores reguladores que coordinan tanto la elongación celular como la división celular se muestran en azul. En la elongación, el denominado elongasoma se ancla a los polos celulares por Wag31 y es estabilizado por CwsaA. A lo largo de este proceso actúan sintasas e hidrolasas de péptidoglicano cuya acción resulta en la formación de nuevo péptidoglicano que permite completar el proceso. En la división celular la polimerización de FtsZ y la correcta ubicación del anillo Z son procesos ampliamente regulados donde actúan varias proteínas estructurales tales como FtsW, FtsQ, CrgA y CwsA, las cuales se ensamblan para formar el divisoma, así como sintasas de péptidoglicano necesarias para la formación del septo de división.

Además Cwsa es un interactor de Wag31 y CrgA (dos proteínas también relacionadas con la síntesis de péptidoglicano en la elongación) (Figura 5.20.). En particular la proteína Wag31, también forma parte del interactoma de FhaA reportado en este trabajo. Esta proteína homóloga a la proteína DivIVA, es esencial para la viabilidad de la micobacteria, así como para la formación del péptidoglicano en polos celulares y en el septo (Polcinski, P., et al, 20121). En el interactoma de FhaA también encontramos a la proteína FtsZ la cual forma parte central del divisoma necesario para concretar la obtención de dos células hijas en el proceso de división participando directamente en el proceso de citocinesis. FtsZ es una GTPasa capaz de polimerizar para formar una estructura contráctil en el sitio de división celular. Para ello debe reclutar y ensamblar otras proteínas estructurales y accesorias de una manera altamente ordenada (Adams, D.W., Errington, J., 2009). Esta proteína se reporta también como interactor de la proteína CrgA que como se explicó anteriormente interactúa directamente con CwsA. La interacción FtsZ- CrgA tiene efectos

---

directos en la regulación de la división celular, la síntesis de pared y el mantenimiento de la forma celular (Polcinski, P., et al, 2012). Por tanto, los resultados muestran que utilizando la estrategia experimental propuesta estamos identificando proteínas que interactúan entre sí *in vivo* de acuerdo a reportes previos, y además nos permiten postular que FhaA está participado de manera directa o indirecta en los procesos de elongación y división celular.

Finalmente cabe destacar que en el interactoma de FhaA también identificamos a la proteína FtsH, la cual interactuaría con FtsZ regulando los niveles de ésta. En particular, se demostró que bacterias que sobre-expresan la proteína FtsH presentan un retardo en su crecimiento como lo observado en nuestro modelo, y tienen disminuídos los niveles de FtsZ (Kiran, M. et al, 2009). También se postula un rol para esta proteína en relación a la presencia de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, ya que los niveles de dicha proteína aumentan en situaciones de estrés (Kiran, M. et al, 2009).

Por otro lado, se han identificado en el interactoma de FhaA proteínas que participan en la biosíntesis componentes de la envoltura celular, un proceso claramente vinculado a la división celular. En particular encontramos a la proteína A0R5R5, una sintasa de ácidos micólicos ciclopropanoicos (Grover, S., et al, 2016). La relevancia de este tipo de proteínas radica en que los ácidos micólicos con esta modificación son componentes esenciales de la envoltura celular que poseen además un rol en la patogenicidad, persistencia y virulencia de *M.tuberculosis* (Rong-Zhen,L., et al, 2011).

Relacionadas también con el mismo proceso encontramos como interactores de FhaA a las proteínas A0QP93, una proteína de membrana, y a la proteína “Polyprenol monophosphomannose synthase”. La proteína A0QP93 se describe en las bases de datos como proteína no caracterizada, sin embargo se ha reportado que juega un rol fundamental en la elongación de la cadena principal de mananos tanto en micobacterias como en corinebacterias. Trabajos anteriores muestran que deleciones en el gen que codifica para esta proteína tiene como resultados defectos en la elongación de lipomananos y lipoarabinomananos (Cashmore, T.J., et al., 2017). Por su parte la “Polyprenol monophosphomannose synthase” participa también en la síntesis de lipoarabinomananos, actuando como donante de unidades de poliprenil-fosfomanosa para las glicosiltransferasas durante la etapa de ramificación del precursor PIM4 (Ac<sub>1</sub>/Ac<sub>2</sub>) tanto para la formación de PIM6(Ac<sub>1</sub>/Ac<sub>2</sub>) como para la obtención de estructuras maduras de lipomananos y lipoarabinomananos, tal y como se describió en la introducción en el apartado Envoltura celular (Gurcha, S.S, et al, 2002).

---

Además, los resultados obtenidos y su análisis mediante la aplicación y combinación de diferentes herramientas informáticas nos permitió identificar entre los interactores de FhaA otro grupo de proteínas vinculadas a la homeostásis redox.

Entre ellas encontramos proteínas tales como la tiorredoxina y la alquil-hidroperóxido reductasa (AhpC). Brevemente, la tiorredoxina es una proteína esencial para el crecimiento *in vitro* que juega también un papel importante *in vivo* vinculado a la resistencia a fármacos tales como la Rifampicina, una de las primeras líneas de tratamiento en la Tuberculosis. La utilización de “Knockouts” en esta proteína y su utilización en modelos de infección mostraron la eliminación de la micobacteria durante las fases aguda y crónica de la infección (Lin, K. et al, 2016).

Para otra parte la proteína alquil-hidroperóxido reductasa (AhpC) también se encuentra vinculada con la resistencia a fármacos utilizados en el tratamiento de la Tuberculosis, en particular a la isoniazida (Timmins, G.S, et al, 2004). Estudios previos donde realizan delección de esta proteína han llevado a postular que si bien la misma no posee un rol fundamental en el inicio de la infección los niveles de esta proteína se ven aumentados en cultivos en fase estacionaria, lo que apuntan a un posible rol en etapas más avanzadas de la infección. (Fontalvo, D., Gómez, D., 2015).

Otra proteína encontrada como interactor de FhaA es la denominada FabG4 (Rv0242c). Esta proteína es homóloga de la proteína FabG que participa en la síntesis de ácidos grasos, siendo la responsable de la conversión de  $\beta$ -hidroxi-acil-ACP en  $\beta$ -hidroxi acil-ACP. Ambas proteínas se encuentran conservadas en todas micobacterias (Dutta, D., 2018).

La importancia de la proteína FabG4 en *M. tuberculosis* fue dilucidada por Mc. Fadden y colaboradores quienes le atribuyeron un rol fundamental en el crecimiento de la micobacteria ante condiciones donde las fuentes de carbono son limitadas (Beste et al, 2009). Estudios posteriores demostraron también el aumento de la expresión de esta proteína en cepas resistentes a fármacos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis (Singh et al, 2016; Verma et al, 2017).

La presencia de esta proteína en la fracción de membrana (Singh et al., 2017), sumado a los posibles roles de esta proteína antes nombrados podrían ser indicativos de su papel en la síntesis, remodelación o reciclaje de la membrana vinculados a situaciones donde los recursos con los que cuenta la micobacteria son escasos. Al mismo tiempo su vínculo con la proteína FhaA podría quedar de manifiesto al considerar que FhaA juega un rol fundamental en la síntesis de los elementos de la envoltura celular y que interacciona

---

directamente con proteínas fundamentales pertenecientes a la membrana celular.

Por tanto, el estudio del interactoma *in vivo* de FhaA apunta a que esta proteína participa en los procesos de síntesis de componentes de la envoltura celular. Con el fin de validar alguno de los interactores identificados, nos centramos en la proteína CwsA, la cual es una pequeña proteína de membrana localizada fundamentalmente en los polos y a lo largo de sitios puntuales de la membrana de la micobacteria y que forma parte de los complejos mutliproteicos que participan en la enlongación y división celular (elongasoma y divisoma respectivamente) (**Figura 5.20**).

La proteína CwsA, se recupera de manera sistemática en las cinco réplicas biológicas de FhaA y en ninguna del control. En base a estos resultados, y al rol planteado para esta proteína, CwsA fue seleccionada como candidato para evaluar la posible interacción directa con FhaA. Los datos de resonancia plasmónica de superficie indican que efectivamente se observa una interacción cuando una solución de FhaA se hace pasar sobre un sensor conteniendo CwsA inmovilizada, y que este efecto depende de la concentración de FhaA, demostrando que existe una interacción directa entre estas dos proteínas. Este resultado, refuerza el posible rol de FhaA en la regulación de la división celular y abren la puerta a estudiar el mecanismo por el cual se da esta interacción, así como el efecto principal que ésta tiene en la formación del divisoma y actividad de CwsA. En resumen, en este trabajo de tesis pusimos a punto un método para detectar interactores *in vivo* de FhaA y reportamos un interactoma inicial de esta proteína. En base a los resultados obtenidos, y con el fin de esclarecer cuál es el rol de la fosforilación de FhaA sobre las interacciones reportadas, nos proponemos llevar a cabo estudios interactómicos utilizando cepas que sobre-expresen FhaA con los sitios de fosforilación mutados por residuos de Ala o Glu. Pensamos que esta aproximación nos permitirá discriminar aquellas interacciones que están mediadas por estos sitios fosforilados, y por tanto reguladas por las quinasas de proteínas en Serinas y Treoninas. De la misma manera nos proponemos sobreexpresar en forma independiente el dominio N-terminal y el dominio FHA C-terminal de FhaA en *M. smegmatis* de manera de poder identificar interctores específicos de cada dominio. Esto es de particular relevancia ya que hasta el momento no existe información acerca de la función del dominio N-terminal de FhaA. En conjunto, estas estrategias nos permitirán comenzar a diseccionar la arquitectura de las vías de señalización mediadas por FhaA y su regulación por fosforilación.

Por otro lado, sería interesante investigar como cambian los complejos de señalización mediados por FhaA en distintas condiciones. En particular nos proponemos investigar la

---

dinámica de las interacciones mediadas por FhaA en distintas condiciones que simulan el ambiente bioquímico encontrado en el hospedero, como por ejemplo la hipoxia.

En conclusión, en el presente trabajo confirmamos que FhaA es sustrato de PknG e identificamos los sitios específicos de fosforilación por esta quinasa, demostrando además que estos sitios de fosforilación se encuentran presentes *in vivo*, tanto en la proteína de *M. tuberculosis* sobre-expresada en *M. smegmatis* como en la proteína endógena de *M. smegmatis*, apuntando a sitios fisiológicamente relevantes.

Por otra parte pusimos a punto un método que nos permite la identificación de interactores *in vivo* mediante el uso de agentes entrecruzantes y espectrometría de masa en micobacterias y demostramos que es útil para la recuperación de interactores de membrana previamente reportados. Por lo tanto, implementamos una metodología que puede aplicarse al estudio de otras interacciones *in vivo* en la micobacteria. Utilizando esta metodología identificamos un conjunto de proteínas que representan interactores directos o indirectos de FhaA *in vivo*, concluyendo que las proteínas identificadas participan principalmente en la síntesis de componentes de la envoltura celular y división celular, así como en proceso redox. Por último, validamos la interacción entre FhaA y uno de los nuevos interactores reportados en este trabajo la proteína CwsA, proponiendo un modelo de interacción directa a través de la cual FhaA participaría directamente en el proceso de división celular.

Estos resultados constituyeron una primera aproximación para la identificación de mediadores en las vías de señalización donde participa FhaA permitiendo abrir nuevas interrogantes que aseguran futuros trabajos en esta área.

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

[www.who.int](http://www.who.int), World Health Organization. Global TB control report 2008

[www.who.int](http://www.who.int) World Health Organization. Tuberculosis Fact Sheet 2014

[www.who.int](http://www.who.int), World Health Organization. Tuberculosis Global Report 2017

[www.who.int](http://www.who.int), World Health Organization. Tuberculosis, Datos y Cifras 2018

Abbas, A. and Lichtman, A. Effector Mechanisms of Cell-Mediated Immunity, in Cellular and Molecular Immunology, A. Abbas and A. Lichtman, Editors. 2005. Elsevier Saunders: Philadelphia. p. 354.

Abrahams, K.A., Besra, G.S. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. 2018. *Parasitology*, 145(2):116-133

Abramovitch, R.B., Rhode, K.H., Hsu, F.F., Russell, D.G. aprABC: a Mycobacterium tuberculosis complex specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome. 2011. *Mol Microbiol*, 80(3): p. 678-94.

Adams, D.W., Eriington, J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the z ring. 2009. *Nat Rev Microbiol* Sep;7(9):642-53.

Alderwick LJ, Radmacher E, Seidel M, Gande R, Hitchen PG. Deletion of Cg-emb in corynebacteriaceae leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of Cg-ubiA results in an arabinan-deficient mutant with a cell wall galactan core. 2005. *J. Biol. Chem.* 280:32362–71 5.

Alderwick LJ, Seidel M, Sahm H, Besra GS, Eggeling L. Identification of a novel arabinofuranosyltransferase (AftA) involved in cell wall arabinan biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. 2006. *J. Biol. Chem.* 281:15653–61.

Aldridge, B. B. et al. Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility. 2012. *Science* 335, 100–104.

Av-Gay, Y. and Everett, M. The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of Mycobacterium tuberculosis. 2000 *Trends in microbiology*, vol. 8, n° 5, p. 238–244.

Baulard, A.R., Gurcha, S.S., Engohang-Ndong, J., Gouffi, K., Locht, C., Besra, G.S. In Vivo Interaction between the Polyprenol Phosphate Mannose Synthase Ppm1 and the Integral Membrane Protein Ppm2 from Mycobacterium smegmatis Revealed by a Bacterial Two-hybrid. 2002. *JBC* Vol. 278, No. 4, Issue of January 24, pp. 2242–2248, 2003.

Bhatt, A., Molle, V., Besra, G.S., Jacobs, W.R., Kreme, L. The Mycobacterium tuberculosis FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. 2007. *Molecular Microbiology* 64(6), 1442–1454.

---

Belanger, A. E., and Hatfull, G. F. Exponential-phase glycogen recycling is essential for growth of *Mycobacterium smegmatis*. 1999. *J Bacteriol* 181, 6670-6678.

Benson T.E, Walsh C.T, Hogle J.M.. The structure of the substrate-free form of MurB, an essential enzyme for the synthesis of bacterial cell walls. 1996. *Structure* 4:47-54.

Berg S, Kaur D, Jackson M, Brennan PJ. The glycosyltransferases of *Mycobacterium tuberculosis* - roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates. 2007. *Glycobiology* 17: 35-56R.

Berwick, D. C., and Tavaré, J. M. Identifying protein kinase substrates: hunting for the organ-grinder's monkeys. 2004. *Trends in biochemical sciences* 29, 227-232.  
biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. 3rd. 1995. *PNAS* 92:6630-34.

Beste, D. J., Espasa, M., Bonde, B., Kierzek, A. M., Stewart, G. R., and McFadden, J. The genetic requirements for fast and slow growth in mycobacteria. 2009. *PLoS One* 4:e5349. doi: 10.1371/journal.pone.000 5349

Birch HL, Alderwick LJ, Appelmelk BJ, Maaskant J, Bhatt A. A truncated lipoglycan from mycobacteria with altered immunological properties. 2010. *PNAS* 107:2634-39.

Birch HL, Alderwick LJ, Bhatt A, Rittmann D, Krumbach K, Seidel, M., Besra, G.S. Brennan, P.J. and Crick, D.C. The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. 2007. *Curr Top Med Chem*, 7(5): p. 475-88

Brambilla, C., Julián, M., Llorens-Fons, M., Luquin, M. Mycobacteria Clumping Increase Their Capacity to Damage Macrophages. 2016. *Frontiers in Microbiology*. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01562

Brennan, P.J. and Nikaido, H. The envelope of mycobacteria. 1995 *Annu Rev Biochem.*, 64: p. 29-63.

Calder B, Albeldas C, Blackburn JM, Soares NC. Mass Spectrometry Offers Insight into the Role of Ser/Thr/Tyr Phosphorylation in the Mycobacteria. 2016. *Frontiers in microbiology*. 7:141.

Carmel-Harel O, Storz G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. 2000. *Annu Rev Microbiol.* 54: 439-461.

Carvalho, P. C., Lima, D. B., Leprevost, F. V., Santos, M. D., Fischer, J. S., Aquino, P. F., Moresco, J. J., Yates, J. R., 3rd, and Barbosa, V. C. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. 2016. *Nature protocols* 11, 102-117.

Cashmore, T.J., Klatt, S., Yamaro-Botte, Y. Brammananth, R., Rainczuk, A.K., McConville, M.J., Crellin, P.K, and Coppel, R.L. Identification of a membrane protein required for lipomannan maturation and lipoarabinomannan synthesis in *Cryobacterineae*. 2017. *JBC Paprs in Press*.

---

Chao, J., Wong, D., Zheng, X., Poirier, V., Bach, H., Hmama, Z., and Av-Gay, Y. Protein kinase and phosphatase signaling in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and pathogenesis. 2010. *Biochim Biophys Acta* 1804:620-627.

Chatterjee, D., Lowell, K., Rivoire, B., McNeil, M. R., and Brennan, P. J. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. 1992 *J. Biol. Chem.* 267, 6234–6239.

ChatterjeeD,HunterSW,McNeilM,BrennanPJ.Lipoarabinomannan:multiglycosylatedform of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols.1992. *J. Biol. Chem.* 267:6228–33

ChatterjeeD,LowellK,RivoireB,McNeilMR,BrennanPJ.LipoarabinomannanofMycobacterium tuberculosis: capping with mannosyl residues in some strains. 1992. *J. Biol. Chem.* 267:6234–39

Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd, et al. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537-544.

Cordillot,M., Dubee, V., Triboulet, S., Dubost, L., Marie, A. 2013. In vitro cross-linking of *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan by L,D-transpeptidases and inactivation of these enzymes by carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:5940–45

Cowley, S., Ko, M., Pick, N., Chow, R., Downing, K. J., Gordhan, B. G., Betts, J. C., Mizrahi, V., Smith, D. A., Stokes, R. W., and Av-Gay, Y. The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo. 2004. *Mol Microbiol* 52, 1691-1702.

Daffé, M. and Etienne, GThe capsule of *Mycobacterium tuberculosis*its implications for pathogenicity. 1999 *Tuberc. Lung Dis.* 79, 153–169.

Daffé, M., The Global Architecture of the Mycobacterial Cell Envelope, in *The Mycobacterial Cell Envelope*, M. Daffé and J.-M. Reyrat, Editors. 2008, ASM Press: Washington, DC.

Datta, P., Dasgupta, A., Kumar Singh, A., Mukherjee, P., Kundu, M., Basu, J. Interaction between FtsW and penicillinbinding protein 3 (PBP3) directs PBP3 to mid-cell, controls cell septation and mediates the formation of a trimeric complex involving FtsZ, FtsW and PBP3 in mycobacteria. 2006. *Mol. Microbiol.* 62, 1655–1673.

Dianiskova P, Kordulakova J, Skovierova H, Kaur D, Jackson M. Investigation of ABC transporter from mycobacterial arabinogalactan biosynthetic cluster. 2011. *Gen. Physiol. Biophys.* 30:239–5.

Domon, B. and Aebersold, R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. 2010. *Nature biotechnology*, vol. 28, n° 7, p. 710–721.

---

Donohue-Rolfe, A. Microbial Pathogenesis. 2013 Available from: <http://www.studyblue.com/notes/n/mycobacterium/deck/1232513>.

Draper, P. and Daffé, M. The Cell Envelope of Mycobacterium tuberculosis with Special Reference to the Capsule and Outer Permeability Barrier, in Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. 2005 ASM Press: New York. p. 261.

Dunham WH, Mullin M, Gingras AC. Affinity-purification coupled to mass spectrometry: basic principles and strategies. 2012. Proteomics;12:1576-90.

Dutta, Debajyoti. Advance in Research on Mycobacterium tuberculosis FabG4 and Its Inhibitor. 2018. Frontiers in Microbiology, Volume 9, Article 1184. doi: 10.3389/fmicb.2018.01184.

Dziedzic, R., Plocinski, P., Kiran, M., Rajagopalan, M. Mycobacterium tuberculosis ClpX interacts with FtsZ and interferes with FtsZ assembly. 2010. PLoS ONE 5, e11058.

Ehrt, S. and Schnappinger, D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. 2009. Cell Microbiol, 11(8): p.1170-8.

England, P., Wehenkel, A., Martins, S., Hoos, S., Andre-Leroux, G., Villarino, A., and Alzari, P. M. The FHA-containing protein GarA acts as a phosphorylation-dependent molecular switch in mycobacterial signaling. 2009. FEBS letters 583, 301-307.

England, K., Crew, R. & Slayden, R. Mycobacterium tuberculosis septum site determining protein, Ssd encoded by rv3660c, promotes filamentation and elicits an alternative metabolic and dormancy stress response. 2011. BMC Microbiol. 11, 79.

Escuyer VE, Lety MA, Torrelles JB, Khoo KH, Tang JB. The role of the embA and embB gene products in the biosynthesis of the terminal hexa-arabinofuranosyl motif of Mycobacterium smegmatis arabinogalactan. 2001. J. Biol. Chem. 276:48854-62.

Fernandez P, Saint-Joanis B, Barilone N, Jackson M, Gicquel B, Cole ST, et al. The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth. 2006. Journal of bacteriology. 188:7778-84.

Flynn, J.L. and Chan, J. Tuberculosis: latency and reactivation. 2001. Infect Immun, 69(7): p. 4195-201.

Fontalvo Rivera, D., Gómez Camargo, D. Revisión Genes de Mycobacterium tuberculosis involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar. 2015. MéD. UIS ;28(1):39-51.

Gao, J., Friedrichs, M.S., Dongre, A.R., Opiteck, G.J. Guidelines for the routine application of the peptide hits technique. 2005. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, vol. 16, n° 8, p. 1231-1238.

Gee, C. L., Papavinasundaram, K. G., Blair, S. R., Baer, C. E., Falick, A. M., King, D. S., Griffin, J. E., Venghatakrishnan, H., Zukauskas, A., Wei, J. R., Dhiman, R. K., Crick, D. C., Rubin, E. J., Sasseti, C. M. and Alber, T. A phosphorylated pseudokinase complex

---

controls cell wall synthesis in mycobacteria. 2012. *Sci Signal*. **5**, ra7.

Gengenbacher, M. and S.H. Kaufmann, *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. 2012. *FEMS Microbiol Rev.*, 36(3): p. 514-32

Gilleron M, Jackson M, Nigou J, Puzo G. Structure, biosynthesis, and activities of the phosphatidylmyo-inositol-based lipoglycans. In *The Mycobacterial Cell Envelope*, ed. J Daffé, J-M Reyrat, 2008. Am. Soc. Microbiol. pp. 3–11 chap. 6.

Good, M.C., J.G. Zalatan, and W.A. Lim, Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. 2011. *Science*, 332(6030): p. 680-6.

Grange, J.M., Yates, M.D., De Kantor, I.N. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. 1996. WHO, Geneva, PP.1-23

Grover, S., Gupta, P., Kahlon, P.S., Goyal, S., Grover, A., Dalal, K., Ehteshamc, N.Z., Hasnain, S.E. Analyses of methyltransferases across the pathogenicity spectrum of different mycobacterial species point to an extremophile connection. 2016. *Mol. BioSyst.*, 12, 1615

Grundner, C., Gay, L. M. and Alber, T. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknB, PknD, PknE, and PknF phosphorylate multiple FHA domains. *Protein Sci.* **14**, 1918-1921

Gupta, M., Sajid, A., Arora, G., Tandon, V. and Singh, Y. Forkhead-associated domain-containing protein Rv0019c and polyketide-associated protein PapA5, from substrates of serine/threonine protein kinase PknB to interacting proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. 2009. *J Biol Chem.* **284**, 34723-34734

Gurcha SS, Baulard AR, Kremer L, Locht C, Moody DB, Besra, G.S. Ppm1, a novel polyprenol monophosphomannose synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. 2002. *Biochem J* 365: 441–450.

Hakansson, S., Galyov, E., Rosqvist, R., Wolf-Watz, H. The Yersinia YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HelA cell plasma membrane. 1996. *Molecular microbiology*, vol. 20, n° 3, p. 593-603.

Harth, G., Lee, B.-Y., Wang, J., Clemens, D. L., and Horwitz, M. A. Novel insights into the genetics, biochemistry and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. 1996 *Infect. Immunol.* 64, 3038–3047.

Henrieta Škovierová, H., Larrouy-Maumus, G., Pham, H., Belanová, M., Barilone, M., DasGupta, A., Mikušová, K., Gicquel, B., Gilleron, M., Brennan, P.J., Puzo, G., Nigou, G., Jackson, M. Biosynthetic origin of the galactosamine substituent of arabinogalactan in *Mycobacterium tuberculosis*. 2010. *J. Biol. Chem.* 285, 41348–41355.

Herrera Barrios, M.T, Torres Rojas, M., Juarez Carvajal, E. , Sada Díaz, E. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. 2005. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. Vol18, n4.

- 
- Herzberg, C., et al., SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. 2007. *Proteomics*, 7(22): p. 4032-5.
- Hett EC, Chao MC, Rubin EJ. Interaction and modulation of two antagonistic cell wall enzymes of mycobacteria. 2010. *PLOS Pathog.* 6:e1001020.
- Hett, E.C. and Rubin,E.J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective.2008 *Microbiol Mol Biol Rev.*, 72(1): p. 126-56.
- Hett, E. C., Chao, M. C., Deng, L. L. & Rubin, E. J. A. Mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitation-promoting factor. 2008. *PLoS Pathog.* 4, e1000001.
- Hodgson, D. R., and Schroder, M. Chemical approaches towards unravelling kinase-mediated signalling pathways. 2011. *Chemical Society reviews* 40, 1211-1223.
- Hunter, T. Signaling--2000 and beyond. 2000 *Cell Cell*, vol. 100, n° 1, p. 113-117
- Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. 2013. *Nat Rev Micro*; 11: 443–454.
- Ikeda, M., Nakagawa, S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. 2003. *Appl Microbiol Biotechnol* 62, 99-109, doi:10.1007/s00253-003-1328-1
- Jani, C. Regulation of polar peptidoglycan biosynthesis by Wag31 phosphorylation in mycobacteria. 2010. *BMC Microbiol.* 10, 327.
- Jankute, M., Cox, A.G., Harrison, J., and Besra, G.S., Kall, L., Canterbury, J.D., Weston, J., Noble, W.S., MacCoss, M.J. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. 2007. *Nature Methods*, vol. 44, n° 11, p. 923–925.
- Jarlier, V., Nikaido, H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. 1994. *FEMS Microbiol Lett.* 15;123(1-2):11-8.
- Jensen, S.O., Thompson, L.S., Harry, E.J. Cell Division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA Association Is Z-Ring Independent, and FtsA Is Required for Efficient Midcell Z-Ring Assembly. 2005. *J Bacteriol*; 187(18): 6536–6544.
- Joyce, G. Cell division site placement and asymmetric growth in mycobacteria. 2012. *PLoS ONE* 7, e44582.
- 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. 2008. *Microbiology* 154, 725–735.
- Kaur D, McNeil MR, Khoo K-H, Chatterjee D, Crick DC. New insights into the biosynthesis of mycobacterial lipomannan arising from deletion of a conserved gene. 2007. *J Biol Chem* 282: 27133–27140.
-

---

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*. 2009. *Adv. Appl. Microbiol.* 69, 23–78.

Kim, D.H., Lees, W.J., Kempell, K.E., Lane, W.S., Duncan, K., Walsh, C.T. Characterization of a Cys115 to Asp substitution in the *Escherichia coli* cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc 6-pyruvyltransferase (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomicin. 2015. *Biochemistry* 35:4923–28

Kiran, M., Maloney, E., Lofton, H., Chauhan, A., Jensen, R., Dziedzic, R., Madiraju, M., Rajagoplan, M. *Mycobacterium tuberculosis* ftsZ expression and minimal promoter activity. 2011. doi: 10.1016/S1472-9792(09)70014-9

Knechel, N.A., Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Crit Care Nurse*. 2009. 29(2): p. 34-43,

Koo, M.S., Subbian, S. and Kaplan, G. Strain specific transcriptional response in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages. 2012. *Cell Commun Signal*, 10(1): p. 2.

Kremer L, Dover LG, Morehouse C, Hitchin P, Everett M. Galactan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a bifunctional UDP-galactofuranosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 2001. 276:26430–40

Kremer L, Gurcha SS, Bifani P, Hitchen PG, Baulard A. Characterization of a putative alpha-mannosyltransferase involved in phosphatidylinositol trimannoside biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. 2002. *Biochem J* 363: 437–447

Kremer, L. and G. Besra, *A Waxy Tale*, by *Mycobacterium tuberculosis*, in *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, S. Cole, Editor. 2005, ASM Press: Washington, D.C. p. 287-305.

Kruh, N.A., Troudt, J., Izzo, A, Prenni, J.; Dobos, K.M. Portrait of a Pathogen: The *Mycobacterium tuberculosis* Proteome In Vivo. 2010. *PLoS ONE*, Edited by Ramy K. Aziz, vol. 5, issue 11, p. e13938

Kysela, D. T., Brown, P. J. B., Huang, K. C. & Brun, Y. V. Biological consequences and advantages of asymmetric bacterial growth. 2013. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 417–435.

LarrouyMaumus, G., Skovierová, H., Dhoubi, R., Angala, S.K., Zuberogitia, S. A small multidrug resistance-like transporter involved in the arabinosylation of arabinogalactan and lipopeptide mannans in *Mycobacterium tuberculosis*. 2012. *J. Biol. Chem.* 287:39933–41

Lavollay, M., Arthur, M., Fourgeaud, M., Dubost, L., Marie, A. The peptidoglycan of stationary phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. 2008. *J. Bacteriol.* 190:4360–66

Li Y, Hsin J, Zhao L, Cheng Y, Shang W, Huang KC, Wang H-W, Ye S FtsZ

---

---

protofilaments use a hinge-opening mechanism for constrictive force generation. 2013.  
Science 341:392–395.

---

Lisa, M.N., Gil, M., André-Leroux, G., Barilone, N., Durán, R., Biondi, R.M., Alzari, P.M. Molecular Basis of the Activity and the Regulation of the Eukaryotic-like S/T Protein Kinase PknG from *Mycobacterium tuberculosis*. 2015. *Structure*, Volume 23, Issue 6, Pages 1039-1048

Liu H, Sadygov RG, Yates JR, 3<sup>rd</sup>. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. 2004. *Analytical chemistry* 76: 4193-201

Liu J, Barry CE 3<sup>rd</sup>, Besra GS, Nikaido H. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. 1996. *J. Biol. Chem.* 271:29545–51

Liu, J. and Nikaido, H. A mutant of *mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 96 PP. 4011-4016, *Microbiology*.

López M, Sly LM, Luu Y., Young D., Cooper H, Reigner NE. the 19KDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through toll like receptor 2. 2003. *J Immunology*;170:2409-2416.

Lougheed, K.E., M.H. Bennett, and H.D. Williams, An in vivo crosslinking system for identifying mycobacterial protein-protein interactions. 2014. *J Microbiol Methods*,105: p. 67-71.

Lu, J., Holmgren, A. The thioredoxin antioxidant system. 2014. *Free Radic Biol Med.*; 66: 75–87.

Lu, P., Lill, H. and Bald, D. ATP synthase in mycobacteria: special features and implications for a function as drug target. 2014. *Biochim Biophys Acta*. **1837**, 1208-1218

Maccarrone, G., Turck, C.W., and Martins-de-Souza, D. Shotgun mass spectrometry workflow combining IEF and LC-MALDI-TOF/TOF. 2010. *Protein J* 29:99-102.

Manjot Kirana, M., Chauhana, A., Dziedzica, R., Maloneya, E., Mukherjib, S.K., Madirajua, M., Rajagopalana, M. *Mycobacterium tuberculosis* ftsH expression in response to stress and viability. 2009. *Tuberculosis* 89 (2009) S1, S70–S73 Contents lists available at ScienceDirect *Tuberculosis* journal homepage: <http://intl.elsevierhealth.com/journals/t>

Martino,A. *Micobacteria and innate cells: critical encounter for immunogenicity* 2008. *JBiosci*;33:137-144.

Mayuri, Bagchi, G., Das, T.K., Tyagi, J.S. Molecular analysis of the dormancy response in *Mycobacterium smegmatis*: expression analysis of genes encoding the DevR-DevS two-component system, Rv3134c and chaperone alpha-crystallin homologues. 2002. *FEMS Microbiol Lett*, 211(2): p. 231-7.

McHugh, L. and Arthur, J. Computational methods for protein identification from mass spectrometry data. 2008. *PLoS Computational Biology*, vol. 4, n° 2, p. 1-12.

---

McNeil M, Daffe M, Brennan PJ. Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:13217–23

Mikusova K, Mikus M, Besra GS, Hancock I, Brennan PJ. Biosynthesis of the linkage region of the mycobacterial cell wall. 1996. *J. Biol. Chem.* 271:7820–28

Mikusova K, Huang H, Yagi T, Holsters M, Vereecke D. Decaprenylphosphorylarabinofuranose, the donor of the D-arabinofuranosyl residues of mycobacterial arabinan, is formed via a two-step epimerization of decaprenylphosphoryl ribose. 2005. *J. Bacteriol.* 187:8020–25.

Minnikin D.E, Kremer L, Dover LG, Besra GS. The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. 2002. *Chem. Biol.* 9:545–53

Minnikin D.E. Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. 1982. In *The Biology of the Mycobacteria*, ed. CS Ratledge, J Stanford, pp. 95–184. London: Academic

Mishra AK, Krumbach K, Rittmann D, Appelmelk B, Pathak V. Lipoarabinomannan biosynthesis in *Corynebacterineae*: the interplay of two α(1R2)-mannopyranosyltransferases MptC and MptD in mannan branching. 2011. *Mol Microbiol* 80: 1241–1259.

Mohammandi, T., VabDAM, V., Sijbrandi R, Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveende Bruim, M., Nguyen-Disteche, M., De Kruijff, B., Breukink, E. Identification of FtsW as a transporter of lipid linked cell wall precursors across the membrane. 2011. *EMBO J.*;30:1425-1432

Molle, V., Soulat, D., Jault, J. M., Grangeasse, C., Cozzone, A. J. and Prost, J. F. Two FHA domains on an ABC transporter, Rv1747, mediate its phosphorylation by PknF, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. 2004. *FEMS Microbiol Lett.* **234**, 215-223

Molle, V., Kremer, L. Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. 2010. *Molecular microbiology* 75, 1064-1077, doi:10.1111/j.13652958.2009.07041.x.

Mukhopadhyay, S., Nair, S. and Ghosh, S. Pathogenesis in tuberculosis: transcriptomic approaches to unraveling virulence mechanisms and finding new drug targets. 2012. *FEMS Microbiol Rev*, 36(2): p. 463-85.

Muller, V.S., Jungblut, P.R., Meyer, T.F., Hunke, S. Membrane-SPINE: an improved method to identify protein-protein interaction partners of membrane proteins in vivo. 2011. *Proteomics*, 11(10): p. 2124-8

Nakedi KC, Calder B, Barnejee M, Giddey A, Nel AJ, Garnett S, et al. Identification of novel physiological substrates of *Mycobacterium Bovis* BCG Protein Kinase G (PknG) by label-free quantitative phosphoproteomics. 2005 *JMB*, Volume 350, Issue 5, 29 July 2005, p953-963.

Nataraj, V., Varela, C., Javid, A., Singh, A., Besra, G. S., and Bhatt, A. Mycolic acids:

---

deciphering and targeting the Achilles' heel of the tubercle bacillus. 2015. *Mol Microbiol* 98, 7-16.

Niederweis, M., Danilchanka, O., Huff, J., Hoffmann, C., Engelhardt, H. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol*, 2010. 18(3): p. 109-16.

Nigou, J., Gilleron, M., Rojas, M., Garcia, L.F., Thurnher, M., Puzo, G. Mycobacterial lipoarabinomannans: Modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. 2002. *Microbes Infect.* 4:945–53.

Nott, T.J., Kelly, G., Stach, L., Li, J., Westcott, S., Patel, D., Hunt, D.M., Howell, S., Buxton, R.S., O'Hare, H.M. An intramolecular switch regulates phosphoindependent FHA domain interactions in *Mycobacterium tuberculosis*. 2009. *Sci Signal* 2:ra12.

Oehlenschläger, C., Gersby, L., Ahsan, N., Pedersen, J., Kristensen, A., Solakova, T., Thelen, J., Fuglsang, A. Activation of the LRR Receptor-Like Kinase PSY1R Requires Transphosphorylation of Residues in the Activation Loop. 2017. *Frontiers in Plant Science.* 8. 2005. 10.3389/fpls.2017.02005.

O'Hare, H.M., Duran, R., Cervenansky, C., Bellinzoni, M., Wehenkel, A.M., Pritsch, O., Obal, G., Baumgartner, J., Vialaret, J., Johnsson, K.. Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. 2008. *Mol Microbiol* 70:1408-1423.

Ortalo-Magné, A., Andersen, A. B., and Daffé, M. The outermost capsular arabinomannans and other mannoconjugates of virulent and avirulent tubercle bacilli. 1996. *Microbiology* 142, 927–935.

Ortalo-Magné, A., Dupont, M.-A., Lemassu, A., Andersen, A. B., Gounon, P., and Daffé, M. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. 1995 *Microbiology* 141, 1609–1620.

Ortalo-Magné, A., Lemassu, A., Lanéelle, M.-A., Bardou, F., Silve, G., Gounon, P., Marchal, G., and Daffé, M. Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species. 1996 *J. Bacteriol.* 178, 456–461.

Ozanne, V., Ortalo-Magné, A., Vercellone, A., Fournié, J.-J., and Daffé, M.) Cytometric detection of mycobacterial surface antigens: exposure of mannosyl epitopes and of arabinan segment of arabinomannans. 1996 *J. Bacteriol.* 178, 7254–7259.

Plocinski, P., Ziolkiewicz, M., Kiran, M., Vadrevu, S.I., Nguyen, H.B., Hugonnet, J., Veckerle, C., Arthur, M., Dziadek, J., Dziadek, T.A., Cross, T.A., Madiraju, M., Rajagopalan, M. Characterization of CrgA, a new partner of the *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan polymerization complexes. 2011. *J. Bacteriol.* 193, 3246–3256.

Pai, M., Behr, M.A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boheme, C.C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., Raviglione, M. *Tuberculosis*, 2016. *Nature Reviews Disease Primers* volume 2, Article number: 16076

---

Pawelczyk, J. & Kremer, L. The molecular genetics of mycolic acid biosynthesis. 2014. *Microbiol Spectrum* 2, MGM2-0003-2013

Piersma, S.R., Warmoes, M.O., de Wit, M., de Reus, I., Knol, J.C., and Jimenez, C.R. Whole gel processing procedure for GeLC-MS/MS based proteomics. 2013. *Proteome Sci* 11:17.

Polcinski, P., Arora, N., Ksarva, J. Mycobacterium tuberculosis CwsA interacts with CrgA and wag 31 and the CrgA- CwsA complex is involved in PG synthesis and cell shape determination. 2012. *Jour.of.bact.* 194, 23, 6398.

R. Bansal-Mutalik, R and Nikaido, H. Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides, 2014. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 111) 4958–4963

Rana, A.K., Singh, A., Gurcha, S.S., Cox, L.R., Bhatt, A., Besra, G.S. Ppm1-Encoded Polyprenyl Monophosphomannose Synthase Activity Is Essential for Lipoglycan Synthesis and Survival in Mycobacteria. 2012. *PLOS ONE.* [www.plosone.org](http://www.plosone.org). Volume 7, Issue 10, e48211.

Raynaud, C., Etienne, G., Peyron, P., Lan elle, M.-A., and Daff , M. Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of Mycobacterium tuberculosis. 1998 *Microbiology* 144, 577–587.

Rong-Zhen, L., R-Z., Georgieva, P., Yu, J.G., Himo, F. Mechanism of Mycolic Acid Cyclopropane Synthase: A Theoretical Study *Biochemistry.* 2011. 50, 1505–1513 DOI: 10.1021/bi101493p

Roumestand C, Leiba J, Galophe N, Margeat E, Padilla A, Bessin Y, Barthe, P., Molle, V., Cohen-Gonsaud, M. Structural insight into the Mycobacterium tuberculosis Rv0020c protein and its interaction with the PknB kinase. 2011. *Structure*, 19:1525-34.

Roumestand, C., et al., Structural insight into the Mycobacterium tuberculosis Rv0020c protein and its interaction with the PknB kinase. 2011. *Structure* 19(10): p. 1525-34.

Roumestand, C., Leiba, J., Galophe, N., Margeat, E., Padilla, A., Bessin, Y., Barthe, P., Molle, V. and Cohen-Gonsaud, M. Structural insight into the Mycobacterium tuberculosis Rv0020c protein and its interaction with the PknB kinase. 2011. *Structure.* **19**, 1525- 1534

Roumestand, C., Leiba, J., Galophe, N., Margeat, E., Padilla, A., Bessin, Y., Barthe, P., Molle, V. and Cohen-Gonsaud, M. Structural insight into the Mycobacterium tuberculosis Rv0020c protein and its interaction with the PknB kinase. 2011. *Structure.* **19**, 1525- 1534

Sancho-Vaello, E., Albesa-Jov e, D., Rodrigo-Unzueta, A., Guerin, M.E. Structural basis of phosphatidylinositol mannosides biosynthesis in mycobacteria 2001. *Molecular and Cell Biology* Receive date: 10 August 2016 Revised date: 29 October 2016 Accepted date: 2 November 2001.

---

Santi, I., Dhar, N., Bousbaine, D., Wakamoto, Y. & McKinney, J. D. Single-cell dynamics of the chromosome replication and cell division cycles in mycobacteria. 2013. *Nature Commun.* 4, 1–10.

Sasseti, C., Boyd, D., Rubin, E. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. 2003. *Molecular microbiology*, vol. 48, n° 1, p. 77-84

Sasseti, C., Boyd, D., Rubin, E. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. 2003. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 12989-94.

Scherr, N., Honnappa, S., Kunz, G., Mueller, P., Jayachandran, R., Winkler, F., Pieters, J., and Steinmetz, M.O.. Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. 2007. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12151-12156.

Schleifer K.H, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. 1972. *Bacteriol. Rev.* 36:407–77.

Schnappinger D., Ehrt S., Voskuil M. I., Liu Y., Mangan J. A., Monahan I., Dolganov G., Efron B., Butcher P.D., Nathan C. y S. G. K. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal involved in trans mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. 2003. *Bioorg Chem*, 29, 164-67.

Schultz, C., Niebisch, A., Schwaiger, A., Viets, U., Metzger, S., Bramkamp, M., Bott, M. 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. 2009. *Molecular microbiology* 74, 724-741, doi:10.1111/j.13652958.2009.06897.x

Seidel M, Alderwick LJ, Birch HL, Sahm H, Eggeling L, Birch, H.L., Besra, G.S. Identification of a Novel Arabinofuranosyltransferase AftB Involved in a Terminal Step of Cell Wall Arabinan Biosynthesis in *Corynebacteriaceae*, such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. 2007. *JBC*, 282(20):14729-40.

Seidel,M,Alderwick,LJ,Birch,HL,Sahm,H,Eggeling,L,Besra,GS.IdentificationofanovelarabinofuranosyltransferaseAftBinvolvedinaterminalstepofcellwallarabinanbiosynthesisinCorynebacteriaceae,suchasCorynebacteriumglutamicumandMycobacteriumtuberculosis. 2007. *J.Biol.Chem.*282:14729–40.

Seiler, P. Cell-wall alterations as an attribute of *Mycobacterium tuberculosis* in latent infection. 2003. *J. Infect. Dis.* 188, 1326–1331.

Sharma, K., Gupta, M., Krupa, A., Srinivasan, N. and Singh, Y. EmbR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis*. 2006. *The FEBS journal.* **273**, 2711-2721

Sherman, D.R. and C. Grundner, Agents of change - concepts in *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr/Tyr phosphosignalling. 2014. *Mol Microbiol*, 94(2): p.231-41.

---

Shiloh, M.U. and Champion, P.A. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. 2010. *Curr Opin Microbiol.* 13(1): p. 86-92.

Singh, A., Gupta, A. K., Gopinath, K., Sharma, D., Sharma, P., Bisht, D., et al. Comparative proteomic analysis of sequential isolates of *Mycobacterium tuberculosis* sensitive and resistant Beijing type from a patient with pulmonary tuberculosis. 2016. *Int. J. Mycobacteriol.* 5(Suppl. 1), S123–S124. doi: 10.1016/j.

Sieker, L.C., Stenkamp, R.E., and LeGall, J.. Rubredoxin in crystalline state. 1994. *Methods Enzymol* 243:203-216.

Singh, B. Asymmetric growth and division in *Mycobacterium* spp.: compensatory mechanisms for non-medial septa. 2013. *Mol. Microbiol.* 88, 64–76.

Skovierova H, Larrouy-Maumus G, Zhang J, Kaur D, Barilone N. AftD, a novel essential arabinofuranosyltransferase from mycobacteria. 2009. *Glycobiology* 19:1235–47.

Skovierova,H,Larrouy-Maumus,G,Pham,H,Belanova,M,Barilone,N.Biosyntheticoriginof thegalactosaminesubstituentofarabinogalactanin*Mycobacteriumtuberculosis*.2010.*J.Biol.Chem.*285:41348– 55.

Squeglia, F., Ruggiero, A., Berisio, R. Chemistry of Peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis* Life Cycle: An off-the-wall Balance of Synthesis and Degradation. 2017. *Chemistry – A European Journal* Volume 24, Issue 11.

Steck, P.A., Schwartz, M.S., Rosendhal G, Gray R. Mycolic acids: a reinvestigation. 1978. *Jbiol chem*:253:5625-5709.

Sureka, K., Mukherjee, P., Hossain, S.K.T., Basu, J. Novel role of phosphorylation-dependent interaction between FtsZ and FipA in mycobacterial cell division. 2010. *PLoS ONE* 5, e8590.

Svenson, S., Pawlowski, A., Källeniuset, G., Hamasur, B. Towards new tuberculosis vaccines. 2010. *Hum Vaccin*, 6(4): p. 309-17.

Taus, T., Köcher, T., Pichler, P., Paschke, C., Schmidt, A., Henrich, C., Mechtler, K. Universal and Confident Phosphorylation Site Localization Using phosphoRS. 2011. *Journal of proteome research.* 10. 5354-62. 10.1021/pr200611n.

Thakur, M., Chakraborti, P.K. GTPase activity of mycobacterial Ftsz is impaired due to its transphosphorylation by the eukaryotic type ser thre kinase PknA. 2006. *Jniol chem* 281:401017-401113.

Timmins GS, Master S, Rusnak F, Deretic V. Requirements for nitric oxide generation from isoniazid activation in vitro and inhibition of mycobacterial respiration in vivo. 2004 *J Bacteriol.*;186(16):5427-31.

Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A. & Vollmer, W. From the regulation of

---

peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. 2012. *Nature Rev. Microbiol.* 10, 123–136.

Trinkle-Mulcahy L, Boulon S, Lam YW, Urcia R, Boisvert FM, Vandermoere F, et al. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. 2008. *The Journal of cell biology*;183:223-39.

Trunkfield AE, Gurcha SS, Besra GS, Bugg TD. Inhibition of *Escherichia coli* glycosyltransferase MurG and *Mycobacterium tuberculosis* Gal transferase by uridine-linked transition state mimics. 2010. *Bioorg. Med. Chem.* 18:2651–63.

Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A. & Vollmer, W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. 2012 *.Nature Rev. Microbiol.* 10, 123–136.

Van Beilen, J.B., Neuenschwander, M., Smits, T.H., Roth, C., Balada, S.B., and Witholt, B. Rubredoxins involved in alkane oxidation. 2002. *J Bacteriol* 184:1722-1732.

Verma, R., Pinto, S. M., Patil, A. H., Advani, J., Subba, P., Kumar, M., et al. (2017). Quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis of H37Ra and H37Rv strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Proteome Res.* 16, 1632–1645. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00983.

Villarino, A, Duran, R., Wehenkel, A., Fernandez, P., England, P., Brodinc, P., Cole, S-T, Zimny- Arndt, U., Jungblut, P.R., Cerveñansky, C., Alzari, P.M. Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. 2005. *J Mol Biol.*, 350(5): p. 953-63.

Walburger, A., Koul, A., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, C., Pieters, J. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. 2004. *Science*, 304: 1800-4.

Wang,J., Li, C., Yang,H., Mushegian, A., Jin, S. A novel serine/threonine protein kinase homologue of *Pseudomonas aeruginosa* is specifically inducible within the host infection site and is required for full virulence in neutropenic mice. 1998. *Journal of bacteriology*, vol. 180, n° 24, p. 593-603.

Warner, D.F. and Mizrahi, V. A pseudokinase debut at the Mycobacterial Cell Wall. 2012*Sciencesignaling.org.* vol 5 Issue 208

Warner,D.F., and Mizrahi, V. Tuberculosis chemotherapy: the influence of bacillary stress and damage response pathways on drug efficacy. 2006.*Microbiol.rev.*19,558-570.

Warwick, J.B., Paul, W., Winter, N. Mechanisms of persistence of mycobacteria.1994. *Trend microbiol*:2:284-288.

Wayne LG, Hayes LG. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. 1996. *Infect Immun* 64:2062-2069.

---

Wehenkel, A., Bellinzoni, M., Grana, M., Duran, R., Villarino, A., Fernandez, P., Andre-Leroux, G., England, P., Takiff, H., Cervenansky, C., Cole, S. T., and Alzari, P. M. Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential. 2008. *Biochim Biophys Acta* 1784, 193-202.

Wiley, J. Chapter 16 Mass Spectrometry. 2000. *Current Protocols in Protein Science*, New York, 16.0-16.2.

Wolff, K.A., De la Peña, A.H., Nguyen, H.T., Pham, T.H., Amzel, L.M., Gabelli, S.B. A Redox Regulatory System Critical for Mycobacterial Survival in Macrophages and Biofilm Development. 2015. *PLoS Pathog* 11(4): e1004839. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004839>

Wolucka BA, McNeil MR, de Hoffmann E, Chojnacki T, Brennan PJ. Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. 1994. *J. Biol. Chem.* 269:23328–35

Yang, W., Steen, H., Freeman, M. Proteomics approaches to the analysis of multiprotein signaling complexes. 2008. *Proteomics*, 8,832-851.

Yuan Y, Mead D, Benjamin G., Schroeder, G., Zhu, YaQi, Barry, C.E. The biosynthesis of mycolic acids in mycobacterium tuberculosis. 1998 *The journal of biological chemistry*, vol 273, No 33, pp 21282-21290

Zhang N, Torrelles JB, McNeil MR, Escuyer VE, Khoo K-H. The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region. 2003. *Mol Microbiol* 50: 69–76. 23.

Zhang, Y. J., Ioerger, T.R., Huttenhower, C., Long, J.E., Sasseti, C.M., Sacchettini, J.C., Rubin, E.J. et al. Global assessment of genomic regions required for growth in *Mycobacterium tuberculosis*. 2012. *PLoS Pathog*. 8, e1002946.

Zybailov, B.L., Florens, L., Washburn, M.P. Quantitative shotgun proteomics using a protease with broad specificity and normalized spectral abundance factors. 2007. *Molecular BioSystems*, vol. 3, n° 5, p. 354-360.

Herzberg, C., et al., SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. *Proteomics*, 2007. 7(22): p. 4032-5.

---

## 8. ANEXOS

### ANEXO 1: PROTEOMA DE FHAA- PROTEÍNAS DIFERENCIALES

Tabla 5.3. Proteínas detectadas exclusivamente en la cepa FhaA

Identificador UNIPROT	Nro. De réplicas	Nro. De espectros	Descripción
P17590	3	1062	Fha A M.tuberculosis (strain H37Rv)
A0QYH7	3	45	LysM domain protein
A0R3V8	3	41	Amino-acid acetyltransferase
A0QXA1	2	27	Ferredoxin-dependent glutamate synthase
A0R4L1	3	24	DNA-binding response regulator PhoP
A0QWK5	3	23	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
A0QQY3	2	20	Transcriptional regulator, XRE family
A0QP08	2	19	Uncharacterized protein
A0QWT1	2	18	DNA-directed RNA polymerase subunit omega
A0QZ37	2	18	Uncharacterized protein
A0R0S4	3	17	Decaprenyl diphosphate synthase
A0R7G2	2	17	Penicillin-binding protein 1A
A0QZY9	3	16	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)
A0R4H2	2	16	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurS
A0R477	3	15	Monooxygenase
A0R316	3	15	Uncharacterized protein
A0R2Z3	3	15	Patatin
A0R679	2	15	Uncharacterized protein
A0QSH3	3	14	Putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase
A0QQB2	3	14	Conserved hypothetical proline and threonine rich protein
A0R1X3	2	14	ThiS family protein
A0R6K3	2	14	Uncharacterized protein
A0QWJ2	3	13	Protein translocase subunit SecD
A0QX91	3	13	ABC transporter, ATP-binding component
A0R5Z2	3	13	Galactofuranosyl transferase GltI
A0QPW9	3	13	Methyltransferase type 11
A0QXP8	2	13	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase-related FMN-binding protein
A0QV11	2	13	Alpha/beta hydrolase fold family protein
A0R206	2	13	ATP synthase subunit a

A0QVB6	3	12	Putative oxidoreductase
A0QWF4	3	12	Dehydrogenase/reductase SDR family protein member 1
A0QP20	2	12	Uncharacterized protein
A0R4C4	3	11	Transcriptional regulatory protein
A0R0R3	2	11	Uncharacterized protein
A0QNQ5	2	11	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein
A0R4C0	2	11	Phosphate import ATP-binding protein PstB
A0QSH9	2	11	Methionine aminopeptidase
A0QTS8	3	10	Uncharacterized protein
A0QUF8	2	10	Uncharacterized protein
A0R719	2	10	Uncharacterized protein
A0QWQ1	2	10	AAA ATPase, central region
A0R334	2	10	Uncharacterized protein
A0QXV3	2	9	Putative esterase
A0R307	2	9	Uncharacterized protein
A0QYR7	2	9	Clp, N terminal
A0RIX5	2	9	Endo-type 6-aminohexanoate oligomer hydrolase
A0QYE1	2	9	Urease subunit beta
A0QQU9	2	9	Glyoxalase family protein
A0QW13	2	9	TrkA-N
A0QQB4	2	9	Isoniazid inducible protein IniA
A0QZX2	2	9	Phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase
A0R2S9	2	8	GCN5-related N-acetyltransferase
A0R0C8	2	8	Metallo-beta-lactamase
A0QV70	2	8	L-carnitine dehydratase/bile acid-inducible protein F
A0QYQ1	2	8	Pseudouridine synthase
A0R2Z1	3	7	Hydrolase, CocE/NonD family protein
A0QY53	2	7	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase 1
A0R024	2	7	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H
A0R2M2	2	7	Zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
A0R5J5	2	7	GatB/Yqey
A0QQT1	2	6	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IIA
A0QTS5	2	6	Glutaredoxin-like protein
A0QPD1	2	6	Acetyltransferase
A0R7G7	2	6	Alpha/beta hydrolase fold protein
A0QUZ5	2	6	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]

A0QPY2	2	5	Cold shock protein A cspA
A0QSR6	2	4	Alanine racemase
A0R096	2	4	GTP cyclohydrolase 1 type 2 homolog
A0R440	2	4	Glutathione S-transferase
A0R5J6	2	4	Uncharacterized protein
A0R293	2	4	Alkanal monooxygenase alpha chain
A0QSZ4	2	4	Alpha/beta hydrolase fold protein

Tabla 5.4. Proteínas detectadas exclusivamente en la cepa control

Identificador UNIPROT	Nro. De réplicas	Nro. De espectros	Descripción
A0R2V431	3	200	Uncharacterized protein
A0QUM5	3	120	Uncharacterized protein
A0QZ96	3	81	Universal stress protein family protein
A0R478	3	72	Putative universal stress protein UspA
A0R2V2	3	71	LuxR family two-component response regulator
A0QUM7	3	69	Hydrogenase-2, large subunit
A0QVQ8	3	67	Alanine dehydrogenase
A0R4B3	3	60	Acyl-acyl-carrier protein desaturase DesA1
A0R609	3	48	Catalase-peroxidase 1
A0R2J4	3	41	Helix-turn-helix motif
A0QRB0	3	35	Immunogenic protein MPB64/MPT64
A0R343	2	35	Amidate substrates transporter protein
A0R2V1	3	32	Helix-turn-helix motif
A0QPN1	3	32	Topoisomerase subunit TopoM
A0R2C3	3	31	Bacterial extracellular solute-binding protein
A0R087	3	28	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase
A0QW19	3	28	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase
A0R5R9	3	27	Trypsin
A0QZA2	3	27	Uncharacterized protein
A0QX80	3	26	Uncharacterized protein
A0QZ83	3	25	14 kDa antigen
A0QQK0	3	24	Phosphate acetyltransferase
A0QQD0	3	24	Chaperone protein DnaJ
A0R4D8	2	24	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase
A0QRD5	3	23	Uncharacterized protein
A0R1R5	2	22	Transcriptional regulator, TetR family
A0R627	2	22	Putative decaprenylphosphoryl-5-phosphoribose phosphatase
A0R584	3	21	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylidihydropteridine

			pyrophosphokinase
A0QPX4	3	21	ABC nitrate/sulfonate/bicarbonate transporter, ATPase subunit
A0QSM3	2	21	Cutinase
A0QPJ9	2	21	Hsp20/alpha crystallin family protein
A0R4E0	3	20	Amidophosphoribosyltransferase
A0QPJ0	3	19	Flavin reductase-like, FMN-binding protein
A0QNH8	3	19	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein
A0R1G3	2	19	Clavaldehyde dehydrogenase
A0R4N1	3	18	Conserved MCE-associated protein
A0QRR9	2	18	Serine/threonine-protein kinase PknE,
A0QU92	2	18	Dihydroxyacetone kinase, L subunit
A0QZR5	2	18	GntR family transcriptional regulator
A0R5V7	2	18	Uncharacterized protein
A0QSB8	3	17	Coenzyme pqq synthesis protein E pqqE
A0R775	3	17	Excinuclease ABC
A0QY05	3	17	Uncharacterized protein
A0R2S3	3	17	Uncharacterized protein
A0QWH0	2	17	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxT
A0R3V7	2	17	Heat shock protein Hsp20
A0R3Q0	3	16	CheR methyltransferase, SAM binding domain protein
A0R0Y6	3	16	GAF domain, putative
A0QPW0	3	16	Conserved hypothetical membrane protein
A0R0W2	2	16	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase
A0QTK6	2	16	S30AE family protein
A0QRI7	2	16	Tryptophan-rich sensory protein
A0R241	2	15	Adenylylsulfate kinase / sulfate adenylyltransferase subunit 1
A0R260	2	15	ABC transporter, ATP-binding protein OppD
A0QR35	2	15	Thiol-disulfide isomerase/thioredoxin
A0QX77	3	14	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase
A0R5B1	3	14	Uncharacterized protein
A0QPS6	3	14	6-phospho-beta-glucosidase
A0QW22	2	14	Uncharacterized protein
A0QRN7	3	13	Histidine ammonia-lyase
Q2YHI9	3	13	MmpS4
A0QZ86	3	13	Uncharacterized protein
A0QR18	3	13	Porphobilinogen deaminase
A0R450	3	13	Uncharacterized protein
A0R727	2	13	Glycerol operon regulatory protein
A0QUN9	2	13	Hydrogenase expression/formation protein

			HypD
A0QVL4	2	13	Chelatase
A0R3Y0	2	13	Uncharacterized protein
A0R5C4	3	12	D-amino acid aminohydrolase
A0R7H2	3	12	Putative transcriptional regulatory protein
A0QR24	2	12	Putative conserved transmembrane protein
A0QR09	2	12	DNA binding domain, excisionase family protein
A0R3C6	2	12	Transcriptional regulator, TetR family protein
A0QS07	2	12	TetR family protein regulatory protein
A0QS64	2	12	ABC transporter, ATP-binding protein
A0QV01	2	12	Uracil-DNA glycosylase
A0QTL4	3	11	Fatty acid desaturase
A0R3B7	2	11	Septum formation initiator subfamily protein, putative
A0QTT0	2	11	DNA helicase
A0QXZ4	2	11	Tena/thi-4 family protein
A0QR65	2	11	Acetyltransferase, GNAT family
A0R3B5	2	11	Immunogenic protein MPT63
A0QVM1	2	11	Conserved hypothetical alanine rich protein
A0QS90	2	11	Alcohol dehydrogenase, class IV
A0QUG4	2	11	ThiF family protein
A0QUN1	3	10	Tetratricopeptide repeat domain protein
A0R6P9	3	10	Transcriptional regulator, TetR family
A0R219	3	10	Homoserine kinase
A0R4N7	3	10	MCE-family protein MCE4b
A0R529	2	10	Trehalose 6-phosphate phosphatase
A0QPW1	2	10	MarR family transcriptional regulator
A0R5S2	2	10	Transcription elongation factor
A0R757	2	10	D-erythrulose-4-phosphate isomerase 2
A0QR31	2	10	Uncharacterized protein
A0QUN5	2	10	Hydrogenase accessory protein HypB
A0R2Q0	2	10	Carbonic anhydrase/acetyltransferase isoleucine patch superfamily-like protein
A0R2P2	2	10	Alpha-methylacyl-CoA racemase Mcr
A0R4A9	2	10	Uncharacterized protein
A0QYH2	2	10	Putative fumarate reductase/succinate dehydrogenase
A0R731	2	10	Activator of Hsp90 ATPase 1-like protein
A0QX98	2	10	Prolipoprotein diacylglyceryl transferase
A0R373	2	10	Ectoine/hydroxyectoine ABC transporter solute-binding protein
A0QWT4	3	9	ABC transporter ATP-binding protein
A0R2I4	3	9	FO synthase

A0QQY0	3	9	Polyphosphate kinase 2 superfamily protein
A0QUZ7	3	9	D-alanine--D-alanine ligase
A0R080	2	9	D-aminoacyl-tRNA deacylase
A0QNM5	2	9	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein
A0QVY8	2	9	Transcriptional repressor NrdR
A0QZH0	2	9	TetR-family protein transcriptional regulator
A0QQD1	2	9	Putative heat shock protein transcriptional regulator Hspr (Merr family)
A0R292	2	9	Uncharacterized protein
A0R3B6	2	9	Exopolyphosphatase
A0QQ16	2	9	Uncharacterized protein
A0R1C8	3	8	Diacylglycerol O-acyltransferase
A0R148	2	8	Glutamate 5-kinase
A0QSX7	2	8	Roadblock/LC7 domain protein
A0QT68	2	8	Uncharacterized protein
A0R1J8	2	8	Probable regulatory protein
A0R1D7	2	8	Acyl-CoA dehydrogenase
A0R2L4	2	8	Base excision DNA repair protein, HhH-GPD family protein
A0R6B0	2	8	ATP binding protein
A0R0Z5	2	8	GCN5-related N-acetyltransferase
A0R3L5	2	8	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase
A0QT10	2	8	Succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit
A0QWT2	2	8	Phosphopantothenoylcysteine decarboxylase/phosphopantothenate-cysteine ligase
A0QWM9	2	8	Conserved protein
A0QNH2	2	8	TetR-family protein transcriptional regulator
A0QSR8	2	8	Uncharacterized protein
A0R565	2	7	Uncharacterized protein
A0QUI9	2	7	TetR family transcriptional regulator
A0QU11	2	7	Uncharacterized protein
A0R295	2	7	Putative transcriptional regulator
A0R129	2	7	Putative conserved lipoprotein lpph
A0QRG5	2	7	2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase
A0QYB3	2	7	Xylitol-binding protein
A0R5Y8	2	7	Quinone oxidoreductase
A0QSP2	2	7	Glycerol dehydratase
A0QNL9	2	7	Putative transcriptional regulator
A0R6M7	2	7	PadR-like family transcriptional regulator
A0QPM0	2	7	Amidohydrolase family protein

<b>A0QPD6</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>Glycosyl hydrolase family protein 3</b>
<b>A0QNQ7</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>Cyclase/dehydrase family protein</b>
<b>A0QS18</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>Peptide chain release factor 3</b>
<b>A0R5V1</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>Glycerol dehydratase large subunit</b>
<b>A0QZ93</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>Uncharacterized protein</b>
<b>A0QTY5</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>Regulatory protein GntR, HTH:GntR</b>
<b>A0QW30</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>Bifunctional enzyme riboflavin biosynthesis protein ribD : diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase + 5-amino-6-(5- phosphoribosylamino)uracil reductase</b>
<b>A0QRC0</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>O-succinylbenzoic acid--CoA ligase</b>
<b>A0QNM0</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>Probable transcriptional regulatory protein</b>

## **ANEXO II: INTERACTOMA DE FHA A SIN ENTRECruzAMIENTO**

**Tabla 5.5. Proteínas exclusivamente identificadas en los complejos aislados de la cepa FhaA.**

<b>Identificador UNIPROT</b>	<b>Nro. de réplicas</b>	<b>Nro. de espectros</b>	<b>Descripción</b>
	<b>3</b>	<b>583</b>	<b>Fha A M.tuberculosis (strain H37Rv)</b>
<b>A0QWY3</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>Quinone oxidoreductase</b>
<b>A0QV18</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>Uncharacterized protein</b>
<b>A0QWL3</b>	<b>2</b>	<b>28</b>	<b>Extracellular ligand-binding receptor</b>

---

## 9. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a Rosario por toda la dedicación brindada para poder hoy finalizar este trabajo. Cada momento de discusión de experimentos y resultados fueron una experiencia que sin lugar a dudas colaboraron con mi crecimiento profesional. Con respecto a la parte humana no hay más que decir infinitas gracias también por cada palabra y momento compartido. Rosario es medio tutora, medio mamá.... con rezongos incluidos.

Agradecerle también a Carlos por haberme convencido también de embarcarme en un proyecto totalmente diferente a lo que venía haciendo, por animarme a cambiar para bien, y como siempre digo por dejarme llegar a este laboratorio habiendo venido un mes después de la fecha acordada.

Agradecer a mis compañeros de UByPA porque como digo siempre que mejor que estar en este Laboratorio. Todos han colaborado de alguna forma con una recomendación, idea, o simplemente una palabra de aliento. En especial quisiera agradecerle a Made por ser mi apoyo y gran compañera en las últimas etapas. Trabajando a la par para conseguir los últimos resultados. Sin dudas el trabajo de a dos es mucho mejor pero estar con Made es insuperable. Quedarán en el recuerdo las trasnochadas transformando micobacterias, o los protocolos interminables. Y quedarán en el corazón todo el cariño brindado desde hace ya tantos años.

Otra persona fundamental en este camino a quien sin dudas tengo que agradecer es a Maggie, sin su trabajo previo este trabajo no existiría. Agradecerle por las primeras aproximaciones a *M. tuberculosis* y los primeros experimentos juntas donde metódicamente me enseñó lo necesario para luego seguir adelante. Mucha suerte tuve de heredar este trabajo de las manos de alguien como Maggie. No terminé escribiendo los días que me llevaban cada experimento, pero sí dibujando caras en la cuadernola que reflejaran el resultado de los mismos. Además te llevaste al Dott lejos así que eso ya de por sí es para agradecerte.

Agradecerle a mi madre, que otra madre más que la mía me iba a traer a la madrugada a cortar un cultivo?... esperarme y todavía preguntarme si creció o no días después... no hay palabras para todo lo brindado desde que tengo memoria.

Agradecerle al resto de familia y amigos y por apoyarme, no es fácil repartirse entre varias vidas, estar ausente a veces y que siempre te disculpen estar un poco cansado... por eso son grandes y es una suerte contar con ellos.

Agradecerle especialmente a Federico, mi esposo, cada logro es de los dos siempre y este logro será de tres. Gracias por bancarme no estar o estar a medias... por cada comida preparada, cada vasito de agua a las 5 de la mañana y por tanto apoyo incondicional.

Gracias a todos los que vivieron este camino junto a mí.