



INSTITUT PASTEUR  
de Montevideo



## Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas

### Pro.In.Bio

# Aproximaciones proteómicas aplicadas al estudio de problemas biomédicos: mecanismo de acción de un fármaco anti-obesidad e identificación de componentes del divisoma de *Corynebacteriales*

Autor: Lic. Alejandro Leyva Peña

Orientadores de tesis:

Dr. Carlos Batthyány

Dr. Carlos Escande

Montevideo, diciembre 2024



AGENCIA NACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN

---

## Contenido

1.	ABREVIACIONES	1
2.	ESTRUCTURA DEL TRABAJO DE TESIS	2
3.	CAPÍTULO I: APROXIMACIONES PROTEÓMICAS PARA DILUCIDACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL SANA	3
3.1.	Resumen	3
3.2.	Introducción	4
3.2.1.	Obesidad: avances y desafíos en el tratamiento	4
3.2.2.	Fisiopatología de la obesidad. Balance entre la ingesta y el gasto energético	5
3.2.3.	Tratamientos: disminución de la ingesta y aumento del gasto energético	11
3.2.4.	Medicamentos contra la obesidad	13
3.2.5.	Nitroalquenos.	16
3.2.6.	Salicilato: seguridad y efectos metabólicos.	27
3.2.7.	Proteómica basada en espectrometría de masa aplicada al descubrimiento de mecanismos de acción fármacos	29
3.2.8.	Proteómica basada en espectrometría de masa	31
3.2.9.	Identificación de blancos y mecanismos de acción de drogas	35
3.3.	Objetivos específicos del capítulo I	37
3.4.	Resultados	38
3.4.1.	Síntesis y reactividad del SANA	38
3.4.2.	Efectos del SANA en un modelo de obesidad inducido por dieta rica en grasa (HFD)	42
3.4.3.	Evaluación de la forma saturada del SANA en el modelo de DIO	45
3.4.4.	Análisis proteómico del tejido adiposo blanco inguinal (iWAT)	46
3.4.5.	Análisis proteómico de mitocondrias enriquecidas a partir de tejido adiposo blanco inguinal (iWAT)	53
3.4.6.	Validación del mecanismo propuesto como responsable de los efectos metabólicos del SANA	64
3.4.7.	Análisis de los niveles de expresión de marcas moleculares del metabolismo de un carbono vinculadas a la síntesis de creatina	68
3.4.8.	Identificación de proteínas de unión a SANA	79
3.5.	Manuscrito: "A nitroalkene derivative of salicylate alleviates diet-induced obesity by activating creatine metabolism and non-shivering thermogenesis"	96
3.6.	Discusión	154
3.7.	Materiales y métodos	166
3.7.1.	Reactivos	166
3.7.2.	Animales	166
3.7.3.	Síntesis del ácido 5-(2-nitroetenil)salicílico (SANA)	166
3.7.4.	Análisis por espectrometría de masa de alta resolución (HRMS) del SANA	166
3.7.5.	Modelo de obesidad inducida por dieta (DIO)	167
3.7.6.	Medición de glucosa en plasma	167
3.7.7.	Medición de insulina y ácidos grasos no esterificados (NEFA)	167
3.7.8.	Enriquecimiento de mitocondrias iWAT	167
3.7.9.	Extracción de proteínas	168
3.7.10.	Análisis proteómico de extractos totales y mitocondriales de tejido adiposo blanco subcutáneo	168
3.7.11.	Determinación de la abundancia de proteínas mitocondriales por espectrometría de masa	171

---

---

3.7.12.	Análisis por western blot (WB) en mitocondrias aisladas de iWAT	171
3.7.13.	Aislamiento de ARN y Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa Cuantitativa en Tiempo Real (qPCR)	172
3.7.14.	Análisis de metabolitos por LC-MS/MS	173
3.7.15.	Imágenes térmicas	173
3.7.16.	Efecto del antagonista de la creatina $\beta$ -GPA en la respuesta al frío	173
3.7.17.	Modelo murino de respuesta al frío al frío	174
3.7.18.	Análisis del proteoma mitocondrial de hígado en un modelo murino de respuesta al frío	174
3.7.19.	Síntesis de SANA unido a biotina (bSANA)	175
3.7.20.	Análisis de las propiedades electrofílicas del SANA y SANA-biotinilado	176
3.7.21.	Estudio por espectrometría de masa de la reactividad de SANA y SANA biotinilado con catalasa bovina	177
3.7.22.	Identificación de proteínas de unión a SANA	178
3.7.23.	Análisis de la interacción SANA-CKMT2	179
3.7.24.	Análisis estadístico	180
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO II: IDENTIFICACIÓN DE MIEMBROS DEL DIVISOMA DE <i>CORYNEBACTERIALES</i> MEDIANTE INTERACTÓMICA CUANTITATIVA BASADA EN ESPECTROMETRÍA DE MASA</b>	<b>181</b>
<b>4.1.</b>	<b>Resumen</b>	<b>181</b>
<b>4.2.</b>	<b>Introducción</b>	<b>182</b>
<b>4.3.</b>	<b>Objetivo específico del capítulo II</b>	<b>184</b>
<b>4.4.</b>	<b>Descripción de los principales resultados</b>	<b>185</b>
<b>4.5.</b>	<b>Artículo: "Eukaryotic-like gephyrin and cognate membrane receptor coordinate corynebacterial cell division and polar elongation"</b>	<b>189</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>227</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>228</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>241</b>
<b>7.1.</b>	<b>Anexo 1. Otros artículos publicados en el período 2016-2024</b>	<b>241</b>
<b>7.2.</b>	<b>Anexo 2. Proteínas exclusivamente detectadas en proteomas totales, iWAT</b>	<b>243</b>
<b>7.3.</b>	<b>Anexo 3. Proteínas diferencialmente abundantes en proteomas totales, iWAT</b>	<b>247</b>
<b>7.4.</b>	<b>Anexo 4. Proteínas exclusivamente detectadas en proteomas mitocondriales, iWAT</b>	<b>251</b>
<b>7.5.</b>	<b>Anexo 5. Proteínas diferencialmente abundantes en proteomas mitocondriales, iWAT</b>	<b>260</b>
<b>7.6.</b>	<b>Anexo 6. Proteínas exclusivas proteomas mitocondriales de hígado, 4 °C vs 22 °C</b>	<b>273</b>
<b>7.7.</b>	<b>Anexo 7. Proteínas de unión a SANA</b>	<b>278</b>

---

## 1. Abreviaciones

BCAA: (del inglés: branched chain aminoacids): aminoácidos de cadena ramificada  
BME:  $\beta$ -mercaptoetanol  
BMI: (del inglés: body mass index): índice de masa corporal.  
CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.  
CB: cirugía bariátrica  
CKD: (del inglés: chronic kidney disease): enfermedad renal crónica  
DCC: N,N'-díciclohexilcarbodiimida.  
DCM: diclorometano.  
DMF: N,N-dimetilformamida.  
DMT2: diabetes mellitus tipo 2.  
ECNT: enfermedades crónicas no transmisibles.  
EtOAc: acetato de etilo.  
FDA (del inglés: US Food and Drug Administration): Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU.  
FDR (del inglés: false discovery rate): tasa de descubrimientos falsos.  
FFA (del inglés: free-fatty acids): ácidos grasos libres.  
HFD (del inglés: high-fat diet): dieta rica en grasa.  
HRMS (del inglés: high resolution mass spectrometry): espectrometría de masa de alta resolución.  
HRP: (del inglés horseradish peroxidase): peroxidasa de rábano picante.  
IP: administración por vía intraperitoneal.  
LC-MS (del inglés: liquid chromatography-mass spectrometry): Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa.  
LPS: lipopolisacárido.  
NEFA (del inglés: non-esterified fatty acids): ácidos grasos no esterificados.  
ns: sin diferencia estadísticamente significativa.  
NSAF (del inglés: normalized spectral abundance factor): factor de abundancia espectral normalizado.  
NTS (del inglés: non-shivering thermogenesis): termogénesis libre de temblor.  
OAA: oxaloacetato.  
PEP: (del inglés: phosphoenolpyruvate): fosfoenolpiruvato.  
PCr: fosfocreatina.  
PCK: (del inglés: phosphoenolpyruvate carboxykinase): fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.  
PDC: (del inglés: pyruvate dehydrogenase complex): complejo piruvato deshidrogenasa.  
PO: administración por vía oral.  
RYGB: bypass gástrico en Y de Roux.  
SA: ácido salicílico.  
SC: conteo de espectros.  
SEM (del inglés: standard error of the mean): error estándar de la media.  
TG: triglicéridos.  
THF: tetrahidrofurano.  
VSG: gastrectomía vertical en manga

## 2. Estructura del trabajo de tesis

Mi formación doctoral se desarrolló en el contexto de una plataforma tecnológica especializada en el análisis proteómico basado en espectrometría de masa para la resolución de diferentes problemas biológicos. Considerando la importancia de esta herramienta en las investigaciones biomédicas y en línea con un enfoque colaborativo de la plataforma tecnológica en la que trabajo, a lo largo de mi trabajo doctoral, tuve la oportunidad de aplicar los conocimientos que íbamos desarrollando a la resolución de diversos problemas biológicos (ver publicaciones en el Anexo 1).

*En mi tesis de doctorado nos enfocamos en el uso de estrategias proteómicas para dar respuesta a dos problemas de relevancia biomédica que se presentan en dos capítulos independientes, vinculados a un manuscrito en revisión y una publicación de los que soy co-primer autor.*

El Capítulo I comprende el estudio del mecanismo de acción de un nuevo fármaco desarrollado por nuestro grupo de trabajo. Este capítulo constituyó el núcleo de mi trabajo de tesis e implicó el desarrollo de las estrategias proteómicas presentadas. Los resultados obtenidos forman parte del manuscrito titulado “A nitroalkene derivative of salicylate alleviates diet-induced obesity by activating creatine metabolism and non-shivering thermogenesis” (actualmente en proceso de evaluación por la revista Nature Metabolism).

En el Capítulo II se aborda la identificación de interactores del divisoma en *Corynebacteriales*. Los resultados obtenidos forman parte de mi segundo artículo de co-primer autor: “Eukaryotic-like gephyrin and cognate membrane receptor coordinate corynebacterial cell division and polar elongation” (Martinez et al., 2023, Nature Microbiology).

### 3. Capítulo I: Aproximaciones proteómicas para dilucidación del mecanismo de acción del SANA

#### 3.1. Resumen

Las enfermedades metabólicas crónicas, como la obesidad y la diabetes tipo II, constituyen uno de los mayores retos para los sistemas de salud actuales. Estas enfermedades suelen estar asociadas a un estado inflamatorio sistémico estéril y de bajo grado. Nuestro grupo ha trabajado en el desarrollo de derivados nitroalquenos de diferentes sillares estructurales y que ejercen propiedades antiinflamatorias beneficiosas en diferentes modelos preclínicos de enfermedades. En uno de estos desarrollos buscamos potenciar las propiedades antiinflamatorias y metabólicas del fármaco ancestral salicilato mediante la adición de un grupo funcional nitroalquenilo generando el ácido 5-(2-nitroetilénico)salicílico (SANA). En este trabajo se estudiaron los efectos metabólicos de este compuesto en un modelo murino de obesidad inducida por dieta (DIO). El SANA redujo la obesidad, mejoró la resistencia a la insulina, la hipertrigliceridemia y la esteatosis hepática a dosis notablemente menores que las usadas anteriormente con salicilato. Para entender el mecanismo de acción del SANA, aprovechamos las capacidades analíticas de la proteómica cuantitativa no dirigida. El análisis de los cambios proteómicos generados por el SANA a nivel del proteoma total del tejido blanco subcutáneo de ratones en DIO, nos permitió demostrar que el fármaco induce un estado catabólico asociado a la fosforilación oxidativa y la termogénesis en el tejido adiposo. Posteriormente extendimos el estudio a extractos mitocondriales del mismo tejido y pudimos identificar marcas moleculares de una vía de termogénesis dependiente de creatina como responsable de los efectos metabólicos del SANA. Este mecanismo de acción del fármaco fue posteriormente validado mediante el análisis de niveles de ARNm, el estudio de metabolitos por LC-MS/MS y ensayos en modelos animales. A su vez, utilizando un análogo biotinilado del fármaco identificamos posibles blancos moleculares del SANA. Entre ellos se destacan las creatina quinasas CKMT1/2 como las principales proteínas de unión al fármaco en el tejido adiposo marrón. Posteriormente demostramos que el SANA es capaz de modificar covalentemente las cisteínas (preferentemente Cys<sub>238</sub>) de CKMT2 murina recombinante *in vitro*. ***En suma, nuestra contribución permitió identificar el mecanismo por medio del cual el SANA induce la pérdida de peso en ratones obesos.***

## **3.2. Introducción**

### **3.2.1. Obesidad: avances y desafíos en el tratamiento**

La creciente prevalencia de las enfermedades no transmisibles (ECNT) constituye uno de los principales desafíos actuales de los sistemas de salud pública a nivel global <sup>1</sup>. Los principales tipos de ECNT son las enfermedades cardiovasculares (como los infartos de miocardio y los accidentes cerebrovasculares), los cánceres, las enfermedades respiratorias crónicas (como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el asma) y la diabetes <sup>2</sup>. Estas enfermedades causan más del 70% de las muertes mundiales <sup>1</sup>. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), sin una intervención drástica, la meta de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de reducir en un tercio la mortalidad prematura por ECNT para 2030 no será alcanzada <sup>3</sup>. El auge de las ECNT está parcialmente relacionado con el incremento global de las enfermedades metabólicas. Dicho término engloba condiciones como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), la hiperlipidemia (HLD), la obesidad y más recientemente, la esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH, antes conocida como esteatohepatitis no alcohólica o NASH). Esta última constituye la forma más grave de la enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASLD), antes conocida como enfermedad del hígado graso no alcohólico o NAFLD) <sup>4</sup>. Estas enfermedades a menudo coexisten, comparten factores de riesgo similares y están asociadas con un aumento en el riesgo de discapacidad, cáncer y mortalidad prematura <sup>5</sup>. Cerca del 40% de los adultos a nivel mundial tienen sobrepeso o son obesos <sup>1</sup>. A partir de los resultados de un estudio sistemático que estima las tasas de mortalidad por edad, sexo y lugar en todo el mundo (Estudio sobre la carga mundial de morbilidad, lesiones y factores de riesgo (GBD) entre 1990 y 2019 <sup>6</sup> se encontró que la tendencia general de las muertes relacionadas con enfermedades metabólicas entre 2000 y 2019 aumentó de forma constante, siendo la obesidad la de mayor carga absoluta y con mayor proporción de mortalidad (40,36% en hombres y 41,83% en mujeres, en 2019) en comparación con el resto de las enfermedades metabólicas analizadas <sup>5</sup>. Las tasas de obesidad son cerca de tres veces más altas que hace 50 años y son especialmente preocupantes en niños y adolescentes, una franja etaria en la que casi se han quintuplicado. La región de las Américas tiene la prevalencia más alta de todas las regiones de la OMS, con un 62,5% de adultos con sobrepeso u obesidad (64,1% de los hombres y 60,9% de las mujeres) <sup>7</sup>. La Encuesta de Nutrición, Desarrollo Infantil y Salud (ENDIS) llevada a cabo en Uruguay en 2018 mostró que la

prevalencia de sobrepeso u obesidad en niños menores de 4 años es del 12.3% <sup>8</sup>. Mientras tanto, aproximadamente el 40% de los niños en edad escolar y el 65% de los adultos tiene algún grado de sobrepeso u obesidad <sup>9</sup>. Esta enfermedad de magnitud pandémica alcanza a personas de todas las edades y de todos los grupos sociales a nivel mundial.

La obesidad se define como el exceso de peso corporal para una determinada estatura y es, desde el 2013, considerada una enfermedad en sí misma (obesidad: enfermedad crónica prevalente, compleja, progresiva y recidivante, caracterizada por grasa corporal anormal o excesiva adiposidad, que perjudica la salud) <sup>10</sup>. El índice de masa corporal (BMI) (peso en kg/(altura en m)<sup>2</sup>) es la fórmula más utilizada para definir el sobrepeso (IMC de 25 a 29,9 kg/m<sup>2</sup>) y la obesidad (IMC  $\geq$ 30 kg/m<sup>2</sup>) y aunque no refleja directamente la adiposidad <sup>11,12</sup>, es considerado un estándar en la definición del estado del peso y resulta muy útil en estudios epidemiológicos. La patogénesis de la obesidad es multicausal e implica complejas interacciones entre factores fisiológicos, genéticos, epigenéticos, conductuales, ambientales, socioeconómicos, culturales, médicos, entre otros <sup>12,13</sup>.

### **3.2.2. Fisiopatología de la obesidad. Balance entre la ingesta y el gasto energético**

Aunque las causas de la obesidad son multifactoriales, el mayor consenso vincula la acumulación de grasa a un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las gastadas <sup>12,13</sup>. El aumento en la disponibilidad de alimentos hipercalóricos y la disminución de la actividad física son dos factores comportamentales que contribuyen significativamente al auge de la epidemia de obesidad <sup>14</sup>. La privación del sueño, la desincronización circadiana, el estrés crónico también pueden favorecer el aumento de peso <sup>15</sup>. En la progresión de la obesidad, el depósito de lípidos en el tejido adiposo puede superar la capacidad de almacenamiento de los adipocitos, dando lugar a concentraciones circulantes elevadas y a una acumulación inapropiada de lípidos en múltiples tejidos, entre los que destacan el hígado y el músculo esquelético. Los depósitos de grasa en dichos tejidos son capaces de iniciar la inflamación tisular, el estrés del retículo endoplásmico (RE) y la disfunción endotelial, acelerando el desarrollo de patologías asociadas a la obesidad, como la resistencia a la insulina y la DMT2 <sup>16</sup>. El aumento de peso y la obesidad van acompañados de la activación de al menos dos vías inflamatorias en el tejido adiposo y el hígado, la quinasa de estrés JNK y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que aumenta la producción de citoquinas y quimiocinas

proinflamatorias (por ejemplo, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1b, resistina y MCP-1) y promueve el reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo. Los mediadores inflamatorios inducen resistencia a la insulina a nivel local en la grasa y el hígado, y a nivel sistémico en el músculo esquelético <sup>17</sup>.

Además de la heredabilidad, la interacción entre genes y medio ambiente desempeña un rol importante en la regulación del peso corporal y el equilibrio energético <sup>18</sup>. Un factor determinante de dicha interacción son las modificaciones epigenéticas de los genes a través de la metilación, las modificaciones de las histonas, la remodelación de la cromatina y las alteraciones del ARN no codificante <sup>12,19</sup>. Los procesos epigenéticos también se encuentran entre los mecanismos moleculares responsables de la programación metabólica en las primeras etapas de la vida <sup>20</sup> y la predisposición a un mayor riesgo de obesidad en la adultez determinado epigenéticamente puede transmitirse a las generaciones futuras, acelerando aún más la epidemia de obesidad <sup>12</sup>.

Más de una centena de regiones cromosómicas humanas se han visto asociadas a la obesidad, con sólo algunos pocos genes identificados como responsables de grandes efectos, como los que codifican para los componentes de la señalización de la leptina y la melanocortina <sup>21</sup>. La obesidad se asocia a la expresión de un gran número de genes con pequeños efectos individuales <sup>12,19</sup>. La expresión génica relacionada con el IMC y la adiposidad general está muy enriquecida en el sistema nervioso central <sup>22</sup>. Estos niveles de expresión, unidos a modificaciones epigenéticas sugieren que los genes de la obesidad, además de actuar a nivel del regulador homeostático hipotalámico del equilibrio energético, también influyen sobre circuitos neuronales como los que subyacen a la toma de decisiones basada en la recompensa, el aprendizaje y la memoria, los cuales participan en interacciones con un entorno obesogénico <sup>12</sup>.

La activación de diversas zonas y redes cerebrales que participan en la estimulación de la ingesta producida por los alimentos, fundamentalmente sabrosos y de alta energía, contribuye al desarrollo de la obesidad. Además, la capacidad de autocontrol mediada por redes inhibitorias de la ingesta está disminuida en individuos obesos <sup>12</sup>.

Las hormonas que controlan el apetito y la saciedad forman parte de un complejo sistema neuroendocrino basado en la señalización bidireccional entre los principales centros de

alimentación del encéfalo y el tracto gastrointestinal, el hígado, el páncreas y el tejido adiposo. Estos órganos secretan diversas hormonas reguladoras de la ingesta, que actúan conjuntamente sobre el encéfalo, en particular el hipotálamo y/o el rombencéfalo, para modular el apetito y la saciedad, funcionando como reguladores a corto o largo plazo. A corto plazo la grelina puede ser secretada de manera anticipada a los nutrientes, mientras que la colecistocinina (CCK), el péptido tirosina tirosina (PYY), el péptido similar al glucagón 1 (GLP1), el péptido insulínotropo dependiente de la glucosa (GIP) y la oxintomodulina (OXM) se secretan como respuesta a los mismos a nivel del aparato digestivo. El glucagón y el factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21) son secretados en condiciones de privación de nutrientes. Los reguladores a largo plazo como la leptina, la insulina y la amilina transmiten señales al cerebro de la cantidad de grasa almacenada en el cuerpo <sup>15</sup>. La desregulación de este sistema neuroendocrino por acumulación de metabolitos lipídicos, la señalización inflamatoria u otros mecanismos de deterioro de las neuronas hipotalámicas también pueden conducir a la obesidad <sup>13</sup>.

El gasto energético es el otro componente de la regulación del equilibrio energético asociado al peso corporal. Está conformado por el metabolismo basal, el efecto térmico de los alimentos, la termogénesis para mantener la temperatura corporal y la actividad física, cada uno con sus propios controles neuronales y vías efectoras <sup>23</sup>. La tasa metabólica basal está determinada principalmente por la masa libre de grasa, en la que el músculo esquelético, junto con otros órganos metabólicamente activos, como el hígado, el corazón, el cerebro y los riñones, desempeña un rol fundamental <sup>24</sup>. El músculo consume más de las tres cuartas partes de la glucosa absorbida como consecuencia del estímulo de la insulina, por lo que resulta clave en la eliminación de glucosa. Además, durante una demanda de energía prolongada, posee la flexibilidad metabólica para cambiar de la utilización de carbohidratos al uso de ácidos grasos. El músculo esquelético desempeña un papel central en la homeostasis de la temperatura; participando en la generación de calor mediante termogénesis con y sin temblores <sup>25</sup>.

La homeostasis energética está estrechamente relacionada con la función del tejido adiposo. En los animales, el tejido adiposo se compone principalmente de tejido adiposo marrón (BAT) y tejido adiposo blanco (WAT). Los adipocitos marrones se localizan en depósitos específicos y expresan niveles constitutivamente altos de genes que participan en la generación adaptativa de calor, conocida como termogénesis sin temblor (NST). Mientras que los adipocitos inducibles similares

a los marrones, también conocidos como células beige, se desarrollan en la grasa blanca en respuesta a diversos activadores. Las actividades de las células adiposas marrones y beige reducen las enfermedades metabólicas, incluida la obesidad, en ratones y se correlacionan con la delgadez en humanos<sup>26</sup>. Estudios iniciales encontraron al BAT en pequeñas cantidades en humanos adultos, lo que desestimuló la idea de usar este tejido como blanco para controlar el peso. Posteriormente se detectaron depósitos considerables de BAT en humanos adultos mediante imágenes de <sup>18</sup>F-glucosa<sup>27</sup>. Esto, unido al rol del tejido adiposo beige en la regulación del balance energético, ha impulsado el interés y los esfuerzos de la investigación en usar el aumento del gasto energético mediante termogénesis como estrategia terapéutica en la prevención y tratamiento de la obesidad.

El mecanismo de NST mejor establecido y corroborado por décadas de investigación se centra en el metabolismo mitocondrial, en el cual la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria se desacopla de la generación de ATP (respiración desacoplada) mediante la actividad de la proteína desacoplante 1 (UCP1) durante la respiración mitocondrial. La activación de esta vía depende de la proteína co-rreguladora de la transcripción PRDM16. En general, la activación de la termogénesis en la grasa marrón y beige, ya sea a través de vías dependientes o independientes de la UCP1, se asocia a una mejora de la tolerancia a la glucosa y la insulina, especialmente en el contexto de la obesidad alimentaria, que se sabe que provoca un deterioro de la función termogénica de la grasa, incluida la resistencia a la insulina en BAT<sup>28</sup>.

Existen otras vías termogénicas independientes de UCP1 que participan en la regulación de la homeostasis energética de todo el cuerpo. La base de la termogénesis independiente de UCP1 la proporcionan mecanismos metabólicos de ciclos fútiles mediante los cuales una reacción que consume ATP ocurre simultáneamente con una reacción energética inversa, produciendo la disipación de energía en forma de calor. Dado que los adipocitos beige poseen una alta capacidad de síntesis de ATP en comparación con los adipocitos marrones, los ratones carentes de UCP1 aclimatados gradualmente al frío (los cual aumenta el tejido adiposo beige) pueden mantener la termogénesis a través de estos ciclos fútiles<sup>29,30</sup>. Estas vías alternativas de termogénesis abarcan: 1- el ciclo de entrada y salida de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplasmático; 2- un ciclo de fosforilación/desfosforilación de la creatina en la mitocondria y 3- un ciclo de conversión entre triacilglicerol (TAG) y ácidos grasos. Un esquema que resume las vías dependientes e independientes de UCP1 se puede observar en la Figura 1<sup>28</sup>.

Adicionalmente, el desacoplamiento mitocondrial puede inducirse de forma independiente de UCP1, por ejemplo, a través de los transportadores de ADP/ATP (ANT1 y ANT2), que pueden mediar la afluencia de protones a la matriz mitocondrial por estimulación de N-acil aminoácidos<sup>28,31</sup>.

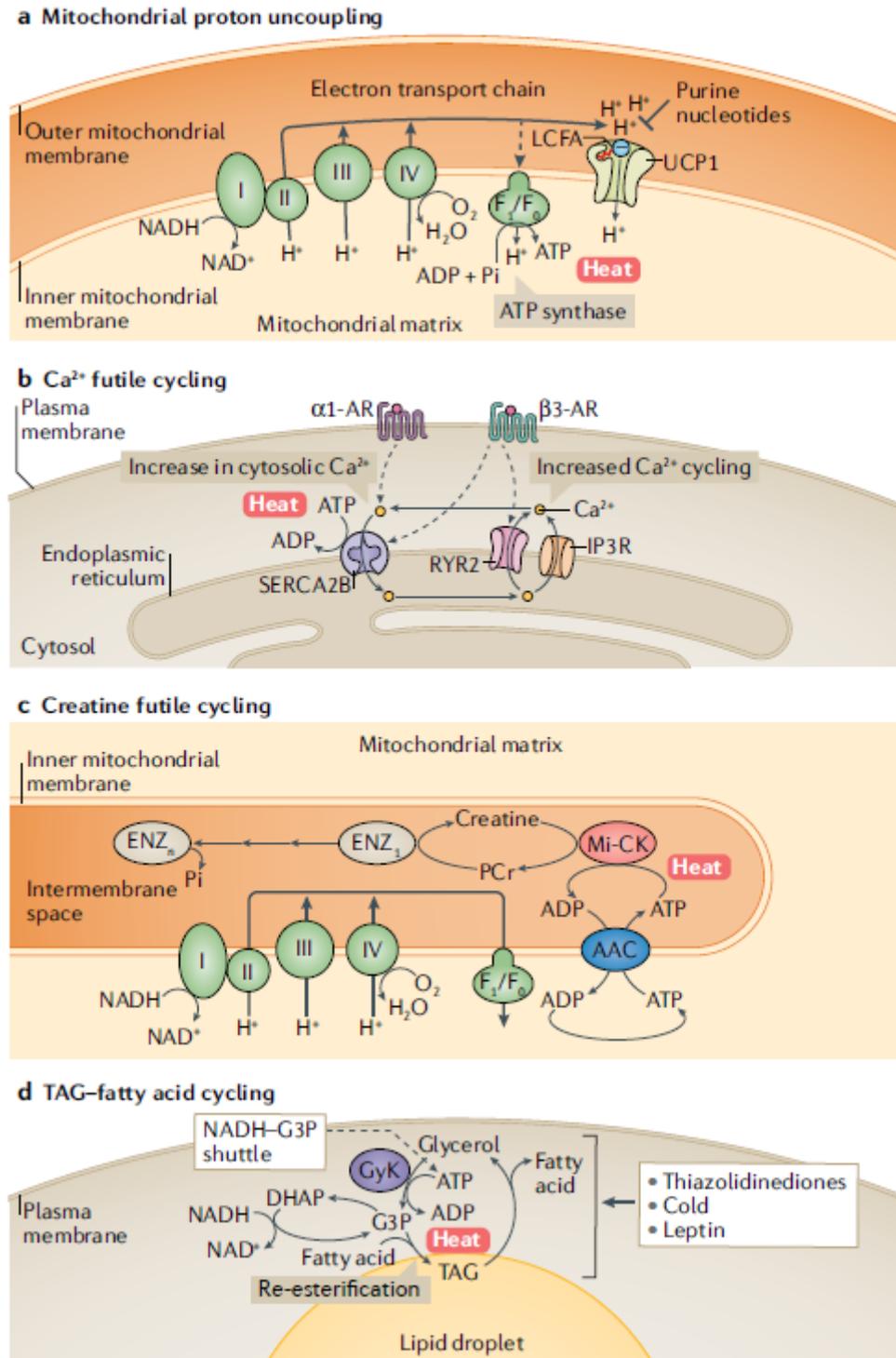


Figura 1. Mecanismos termogénicos en los adipocitos. a | Desacoplamiento de la respiración mitocondrial a través de UCP1. UCP1 se encuentra en la membrana interna mitocondrial y desacopla el gradiente de protones ( $H^+$ ) de la síntesis de ATP. La actividad de UCP1 es inhibida por nucleótidos de purina, mientras que los ácidos grasos libres de cadena larga (LCFAs; marcados con una cola roja), que son negativamente cargados en el extremo carboxilo, se unen a UCP1 y desencadenan la transferencia de  $H^+$  hacia la matriz como un importador de ácido graso anión/ $H^+$ . b | Uno de los

mecanismos de termogénesis independiente de UCP1 en los adipocitos beige es el ciclo fútil de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro y fuera del retículo endoplásmico. Esto implica la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplásmico mediante la ATPasa de calcio 2B del retículo sarcoplásmico/endoplásmico (SERCA2B) y su liberación por el receptor de rianodina 2 (RYR2) y el receptor de trifosfato de inositol (IP3R), lo que está acoplado a la hidrólisis de ATP por SERCA2B y la generación de calor. La activación de los receptores adrenérgicos  $\alpha 1$  ( $\alpha 1$ -AR) y  $\beta 3$  ( $\beta 3$ -AR), en respuesta a la norepinefrina, desencadena el flujo celular de  $\text{Ca}^{2+}$  y su ciclo fútil. Bajo ciertas condiciones, como niveles aumentados de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (por ejemplo, una liberación aumentada de  $\text{Ca}^{2+}$  de RYR2 o IP3R), abundancia de ATP (alta relación ATP/ADP) o afinidad reducida de SERCA2 a  $\text{Ca}^{2+}$  (a menudo regulada por micro péptidos), la hidrólisis de ATP por SERCA2 se desacopla de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo altamente exotérmica. c | Otro mecanismo termogénico independiente de UCP1 es el ciclo fútil de sustrato de creatina, que involucra la fosforilación dependiente de ATP de la creatina por la creatina quinasa mitocondrial localizada (Mi-CK) para formar fosfocreatina (PCr) y la desfosforilación de PCr por fosfatasas desconocidas (Enz1-n) \*. d | La lipólisis de triglicéridos (TAGs) genera glicerol y ácidos grasos, que pueden ser re-esterificados de nuevo a TAG (ciclo de TAG-ácido graso). Este proceso involucra la conversión dependiente de ATP de glicerol a glicerol 3-fosfato (G3P) por la glicerol quinasa (GyK). G3P es también un componente clave del transporte NADH-G3P, que involucra la interconversión de G3P y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y permite una síntesis rápida de ATP en las mitocondrias. Este ciclo es promovido por tiazolidinedionas, que activan GyK, así como por la exposición al frío y la hormona de saciedad leptina, que promueven la lipólisis. AAC, transportador ADP/ATP. Tomado de <sup>28</sup>. \*Recientemente la creatina quinasa tipo B (CKB) y la fosfatasa alcalina, isoenzima tisular inespecífica (TNAP/ALPL) han sido postuladas como los efectores del ciclo fútil de creatina <sup>32,33</sup>.

### 3.2.3. Tratamientos: disminución de la ingesta y aumento del gasto energético

En la actualidad la cirugía bariátrica (CB) sigue siendo la opción más efectiva para lograr una reducción significativa del peso corporal, fundamentalmente en individuos con obesidad mórbida que presentan complicaciones metabólicas como diabetes y que no responden a fármacos clásicos <sup>15,34,35</sup>. Entre los procedimientos más comúnmente utilizados se encuentran el baipás gástrico en Y de Roux (RYGB), la gastrectomía vertical en manga (VSG) y la banda gástrica ajustable. El continuo perfeccionamiento de las técnicas quirúrgicas y los avances en los procedimientos laparoscópicos en la última década han contribuido a disminuir las complicaciones asociadas a la cirugía, los períodos de hospitalización y a mejorar el proceso de recuperación <sup>16,36</sup>. Estudios de seguimiento a gran escala del procedimiento quirúrgico demuestran una pérdida de peso sostenida del 13%-27%, con un seguimiento de hasta 15 años <sup>37</sup>. Los procedimientos de bypass gastrointestinal más extensos (derivación biliopancreática con interruptor duodenal, BPD-DS y duodenoileostomía de anastomosis única con gastrectomía en manga, SADI-S) se asocian generalmente con una mayor pérdida de peso (pérdida del exceso de peso del 80%-90%) y mayores beneficios metabólicos, pero conllevan un riesgo mayor de complicaciones quirúrgicas y nutricionales. Tras la RYGB y la VSG, los pacientes suelen perder a largo plazo un 60%-70% y un 50%-60% de su exceso de peso, respectivamente <sup>38</sup>.

El término cirugía metabólica ha sustituido al de cirugía bariátrica dado que el abordaje quirúrgico no sólo se dirige al exceso de peso, sino también para tratar la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y las enfermedades metabólicas. Se ha demostrado que la cirugía metabólica consigue la remisión completa a largo plazo de la DMT2 y también puede prevenir el desarrollo de la misma <sup>38</sup>. La recomendación de cirugía metabólica comprende a pacientes con obesidad de clase III (BMI  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>) y en aquellos con obesidad de clase II (BMI 35.0-39.9 kg/m<sup>2</sup>) cuando la hiperglucemia no se controla adecuadamente con el estilo de vida y el tratamiento médico óptimo. También se considera la cirugía en pacientes con DMT2 y BMI de 30.0-34.9 kg/m<sup>2</sup> si la hiperglucemia no se controla adecuadamente a pesar de un tratamiento óptimo con medicación oral o inyectable. Además de mejorar la glucemia, la cirugía bariátrica/metabólica ha demostrado conferir otros beneficios para la salud en ensayos clínicos randomizados, como la reducción significativa de otros factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular en comparación con otras intervenciones médicas y de estilo de vida, así como mejoras en indicadores de calidad de vida. Adicionalmente se ha relacionado a mejoras en otros resultados críticos como las complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes, la enfermedad cardiovascular, el cáncer y la muerte, en estudios no aleatorizados <sup>39</sup>.

Los mecanismos que hacen que estas operaciones sean tan eficaces no se conocen completamente y su comprensión sigue siendo un objetivo importante en la investigación de la obesidad <sup>40</sup>. Existen crecientes elementos que apuntan al aumento de la señalización de GLP-1 como uno de los factores clave en la reducción de la ingesta de alimentos y la pérdida de peso corporal tras la RYGB en humanos, y en la mejora de la homeostasis de la glucosa tras la RYGB y la VSG en roedores y humanos <sup>16,40</sup>. Otro cúmulo de pruebas en modelos murinos vinculan los efectos metabólicos de la CB a vías de señalización como los ácidos biliares, la microbiota intestinal, la leptina, la melanocortina y la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina-2 (IGFBP2). Sin embargo, la explicación de los efectos beneficiosos de la CB parecería provenir de la contribución de múltiples vías de señalización más que de alguna de estas por sí sola y sugiere una compleja interacción del intestino con otros órganos en la regulación del peso corporal <sup>40</sup>.

Independientemente de la apreciable eficacia sostenida de la CB/metabólica, es un tratamiento quirúrgico muy invasivo, irreversible en la mayoría de los casos y no exento de riesgos <sup>16</sup>. Las tasas de complicaciones y mortalidad son bajas, aun así, existen posibles complicaciones

posquirúrgicas importantes como fugas y fístulas gastrointestinales, hemorragias, obstrucción intestinal, úlceras marginales, tromboembolismo venoso y complicaciones nutricionales. No obstante, el perfil de seguridad de la CB/metabólica ha demostrado ser aceptable y comparable al de otros procedimientos habituales de cirugía general <sup>38</sup>.

Las razones por las cuales la CB/metabólica no se aplica a la mayor parte de la población afectada son complejas. Incluyen limitaciones en el conocimientos o puntos de vista de los pacientes y de los médicos remitentes; sobrestimación de los beneficios de la atención habitual y de los riesgos de la cirugía; falta de comunicación entre pacientes y médicos, y de cobertura por parte de seguros médicos. En la mayoría de los países, la cirugía bariátrica sólo es accesible a una pequeña parte de los pacientes con obesidad extrema <sup>16,38</sup>. En todo caso, los métodos quirúrgicos resultan insuficientes como estrategia general para combatir las abrumadoras cifras mundiales de obesidad y sus comorbilidades. En este contexto, y sumado a que las intervenciones sobre el estilo de vida y el comportamiento ofrecen una eficacia moderada, la búsqueda de opciones farmacológicas con efectos comparables a la CB/metabólica constituye un objetivo primordial <sup>15,16</sup>.

### **3.2.4. Medicamentos contra la obesidad**

Los avances de las dos últimas décadas en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el control de la ingesta han impulsado el descubrimiento de medicamentos anti-obesidad (AOM) basado en el diseño racional. Esta nueva tendencia aporta una visión más auspiciosa a la historia poco exitosa que ha caracterizado el manejo farmacológico de la obesidad <sup>15,16</sup>. La mayoría de los fármacos evaluados para la disminución del peso corporal, cuando son utilizados como terapia única, son poco eficaces o seguros y la pérdida de peso no suele superar el 10% <sup>16</sup>. Por lo general se han asociado a efectos cardiovasculares adversos (sibutramina, fenfluramina, dexfenfluramina, píldoras arco iris), mayor riesgo de suicidio (rimonabant), mayor probabilidad de drogodependencia y abuso (metanfetamina) y aparición de taquifilaxia (fentermina, anfepramona, clorhidrato de catina) <sup>15</sup>.

Los medicamentos que se han investigado en obesidad incluyen agentes tan diversos como desacoplantes mitocondriales, simpaticomiméticos, agonistas serotoninérgicos, inhibidores de la lipasa, antagonistas de los receptores cannabinoides y más recientemente una creciente familia de

péptidos de origen gastrointestinal químicamente optimizados para uso farmacéutico. Por lo general los AOM funcionan por vías periféricas o centrales que rigen el equilibrio energético. Algunos de los mecanismos involucrados son el aumento de la saciedad, la reducción de la captación de grasa en el tracto gastrointestinal, el bloqueo de la recaptación de catecolaminas y el aumento del gasto energético induciendo la termogénesis o la lipólisis <sup>15,16,41</sup>. Mientras que varios de los candidatos farmacológicos para el tratamiento de la obesidad se comenzaron a estudiar con ese fin, como por ejemplo la leptina, la grelina, los desacoplantes mitocondriales y el factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF15), la investigación en el área de las incretinas transitó de centrarse en el tratamiento de la diabetes hacia la disminución del peso. Los miméticos de las incretinas presentan propiedades reductoras de la glucosa, junto con una reducción del apetito y de la ingesta de alimentos, lo que se traduce en una pérdida de peso <sup>42</sup>.

Las incretinas son hormonas secretadas por el intestino en respuesta a la ingestión de nutrientes y provocan la secreción de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas para reducir los niveles de glucosa en sangre posprandial. El efecto incretina está mediado en gran medida por las acciones neuroendocrinas de dos péptidos intestinales insulíntrópicos, GLP-1 y GIP, que se secretan a partir de las células enteroendocrinas “L” y “K”, respectivamente, del intestino después de la entrada de nutrientes al tracto gastrointestinal. Los efectos fisiológicos y farmacológicos mediados por GIP y GLP-1 se basan fundamentalmente en los potentes efectos que tienen estos ligandos y sus análogos sintéticos sobre los receptores asociados: receptor de GLP-1 (GLP-1R) y receptor de GIP (GIPR) <sup>15,16,42,43</sup>. La terapia basada en las incretinas con péptidos como exendin 4, liraglutida, semaglutida y el agonista dual GIP/GLP1 tirzepatida reduce el peso corporal en roedores y humanos. En general, con la excepción de semaglutida 2,4 mg, la pérdida media de peso corporal corregida con placebo que puede conseguirse mediante el tratamiento con un AOM registrado se sitúa en un intervalo relativamente estrecho del 3-7% tras 6-12 meses de tratamiento, con una fracción finita de sujetos que superan una pérdida de peso del 10% y muchos menos del 15% en relación con el placebo. Cabe destacar que semaglutida 2,4 mg y tirzepatida (10 ó 15 mg una vez a la semana) han registrado recientemente una pérdida media de peso superior al 10% en estudios clínicos de fase II y III realizados en sujetos sin diabetes. La pérdida de peso es considerablemente menor en los pacientes con DM2, lo que indica que la resistencia a la insulina y la hiperglucemia crónica se correlacionan con una menor eficacia de los agonistas del GLP1R <sup>15</sup>.

Los agonistas de los receptores de GLP-1 son una excepción a la modesta eficacia de las monoterapias de pérdida de peso disponibles actualmente (Figura 2). Particularmente, la semaglutida, como parte de una estrategia de tratamiento en combinación con la modificación del comportamiento puede lograr una pérdida de peso superior al 15% <sup>44</sup>. Sin embargo, la combinación de varias moléculas o incluso moléculas únicas con efectos combinados es la tendencia en el logro de una mayor pérdida de peso corporal total; por ejemplo, tirzepatida, un agonista dual de GIP/GLP-1, produjo una pérdida de peso de ~23% con la dosis más alta <sup>45</sup>. Los ensayos clínicos que involucran a los AOM actualmente disponibles, fundamentalmente los agonistas de GLP1R, han mostrado mejoras en varios parámetros metabólicos, incluida la esteatosis hepática y parámetros cardiovasculares; sin embargo, estudios de mayor magnitud, con mayor alcance poblacional y a más largo plazo aún son necesarios para consolidar las potencialidades y la seguridad de estas alternativas farmacológicas <sup>46</sup>.

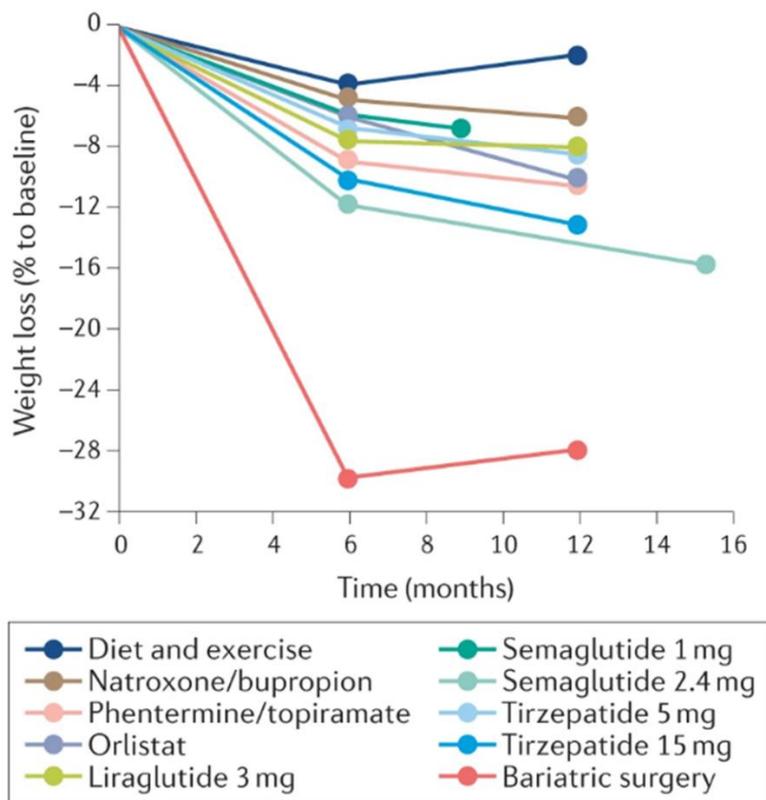


Figura 2. Pérdida de peso corporal conseguida mediante cambios en el estilo de vida, medicamentos contra la obesidad aprobados actualmente y cirugía bariátrica. Tomado de (Müller et al., 2021).

Uno de los principales desafíos en el control del peso es la incapacidad de predecir la respuesta del paciente a los medicamentos, con una amplia variabilidad en el cambio de peso de los individuos en respuesta a un medicamento determinado. La variabilidad genética, epigenética y ambiental, así como respuestas neuroendocrinas compensatorias, asociadas al desarrollo de la obesidad y a la defensa del peso corporal son cruciales en la respuesta individual ante diferentes fármacos (Müller et al., 2021). En ese sentido, la disponibilidad de nuevas alternativas farmacológicas, en forma de monoterapias o en sinergia con las nuevas generaciones de AOMs resulta de especial interés; sobre todo cuando la brecha con la cirugía bariátrica/metabólica en el control del peso sigue siendo significativa.

### 3.2.5. Nitroalquenos

#### 3.2.5.1. Nitroalquenos de ácidos grasos: formación, biodistribución y metabolismo.

Durante el proceso inflamatorio se producen distintos mediadores lipídicos oxidados/electrofílicos que presentan propiedades vasoactivas pro y antiinflamatorias que participan en la generación y resolución del foco inflamatorio vascular <sup>47,48</sup>. En los procesos inflamatorios se produce una oxidación lipídica acelerada, y los intermediarios formados podrían actuar como sustratos para la nitración lipídica reaccionando con el  $\cdot\text{NO}$  o sus derivados (nitrito, nitrato, trióxido de dinitrógeno y peroxinitrito) <sup>49-56</sup>. En medios levemente ácidos el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), o incluso a pH fisiológicos y a través de la formación de  $\text{N}_2\text{O}_3$ , media la nitración de ácidos grasos (FA) insaturados conjugados <sup>51</sup> y sus productos de oxidación <sup>52,57,58</sup>. Inicialmente, el ácido oleico (OA) y el ácido linoleico (LA) se consideraron objetivos de nitración lipídica *in vivo* <sup>59,60</sup>. Posteriormente, Bonacci et al. informaron que los rendimientos obtenidos en la nitración del ácido linoleico conjugado (CLA) eran  $>10^5$  veces superiores a los de los dienos no conjugados, y que el ácido linoleico nitroconjugado ( $\text{NO}_2\text{-CLA}$ ) era el nitroalqueno de ácido graso ( $\text{NO}_2\text{-FA}$ ) más abundante formado endógenamente <sup>51</sup>. Los  $\text{NO}_2\text{-FA}$  se forman en el compartimento gástrico <sup>51</sup>, en sitios de inflamación <sup>51,52,61</sup> y durante la isquemia/reperfusión <sup>62</sup>. La mayor parte de los  $\text{NO}_2\text{-FA}$  se absorbe a nivel de los enterocitos y se empaquetan en quilomicrones que llegan a la circulación sistémica a través del conducto linfático torácico y la vena subclavia izquierda. La administración oral de

ácido nitro-oléico (NO<sub>2</sub>-OA) a perros mostró niveles de esterificación mucho más elevados que los de la forma libre del ácido, apuntando a la esterificación de los NO<sub>2</sub>-FA como un mecanismo que podría limitar su inactivación hepática y favorecer así su distribución tisular al bloquear su reactividad. Sin embargo, a pesar de las similitudes en el metabolismo, estos niveles de esterificación fueron obtenidos en perros y aún no se han determinado en humanos<sup>63,64</sup>. Los NO<sub>2</sub>-FA no esterificados pueden estar presentes como consecuencia de la absorción a través del sistema portal y del transporte dependiente de albúmina<sup>63</sup>. La absorción a través del sistema linfático evita el metabolismo de primer paso en el hígado, disminuyendo el metabolismo mediado por las enzimas de fase I y II y, por lo tanto, incrementando la biodisponibilidad oral de estos compuestos<sup>63</sup>. En los capilares, la lipoproteína lipasa (LPL) elimina los NO<sub>2</sub>-FA de los quilomicrones con la participación de la proteína de unión a lipoproteínas de alta densidad anclada a glicosilfosfatidilinositol 1 (GPIHBP1) en el anclaje de la LPL a la luz endotelial<sup>65</sup>. Los NO<sub>2</sub>-FA también sufren fácilmente reacciones de adición reversibles con nucleófilos como sulfidrilos libres de proteínas y el glutatión, lo cual disminuye temporalmente su reactividad electrofílica y genera un reservorio circulante de estos nitrolípidos<sup>66,67</sup>.

Los nitroalquenos de ácidos grasos se metabolizan predominantemente a través de la saturación del doble enlace y reacciones de β-oxidación que terminan en el sitio de nitración de la cadena de acilo<sup>66</sup>. Los metabolitos incluyen metabolitos de cadena más corta (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>n</sub> generados por β-oxidación mitocondrial, que son reducidos por la prostaglandina reductasa 1 a nitroalcanos reactivos no electrofílicos o esterificados para formar lípidos complejos<sup>68</sup>. Los metabolitos hidrófilos de los NO<sub>2</sub>-FA, incluidos los derivados del ácido dicarboxílico, los productos de β-oxidación, los ácidos mercaptúricos y los aductos de cisteína, se filtran en los riñones y se eliminan en la orina<sup>69,70</sup>.

La formación, biodistribución y metabolismo de los NO<sub>2</sub>-OA es compleja e involucra a varios órganos siendo el corazón, los riñones, el músculo, el hígado, y el tejido adiposo algunos de los principales involucrados<sup>64</sup>. En la Figura 3 se muestra un esquema que resume las características de estos procesos, basado fundamentalmente en la información obtenida a partir del NO<sub>2</sub>-CLA.

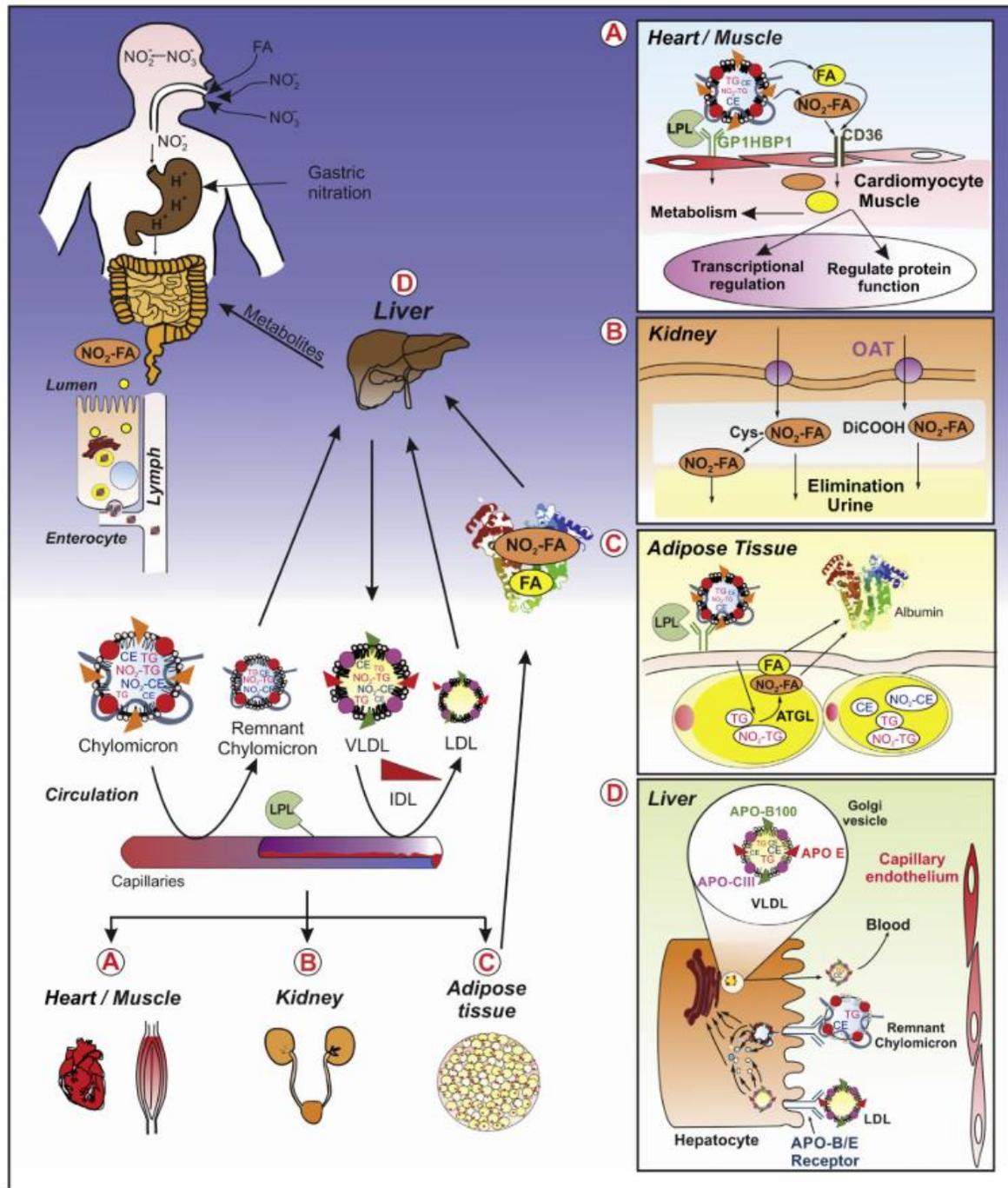


Figura 3. Formación y biodistribución de los NO<sub>2</sub>-FA. La formación de NO<sub>2</sub>-CLA se promueve bajo las condiciones ácidas que se encuentran en el estómago a través de la reacción de radicales derivados del nitrito dietético y CLA (generalmente encontrado esterificado en triglicéridos). Con fines terapéuticos, los NO<sub>2</sub>-FA también pueden administrarse por vía oral como medicamento, como es el caso de CXA-10 (Complexa Inc.). A través de la actividad de lipasas, los triglicéridos son hidrolizados y los NO<sub>2</sub>-FA se liberan y son absorbidos junto con otros FA por los enterocitos, empaquetados en quilomicrones como triglicéridos y transportados hacia la circulación a través del sistema linfático. (A) Una vez que los quilomicrones llegan a los capilares, los NO<sub>2</sub>-FA se separan de los triglicéridos

por la actividad de las lipoproteínas lipasas en un proceso que requiere la presencia de la proteína de acoplamiento GPIHBP1. Los NO<sub>2</sub>-FA liberados pueden unirse a transportadores de ácidos grasos (por ejemplo, CD36) o difundir en las células endoteliales y llegar a las células parenquimales, como los miocitos cardíacos. El corazón, los riñones, los músculos, el hígado y el tejido adiposo están entre los principales objetivos. Una vez que los NO<sub>2</sub>-FA llegan a las células objetivo, participan en vías de señalización a través de modificaciones post-traduccionales de proteínas, son metabolizados y luego inactivados enzimáticamente. (B) Los metabolitos hidrofílicos de los NO<sub>2</sub>-FA, incluyendo derivados de ácidos dicarboxílicos, productos de β-oxidación, ácidos mercaptúricos y aductos de cisteína, son filtrados en el riñón y eliminados en la orina. (C) Los NO<sub>2</sub>-FA que llegan al tejido adiposo se vuelven a esterificar en triglicéridos para su almacenamiento. Los productos de degradación formados durante el metabolismo tisular y los NO<sub>2</sub>-FA liberados de los adipocitos a través de la actividad de ATGL alcanzan la circulación donde se unen a la albúmina y son transportados y entregados al hígado para su excreción o filtrados en la orina por los riñones. (D) Alternativamente, los NO<sub>2</sub>-FA que llegan al hígado pueden ser reincorporados en triglicéridos, ensamblados en el retículo endoplásmico y los compartimentos de Golgi en partículas VLDL, y las partículas VLDL maduras que contienen Apo B, E, y CIII son liberadas a la circulación y distribuidas sistémicamente a los tejidos objetivo. Esto inicia un nuevo ciclo de entrega, señalización, inactivación, metabolismo y eliminación. Finalmente, el hígado elimina las partículas LDL restantes y los quilomicrones remanentes a través de la captación selectiva y descomposición. Abreviaciones: Apo, apolipoproteína; ATGL, lipasa de triglicéridos adiposos; GPIHBP1, proteína de unión a lipoproteínas de alta densidad anclada a glicosilfosfatidilinositol 1; IDL, lipoproteína de densidad intermedia; LDL, lipoproteína de baja densidad; LPL, lipoproteína lipasa; NO<sub>2</sub>-CLA, ácido linoleico nitroconjugado; NO<sub>2</sub>-FA, nitroalqueno de ácido graso; OAT, transportador de aniones orgánicos; TG, triglicérido; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad. Tomado de <sup>64</sup>.

### 3.2.5.2. Nitroalquenos de ácidos grasos: mecanismos de acción y efectos terapéuticos.

Los nitroalquenos son nitroderivados de alqueno ( $R_1HC=C(NO_2)R_2$ ) que por definición son compuestos electrofílicos. El grupo nitro es un centro atrayente de electrones que genera un déficit electrónico del carbono beta del doble enlace, confiriéndole la capacidad de formar aductos covalentes con nucleófilos mediante una reacción de adición de Michael (Figura 4). Estas especies nucleofílicas son grupos tioles o aminas presentes en residuos de cisteína o histidina <sup>71</sup>.

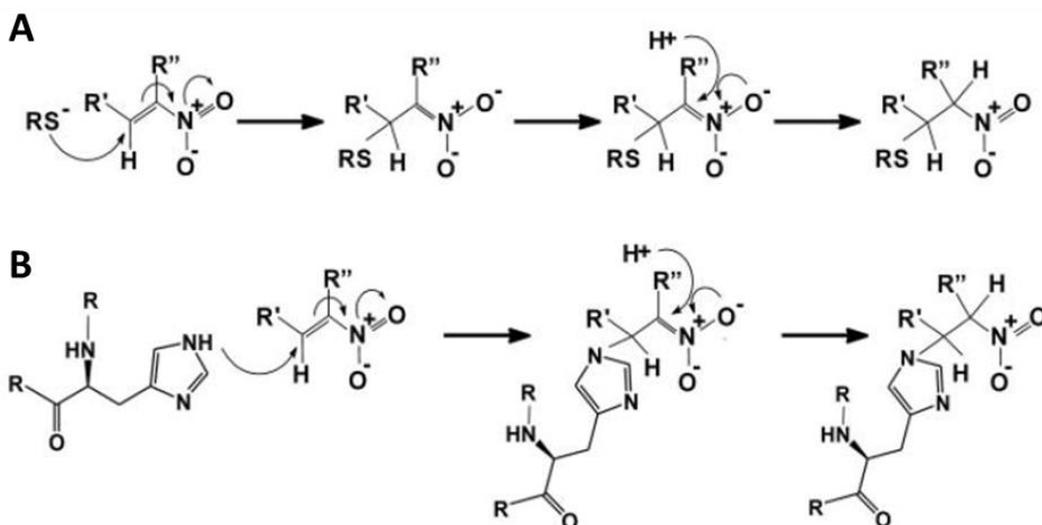


Figura 4. Reacción de adición Michael de derivados nitroalquenos con tioles (A) y grupos amino (B). Tomado de (Batthyany et al., 2006).

Debido a su reactividad electrofílica, los NO<sub>2</sub>-FA son capaces de ejercer respuestas de señalización celular a través de la modificación post-traducciona reversible de proteínas por la reacción de adición de Michael, fundamentalmente en residuos de cisteína <sup>71</sup>, y en particular porque median la modificación de factores de transcripción <sup>72</sup>.

Los receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPARs) son receptores nucleares de factores de transcripción inducibles por ligandos que controlan la expresión de redes de genes implicados en la adipogénesis, el metabolismo de los lípidos, la inflamación y el mantenimiento de la homeostasis metabólica <sup>72,73</sup>. Aunque se les conoce como receptores de grasas dietéticas comunes, como los ácidos oleico, linoleico y linolénico, los PPAR también se unen y responden a diversos metabolitos lipídicos, incluida la prostaglandina J<sub>2</sub>, el ácido 8S-hidroxicosatotetraenoico y una colección de fosfolípidos oxidados. La unión del ligando induce un cambio conformacional en el receptor que permite el reclutamiento diferencial de cofactores y la posterior modulación de la actividad de PPAR. PPAR $\gamma$ , uno de los tres PPAR que existen en mamíferos (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ ), se expresa principalmente en el tejido adiposo blanco (WAT) y marrón (BAT), donde es un regulador metabólico clave <sup>73</sup>. Los nitroalquenos son ligandos de PPAR $\gamma$  y han mostrado interactuar con varios de sus residuos (Arg<sub>288</sub>, Glu<sub>343</sub> y alquilación de Cys<sub>285</sub>) <sup>72</sup>. A través de la activación de este receptor los nitroalquenos estimulan la expresión de CD36 <sup>74</sup>, un receptor

polifacético involucrado en procesos como la angiogénesis, la respuesta inflamatoria y el metabolismo de ácidos grasos <sup>75</sup>. El NO<sub>2</sub>-OA también regula al alza genes como los que codifican para Glut4, CBP-1 y PGC-1 $\alpha$ , los cuales aumentan la sensibilidad a la insulina y reducen la acumulación de grasa y las citocinas proinflamatorias <sup>72</sup>.

El factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) desempeña un rol crucial en el control de la supervivencia celular, la proliferación, los procesos inflamatorios y la respuesta inmunitaria. Mediante la dimerización de dos de sus subunidades (p50, p65, p52, RelB o c-Rel) NF- $\kappa$ B se une al ADN y activa la transcripción génica de sus genes blanco. Sin embargo, el NF- $\kappa$ B es secuestrado en el citoplasma por las proteínas inhibitoras de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), que enmascaran la secuencia de localización nuclear de las subunidades. Ante señales estimulantes, las I $\kappa$ B quinasas (IKKs) fosforilan I $\kappa$ B, dirigiéndolo a la ubiquitinación y degradación proteasomal y permitiendo que NF- $\kappa$ B se transloque al núcleo para activar la transcripción. El bloqueo de esta vía disminuye las respuestas proinflamatorias <sup>72</sup>. Los nitroalquenos reducen la activación de NF- $\kappa$ B mediante la alquilación de la subunidad p65 (Figura 5), de esta forma impiden su unión al ADN y consecuentemente inhiben la transcripción de los genes proinflamatorios asociados como IL-6, TNF $\alpha$  y MCP-1 y molécula de adhesión celular vascular (VCAM)-1 <sup>76</sup>. El NO<sub>2</sub>-OA también inhibe el reclutamiento del receptor tipo Toll 4 (TLR4) y del factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) a los compartimentos de las balsas lipídicas de membrana. Como consecuencia, la activación vascular de la quinasa IKK $\beta$  (responsable de la liberación de NF- $\kappa$ B de I $\kappa$ B) se ve afectada, produciendo la inactivación de la cascada proinflamatoria NF- $\kappa$ B en las células vasculares <sup>77</sup>.

El factor nuclear tipo (derivado de eritroides 2) 2 (Nrf2) es una proteína de respuesta al estrés oxidativo e inductor de enzimas de fase II a través del elemento de respuesta antioxidante (ARE). Los genes regulados por Nrf2 son fundamentales para proteger contra el estrés oxidativo, al expresar genes que limitan la lesión celular inducida por la inflamación y las especies reactivas de oxígeno <sup>78</sup>. Este factor de transcripción regula la expresión de una centena de genes, entre ellos, los que codifican la hemo oxigenasa 1 (HO-1), NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1 (NQO1),  $\gamma$ -glutamylcisteína sintasa, GSH peroxidasa y superóxido dismutasa de cobre/zinc. En condiciones normales Nrf2 está unido en el citoplasma a la proteína asociada a ECH tipo Kelch 1 (Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1), el cual media su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma. En cambio, el desensamblaje de Keap1 de Nrf2 permite la translocación nuclear,

promoviendo la activación transcripcional y la posterior expresión de genes de fase II <sup>72</sup>. Los derivados de NO<sub>2</sub>-FA activan la transcripción génica dependiente de Nrf2 alquilando dos residuos de cisteína funcionalmente significativos (Cys-273 y Cys-288) de Keap1. Esto inhibe la degradación de Nrf2 dependiente de Keap1 y da como resultado la translocación nuclear de la proteína Nrf2 sintetizada de novo, la unión a ARE y la transactivación de la señalización genética

78.

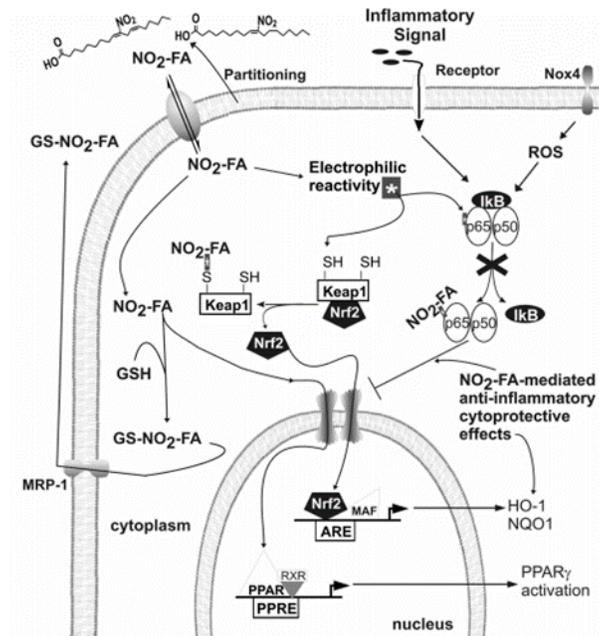


Figura 5. Efectos antiinflamatorios y citoprotectores de los nitroalquenos de ácidos grasos (NO<sub>2</sub>-FA). El electrófilo NO<sub>2</sub>-FA se une a residuos nucleofílicos críticos en p65 y Keap-1, resultando en la inhibición de la señalización dependiente de NF-κB y la activación citoprotectora dependiente de Nrf2, respectivamente. La disociación del complejo Keap1/Nrf2 por electrófilos conlleva a la translocación de Nrf2 al núcleo formando complejos heterodiméricos con los factores de transcripción MAFs en el elemento de respuesta antioxidante (ARE). Los NO<sub>2</sub>-FA se unen a PPAR $\gamma$  y transactiva parcialmente los genes dependientes de este receptor. En el citoplasma se forman aductos electrófilo-GSH que pueden ser transportados hacia el exterior de la célula a través de las proteínas de resistencia a múltiples drogas (MRP-1). Tomado de <sup>47</sup>.

Además de las vías de PPAR $\gamma$ , Nrf2 y NF-κB, los nitroalquenos son capaces de regular la respuesta al choque térmico (HSR, del inglés: “heat shock response”) <sup>79</sup>, que es una respuesta ordenada a distintos tipos de estrés. Este mecanismo está regulado por los factores de choque térmico (HSF, del inglés: “heat shock factors”) dentro de los cuales HSF-1 desempeña un papel fundamental en la activación de genes asociados con la reorganización de proteínas desnaturalizadas; la protección de las que conservan su estructura nativa y la señalización para la degradación de las proteínas

desnaturalizadas irreversiblemente<sup>80</sup>. Los ácidos grasos nitrados pueden contribuir a la activación de esta respuesta mediante la liberación de HSF-1 de proteínas inhibitorias como HSP 70. Como resultado de su activación los HSF experimentan un procesamiento en varias etapas que incluyen modificaciones postraduccionales, enriquecimiento nuclear, trimerización y unión a los elementos de choque térmico (HSE, del inglés: “heat shock elements”) en los genes de diana<sup>79</sup> (Figura 6). El NO<sub>2</sub>-OA mostró ser un potente inductor de la HSR, añadiendo una nueva dimensión a los mecanismos de señalización antiinflamatorios pleiotrópicos manifestados por los nitroalquenos de ácidos grasos.

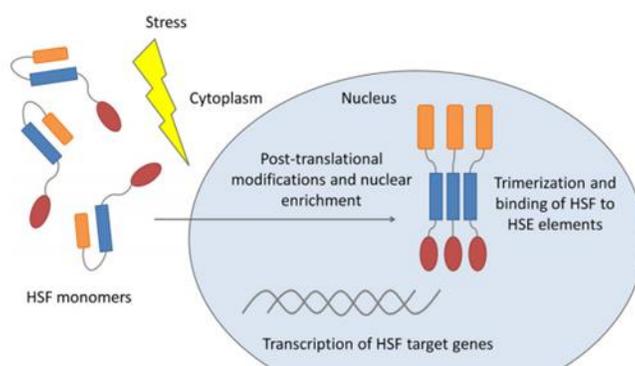


Figura 6. Etapas de procesamiento post-activación de HSF. Tomado de Kansanen et al., J Biol Chem, 2009.

Otro mecanismo de acción de los NO<sub>2</sub>-FA involucra a los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT). Esta familia de proteínas participa en la regulación de la supervivencia, la diferenciación y la proliferación celular<sup>72</sup>. Un grupo de citoquinas y factores de crecimiento funcionan como ligandos de receptores en el sistema Janus quinasas (JAK)/STAT. La unión de los ligandos conduce a la dimerización de los receptores y al reclutamiento y activación de las quinasas citoplasmáticas JAK. Esto provoca la fosforilación en tirosina de los receptores y el acoplamiento y fosforilación de las STAT, que se disocian del receptor para formar homodímeros o heterodímeros. Los dímeros de STAT entran en el núcleo, se unen al ADN y regulan la transcripción de genes<sup>81</sup> como por ejemplo los estimulados por IFN $\gamma$ <sup>82</sup>. En una línea celular de macrófagos murinos, el NO<sub>2</sub>-LA y el NO<sub>2</sub>-OA inhibieron la fosforilación de STAT1 inducida por lipopolisacárido (LPS), mediante el aumento de la MAPK fosfatasa 1 (MKP-1), resultando en la disminución de la expresión de genes diana de STAT1 como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)<sup>83</sup>.

Los mecanismos de acción conocidos de los nitroalquenos abarcan un grupo de enzimas y canales iónicos que resaltan sus acciones pleiotrópicas<sup>72</sup>. Son capaces de disminuir la generación de  $\cdot\text{NO}$  inflamatorio a través de la supresión de iNOS en macrófagos<sup>84</sup> y también de estimular la expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) que tiene efectos beneficiosos en la inflamación vascular y la tensión arterial<sup>85</sup>. Los  $\text{NO}_2\text{-FA}$  además limitan la expresión y función de las metaloproteinasas de matriz (MMP), colaborando con la resolución de procesos inflamatorios, fundamentalmente a nivel de las lesiones ateroscleróticas<sup>86</sup>. Contrario a la forma en que comúnmente los  $\text{NO}_2\text{-FA}$  modifican a las proteínas, el  $\text{NO}_2\text{-OA}$  mostró modificar irreversiblemente a la xantina oxidorreductasa (XOR) y lo hizo de forma específica con respecto a otros lípidos electrofílicos. La xantina oxidorreductasa (XOR) genera oxidantes proinflamatorios y especies nitrantes secundarias. Tanto en modelos animales como en estudios clínicos, la inhibición de XOR ha demostrado ser beneficiosa en una variedad de procesos inflamatorios vasculares<sup>87</sup>. El  $\text{NO}_2\text{-OA}$  también activa los canales de potencial receptor transitorio (TRP), que son canales iónicos neurológicos implicados en el dolor neurogénico, la inflamación y la hiperreactividad. Mediante una estimulación bifásica, inicialmente conduce a la afluencia de calcio, la despolarización y la activación, mientras que la respuesta secundaria a concentraciones más altas del nitrolípido puede promover la desensibilización de los canales TRP, aliviando así los acontecimientos proinflamatorios y fisiopatológicos<sup>72</sup>.

La regulación de otras dianas subcelulares de los  $\text{NO}_2\text{-FA}$  como la epóxido hidrolasa soluble (sEH)<sup>88</sup>, el receptor de angiotensina II (Ang II) tipo 1 (receptor AT1)<sup>89</sup>, Rad51<sup>90</sup> y el estimulador de los genes del interferón (STING)<sup>64,91-93</sup>, ha adquirido relevancia en determinadas condiciones fisiopatológicas como el control de la tensión arterial, el cáncer y los trastornos metabólicos relacionados con la obesidad.

Debido a sus efectos pleiotrópicos, fundamentalmente antiinflamatorios, los nitroalquenos han sido evaluados como fármacos en disímiles modelos animales de enfermedades inflamatorias, metabólicas y relacionadas con el estrés oxidativo. Han mostrado inhibir la hiperplasia neointimal inducida por lesión arterial<sup>94</sup>; inhibir la hipertensión arterial inducida por Ang II<sup>88,89</sup>; proteger del daño por isquemia/reperfusión cardíaca<sup>62</sup> y renal<sup>95</sup> y por sepsis inducida por endotoxinas<sup>96</sup> y reducir la aterosclerosis en ratones apo E<sup>-/-</sup><sup>97</sup>. En un modelo animal de nefropatía diabética, el tratamiento combinado de losartán (bloqueador del receptor AT1) y el  $\text{NO}_2\text{-OA}$  produjo una

reducción notoria de la albuminuria, restituyó la estructura de la barrera de filtración glomerular, atenuó la glomeruloesclerosis y mostró una disminución considerable del estrés oxidativo renal y la inflamación<sup>98</sup>. El efecto renoprotector de estos compuestos también se evidenció en un modelo murino de enfermedad renal crónica (CKD) de baja renina y alta sal con acetato de deoxicorticosterona (DOCA)<sup>99</sup>. El NO<sub>2</sub>-OA suprimió notablemente la susceptibilidad a las arritmias ventriculares, a través de la estabilización de la homeostasis miocelular de Ca<sup>2+</sup> en un modelo murino de isquemia miocárdica aguda (AMI)<sup>100</sup>. El NO<sub>2</sub>-OA además atenuó la fibrosis miocárdica intersticial y mejoró sustancialmente la función sistólica del ventrículo izquierdo en un modelo de miocardiopatía dilatada (DCM), probablemente mediado por la interferencia con la señalización de TGFβ<sup>101</sup>. Otros estudios también mostraron efectos beneficiosos en modelos de aneurisma de aorta<sup>102,103</sup>. En modelos de enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), el NO<sub>2</sub>-OA redujo significativamente los marcadores circulantes de lesión hepática, esteatosis hepática, inflamación lobular y fibrosis. Dichos efectos fueron atribuidos a la regulación de la adipogénesis y la prevención de la biosíntesis y acumulación de triglicéridos (TG) en el hígado mediante la inhibición de la maduración de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1 (SREBP-1)<sup>104</sup>. La suplementación con aceite de oliva virgen extra (EVOO) en los ratones tratados con dieta rica en grasas (HFD) recuperó los niveles circulantes de NO<sub>2</sub>-FA, disminuidos con respecto a la dieta normal. Este aumento produjo mejora de la función mitocondrial en NAFLD, superada después de la suplementación con nitrito<sup>105</sup>. También en un modelo resistencia a la insulina y NAFLD inducido por HFD el tratamiento con NO<sub>2</sub>-OA previno el daño hepático, mejoró la tolerancia a la glucosa y la función mitocondrial. Estos efectos fueron compartidos con la tiazolidinediona (TZD) rosiglitazona, mientras que sólo el NO<sub>2</sub>-OA disminuyó la acumulación de TG hepáticos; sin el aumento de peso y masa grasa inducido por la rosiglitazona<sup>106</sup>. Estos resultados son especialmente interesantes en la búsqueda de activadores de PPAR-γ para el tratamiento de enfermedades asociadas a la obesidad, como NAFLD y DMT2, sin los efectos adversos de las TZD<sup>107</sup>. La administración de NO<sub>2</sub>-OA mejoró la tolerancia a la glucosa y atenuó significativamente el estrés oxidativo inducido por HFD, así como los niveles de citocinas pulmonares proinflamatorias<sup>108</sup>. El regioisómero del NO<sub>2</sub>-OA, ácido 10-nitro-9(E)-octadec-9-enoico (CXA-10), incluso ha sido probado en ensayos clínicos para el tratamiento de la inflamación. El CXA-10 resultó ser seguro y bien tolerado en sujetos sanos y obesos y logró reducir los niveles de inflamación y disfunción metabólica, incluyendo leptina, TG, colesterol,

MCP-1 e IL-6 en sujetos obesos<sup>109</sup>. Estos resultados han derivado en la evaluación de este fármaco en ensayos clínicos de fase II dirigidos a la hipertensión pulmonar<sup>110</sup> y a la esclerosis glomerular segmentaria focal primaria<sup>111</sup>.

Sin embargo, el estudio del metabolismo de los nitroalquenos de ácidos grasos ha demostrado que estos compuestos sufren una rápida y sustancial modificación metabólica (saturación,  $\beta$ -oxidación, conjugación y eliminación). Estas reacciones afectan su reactividad y farmacocinética, condicionando sus acciones biológicas<sup>66</sup>

### 3.2.5.3. Nueva generación de nitroalquenos de síntesis.

Recientemente nuestro equipo de investigación desarrolló una nueva estrategia farmacológica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación, mejorando las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los nitroalquenos de los ácidos grasos. Para ello fue diseñada una generación de nitroalquenos derivados del  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH) y de su análogo hidrosoluble, Trolox<sup>TM</sup> (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)<sup>112-115</sup>. El derivado nitroalqueno del  $\alpha$ -tocoferol (NATOH) fue diseñado para ser distribuido por las lipoproteínas, alcanzando la vasculatura y consecuentemente la placa de ateroma, lesión característica de la aterosclerosis. Ensayos *in vitro* mostraron que el NATOH es un potente electrófilo que reacciona con nucleófilos como  $\beta$ -mercaptoetanol y glutatión<sup>113,114</sup> y que efectivamente se incorpora a las lipoproteínas. El NATOH además disminuyó significativamente la formación de placa de ateroma y la expresión de ICAM-1, VCAM-1, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mientras que activó eficazmente la vía Nrf2-Keap1<sup>113</sup>.

Los nitroalquenos derivados de Trolox<sup>TM</sup> (NATxME y NATx0) se concibieron buscando variar las propiedades fisicoquímicas y de absorción, distribución, metabolización y excreción, basándose en sus diferencias de solubilidad y posición del grupo nitroalquenilo. El NATxMe presentó propiedades antiinflamatorias tales como la inhibición de la secreción de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1) controladas por el factor NF- $\kappa$ B en macrófagos murinos; la inducción de la expresión de enzimas de fase 2 dependientes del sistema Nrf2/Keap-1: hemoxigenasa-1 (HO-1), subunidad modificadora de la glutamato-cisteína ligasa (GCLM) y la

NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1 (NQO-1) e inhibición *in vivo* del reclutamiento de neutrófilos en un modelo de daño tisular en pez cebra <sup>114</sup>. Por otra parte, el derivado de Trolox<sup>TM</sup> sin la cola isoprenoide, (NATx0) inhibió la inflamación tanto *in vitro* como *in vivo*, afectando específicamente a la producción de citocinas dependientes de NF-kB y NLRP3. Mecánicamente, se observó que inhibe la translocación nuclear de p65/ReLA y la secreción de IL-1 $\beta$  dependiente de NLRP3 al interferir con la oligomerización de la proteína ASC y consecuentemente con la formación del complejo inflamasoma. Interesantemente, el tratamiento de ratones obesos (DIO) con NATx0 disminuyó la activación del inflamasoma en el tejido, mejorando la intolerancia a la glucosa <sup>112</sup>.

Nuestro grupo ha mostrado que la relocalización del grupo nitroalqueno permite conferir nuevas potencialidades a compuestos con propiedades beneficiosas conocidas, que van más allá de las explicables por el nitrolaqueno o el sillar estructural de forma independiente. En línea con esta experiencia, también fue diseñado un nitroalqueno derivado del ácido benzoico, (E)-4-(2-nitrovinyl)benzoic acid (BANA), capaz de reducir la neuroinflamación y enlentecer la progresión de la enfermedad en un modelo de rata transgénica SOD1<sup>G93A</sup> de esclerosis lateral amiotrófica (ALS). El hecho de que el fármaco haya generado tales resultados al ser administrado tras el inicio de la parálisis, resalta su potencial como alternativa terapéutica para la ELA <sup>116</sup>.

### **3.2.6. Salicilato: seguridad y efectos metabólicos.**

El salicilato es una hormona de origen vegetal <sup>117</sup> que se utiliza con fines medicinales desde la antigüedad. Como medicamento se usa mayormente su forma acetilada (acetil salicilato o aspirina), que se descompone rápidamente en salicilato *in vivo* <sup>118</sup>. El salsalato, un profármaco dimérico compuesto por dos fracciones esterificadas de salicilato, presenta ventajas frente al salicilato sódico. Su insolubilidad en el pH ácido del estómago permite que se suspenda sin disolverse y pase al intestino delgado, evitando así el contacto directo con la mucosa gástrica. Por distintos mecanismos, tanto las formas no acetiladas (por ejemplo, salicilato de sodio, salsalato y trisalicilato) y acetiladas (aspirina) del salicilato se utilizan ampliamente para tratar distintos tipos de dolor, fiebre y síntomas de la inflamación. De hecho, la aspirina se encuentra entre los medicamentos considerados esenciales por la Organización Mundial de la Salud <sup>17,119,120</sup>.

Incluso a dosis bajas, la aspirina inhibe eficazmente las enzimas ciclooxigenasas, Cox 1 y Cox 2, mediante la transacetilación covalente de los residuos de serina del sitio activo; esto inactiva irreversiblemente las enzimas e impide la catálisis del paso comprometido en la síntesis de prostaglandinas. Al carecer de un grupo acetilo, los salicilatos no acetilados no modifican las enzimas ciclooxigenasas. A concentraciones significativamente superiores a las necesarias para la inhibición de la Cox, tanto los salicilatos no acetilados como la aspirina inhiben el eje proinflamatorio IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B<sup>121,122</sup>. Dosis altas de salsalato son capaces de reducir los niveles de glucosa y lípidos y mejora la sensibilidad a la insulina en pacientes con diabetes<sup>17</sup>. De hecho, el salsalato fue extensamente evaluado en ensayos clínicos en personas obesas con o sin diabetes de tipo 2, en los que se ha mostrado una reducción de la glucosa y los triglicéridos circulantes<sup>17,123,124</sup>. Se ha demostrado que el salicilato reduce la glucemia a través de una serie de mecanismos potencialmente interrelacionados, como la represión de un inhibidor de la subunidad  $\beta$  de la quinasa del factor nuclear  $\kappa$ -B (IKK- $\beta$ )<sup>122,125-127</sup>, el desacoplamiento mitocondrial<sup>128</sup> y la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)<sup>118</sup>. La AMPK suprime la inflamación mediada por macrófagos<sup>129</sup>, así como la síntesis de ácidos grasos y colesterol en el hígado a través de la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la HMG-CoA reductasa (HMGCR), respectivamente<sup>130</sup>. El salicilato se une directamente y activa a los heterotrímeros que contienen AMPK $\beta$ 1<sup>118</sup>. Varios estudios muestran que el salicilato mejora la disfunción metabólica en ratones obesos, incluidos efectos modestos en el aumento de peso<sup>128,131-133</sup>. Ensayos clínicos para tratar la diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares revelaron una mejoría en los niveles de glucemia basal, hemoglobina glicosilada y la proteína C reactiva asociada al tratamiento con salicilato; sin embargo, los resultados beneficiosos del tratamiento resultaron ser menores tomando en consideración que las dosis del fármaco fueron muy altas, alcanzando los 4 g/día<sup>123,134,135</sup>. No obstante, teniendo en cuenta sus efectos antiinflamatorios y de regulación del metabolismo, así como su historial como fármaco seguro, y siguiendo el diseño racional de nuevos nitroalquenos, nuestro grupo sintetizó el derivado nitroalqueno del salicilato, ácido 5-(2-nitroetil)salicílico (SANA) buscando potenciar sus efectos metabólicos.

### **3.2.7. Proteómica basada en espectrometría de masa aplicada al descubrimiento de mecanismos de acción fármacos**

El desarrollo de fármacos conlleva un proceso engorroso e implica un alto riesgo, con menos del 10% de éxito de aprobación en los compuestos sometidos a ensayos clínicos<sup>136</sup>. La aprobación de un fármaco por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA) requiere que este sea seguro y que se demuestre cierta eficacia; pero no la comprensión de su mecanismo de acción (MoA)<sup>136,137</sup>. Esto puede resultar en la llegada de fármacos a los ensayos clínicos sin dicho conocimiento y en una posible causa de fracaso. Una forma de aliviar esas dificultades se basa en comprender los mecanismos moleculares que justifican los efectos del fármaco. Conocer cómo funciona permite una mejor dosificación del fármaco mediante el seguimiento de sus efectos en la vía diana en el paciente y una mejor evaluación de los posibles efectos adversos. Al mismo tiempo que puede ayudar a estratificar los ensayos clínicos para centrarlos en aquellos pacientes con mayor probabilidad de responder<sup>136</sup>. No obstante, la necesidad de revelar la diana molecular específica y el mecanismo de acción de un nuevo fármaco o en qué momento del proceso de descubrimiento de fármacos debe obtenerse dicha información, es fuente actual de debate. Un argumento es que el MoA debe perseguirse desde el principio para ayudar a descubrir una nueva biología, incluso si los esfuerzos de descubrimiento de fármacos terminan fracasando y de esta forma permitir rentabilizar la inversión en conocimiento realizada por los organismos financiadores. Otra perspectiva es que la investigación se aleja del objetivo central de encontrar un medicamento eficaz, incluyendo el alto consumo de recursos que implica la identificación de blancos moleculares y el MoA de fármacos. Una visión intermedia se basa en que tal conocimiento debería obtenerse al principio del proceso de descubrimiento del fármaco cuando la condición médica a tratar cuenta con un tratamiento estándar. Mientras que, en el caso de las indicaciones con una necesidad no satisfecha, dichos esfuerzos deben producirse en un momento posterior a la demostración de la eficacia en un modelo animal, debido a la gran demanda de recursos que puede suponer<sup>137</sup>.

Aunque para algunos casos los términos blanco y MoA se usan como sinónimos, de manera más generalizada el blanco describe la diana molecular específica (proteína, molécula de ARN, etc.) con la que interactúa un fármaco para iniciar una respuesta biológica. El MoA describe la acción del fármaco a un nivel superior de complejidad biológica, como sistemas de señalización celular

u otros procesos sobre los que actúa a través de su interacción con uno o varios blancos moleculares, mayormente proteínas <sup>137</sup>.

Las aproximaciones experimentales para el descubrimiento de fármacos suelen seguir dos caminos fundamentales, uno basado en el blanco molecular y otro en los efectos del fármaco en modelos de enfermedades <sup>138-140</sup>. En el primer caso se identifican pequeñas moléculas que se unen a proteínas diana recombinantes mediante el cribado de grandes bibliotecas de compuestos. Una vez identificadas las moléculas candidatas, ocurre una optimización en cuanto a afinidad, propiedades físicas y químicas, absorción y distribución, eficacia y seguridad en sistemas de modelos celulares o *in vivo*. El auge de este enfoque está asociado a los avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares de las enfermedades y en las tecnologías de cribado a gran escala <sup>141,142</sup>. Por otro lado, el enfoque de cribado fenotípico monitorea la respuesta biológica a compuestos bioactivos en sistemas modelo de enfermedad. Aunque inicialmente no se centra en un blanco específico, la identificación de este constituye un paso posterior importante en los estudios de seguridad y optimización del fármaco. Esta suele ser la estrategia por la cual se han descubierto fármacos primeros en su clase <sup>141</sup>.

Dado que las proteínas constituyen la mayoría de los componentes bioquímicamente activos de los sistemas biológicos y son el objetivo de casi todos los fármacos, <sup>143,144</sup> los métodos analíticos que permiten estudiarlas son cruciales en el descubrimiento y desarrollo de fármacos. La proteómica basada en la espectrometría de masa (MS) no sólo aporta información sobre la identidad y abundancia de proteínas en muestras biológicas, si no que se ha transformado en una herramienta para el estudio de sus propiedades y modulación funcional a distintos niveles. Continuos avances tecnológicos en el área, desde el procesamiento de las muestras y las características de los espectrómetros de masa hasta las capacidades de análisis de datos, impulsan una tendencia hacia la obtención de proteomas exhaustivos. Los enfoques proteómicos modernos abordan la participación y la reactividad de las moléculas bioactivas, resuelven la dinámica espaciotemporal en las redes de señalización de proteínas y proporcionan una anotación funcional exhaustiva de las modificaciones postraduccionales (PTM) a escala de todo el proteoma <sup>145-150</sup>. Los métodos proteómicos resultan útiles tanto en las estrategias de descubrimiento de fármacos basadas en blancos como en las de tipo fenotípico (Figura 7).

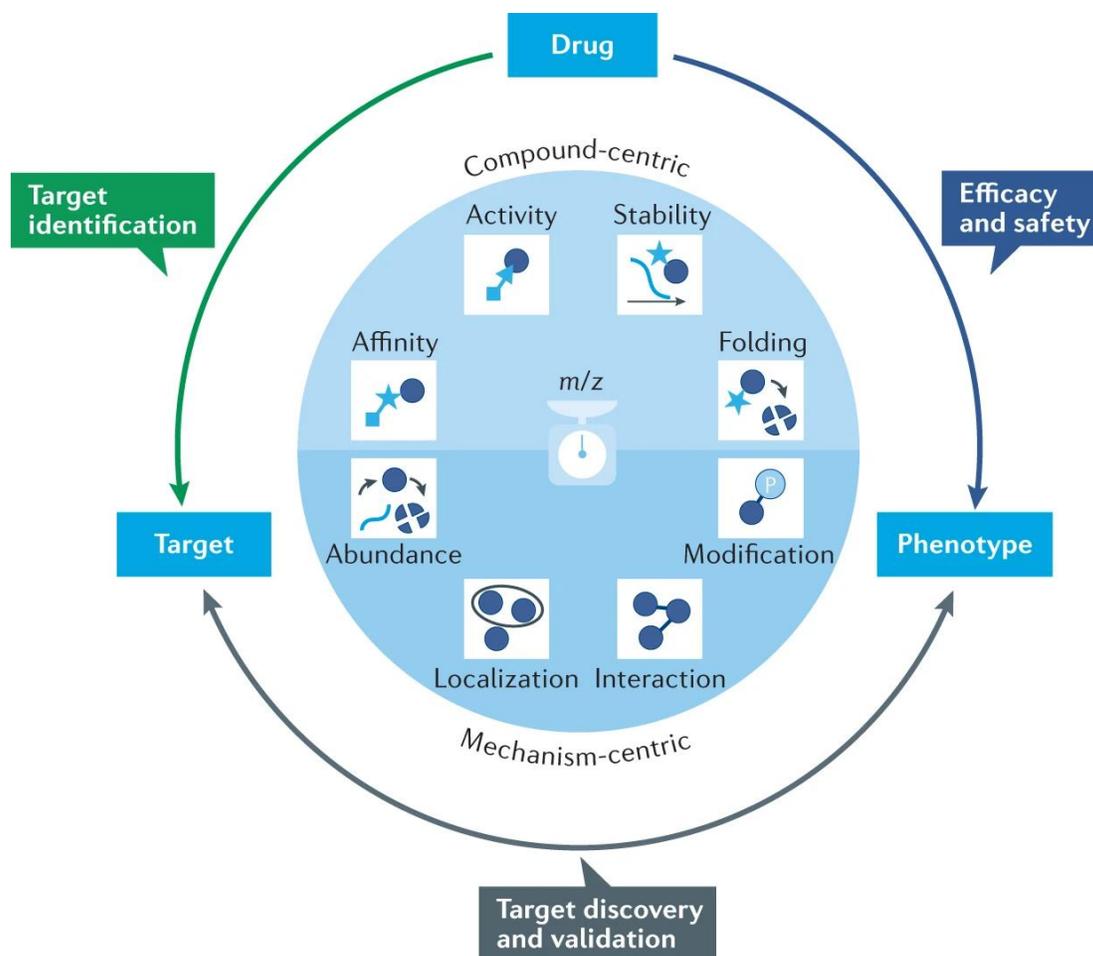


Figura 7. Métodos proteómicos para la identificación y validación de blancos y el control de la seguridad y la eficacia. Mientras que los métodos centrados en el compuesto investigan cómo los fármacos afectan directamente a la afinidad, la actividad, la estabilidad y el plegamiento de las proteínas, los métodos centrados en el mecanismo investigan la forma en la que actúa el fármaco, o el mecanismo de la enfermedad, indirectamente a través de la evaluación de la abundancia, la localización, la interacción y la modificación de las proteínas. La relación masa/carga ( $m/z$ ) ilustra el resultado analítico de los análisis de espectrometría de masa. Tomado de <sup>141</sup>.

### 3.2.8. Proteómica basada en espectrometría de masa

La espectrometría de masa constituye una plataforma clave para los análisis proteómicos, con dos enfoques opuestos denominados proteómica "top-down" y "bottom-up". En la proteómica top-down, la identificación de proteínas se obtiene directamente de la fragmentación de la proteína intacta. Cuando está disponible, esta metodología proporciona datos de identificación precisa de las proteoformas (Todas las diferentes formas moleculares en las que se puede encontrar el producto proteico de un solo gen, incluidas las modificaciones debidas a variaciones genéticas, transcritos de ARN alternativamente empalmados y modificaciones postraduccionales <sup>151</sup>) de una

muestra; sin embargo, es considerablemente más difícil de ejecutar que el enfoque bottom-up debido a la complejidad de los datos generados y a diversas limitaciones técnicas<sup>151,152</sup>. El enfoque bottom-up es el más difundido en los estudios de proteómica a gran escala. En esta metodología las proteínas se digieren en péptidos mediante tripsina u otras proteasas y luego se separan e identifican por cromatografía líquida y espectrometría de masa en tándem. Cuando los péptidos proteolíticos provienen de una mezcla compleja de proteínas, a esta metodología se le llama proteómica de tipo shotgun<sup>153</sup>. La enzima empleada más comúnmente es la tripsina, con especificidad de escisión en el lado C-terminal de los residuos de lisina y arginina. Esto es beneficioso para el análisis de MS posterior porque ambos aminoácidos llevan una carga C-terminal positiva a pH ácido, pero también se utilizan otras peptidasas como GluC o AspN para aumentar la cobertura de secuencia de proteínas. Las mezclas de péptidos resultantes se separan en función de sus propiedades físicas (principalmente hidrofobicidad mediante cromatografía líquida (LC) de fase reversa (RP)) y se transfieren en línea al espectrómetro de masa después de la ionización por electrospray. Decenas de miles de péptidos (correspondientes a miles de proteínas) pueden cuantificarse en menos de 1 h a partir de unos pocos microgramos de material de partida biológico<sup>141</sup>.

En los métodos de proteómica no dirigida o de descubrimiento, la adquisición de los datos puede ser dependiente o independiente de estos (data-dependent acquisition (DDA) y data-independent acquisition (DIA) respectivamente)<sup>154</sup>. En DDA, los *n* péptidos más abundantes (generalmente entre 12 y 20) de un primer ciclo de MS se fragmentan secuencialmente (MS/MS). En DIA, de forma cíclica, todos los péptidos en una ventana de *m/z*, a lo largo de todo el rango de *m/z* son fragmentados simultáneamente. En DDA es más probable la secuenciación estocástica de los precursores, por lo que puede tener más valores faltantes en comparación con DIA; este efecto disminuye con inyecciones repetidas de la misma muestra. Aunque DIA puede generar información muy exhaustiva, la identificación inequívoca de péptidos a partir de espectros de fragmentación complejos sigue siendo un desafío en la actualidad<sup>141</sup>. Mediante distintos algoritmos de software los datos adquiridos son utilizados para la identificación y cuantificación de los péptidos y posteriormente esta información es extrapolada a nivel de proteínas<sup>155</sup>. El enfoque más común para la identificación de péptidos mediante DDA sigue siendo el uso de motores de búsqueda en bases de datos, aunque el desarrollo de métodos libres de hipótesis es un

terreno en crecimiento <sup>156</sup>. Los motores de búsqueda en bases de datos realizan la digestión *in silico* de una base de datos de secuencias de proteínas proporcionada por el usuario, creando candidatos de péptidos que coincidan con la masa precursora esperada y el estado de carga estimado de un escaneo MS/MS relevante. Para cada candidato de péptido, se genera un espectro teórico, el cual se compara y califica contra el espectro experimental. Se han desarrollado diversas funciones de puntuación que tienen como objetivo distinguir entre coincidencias correctas e incorrectas, de modo que el péptido correcto más probable se clasifique primero cuando varios candidatos de péptidos se comparan con un espectro. Para controlar la tasa de descubrimientos falsos (FDR), se añaden péptidos incorrectos conocidos (señuelos) al espacio de búsqueda, que imitan la distribución de coincidencias incorrectas en el espacio de búsqueda objetivo. La lista resultante de coincidencias péptido-espectro (PSMs) se puede ordenar y filtrar para un FDR deseado, de manera que la lista resultante de péptidos y proteínas identificados contenga, como máximo, un porcentaje determinado de coincidencias falsas <sup>157</sup>.

Las estrategias de cuantificación pueden implicar marcación metabólica o isotópica de las proteínas o los péptidos, o puede ser libre de marcación. Si bien la cuantificación utilizando marcación es superior desde el punto de vista cuantitativo, implica reactivos costosos y pasos adicionales previos a la medición de las muestras <sup>158</sup>. Las dos formas principales de medir cambios en la abundancia de proteínas sin usar marcación consisten en medir la intensidad del ion precursor (XIC) o contar los espectros (SC) asignados a una proteína específica. En la cuantificación por XIC se utiliza el área bajo una curva de elución cromatográfica como una medida de la intensidad del ion precursor y este valor es proporcional a la cantidad del compuesto que se eluye. Este enfoque requiere una cromatografía muy precisa y reproducible, ya que los picos de péptidos de diferentes perfiles de elución cromatográfica deben alinearse con precisión durante el análisis. La otra variante libre de marcación se basa en el conteo de los espectros identificados para los péptidos en una proteína. Dado que la longitud de una proteína afecta el número de recuentos espectrales, la normalización por la abundancia espectral (NSAF) proporciona una medida mejorada para la abundancia relativa basada en SC. El valor NSAF para una proteína determinada se calcula dividiendo el valor de SC de una proteína por su longitud (L) y posteriormente por la suma de todos los SC/L para todas las proteínas identificadas en una mezcla compleja. Los valores de NSAF ofrecen una medida de la abundancia relativa y la capacidad de comparar la abundancia de

proteínas dentro de una muestra. La eficacia de este método depende en gran medida de la calidad de las identificaciones a partir de la asignación de espectros <sup>159</sup>.

En la Figura 8 se muestra un esquema resumido de las principales etapas en el análisis proteómico no dirigido de tipo shotgun.

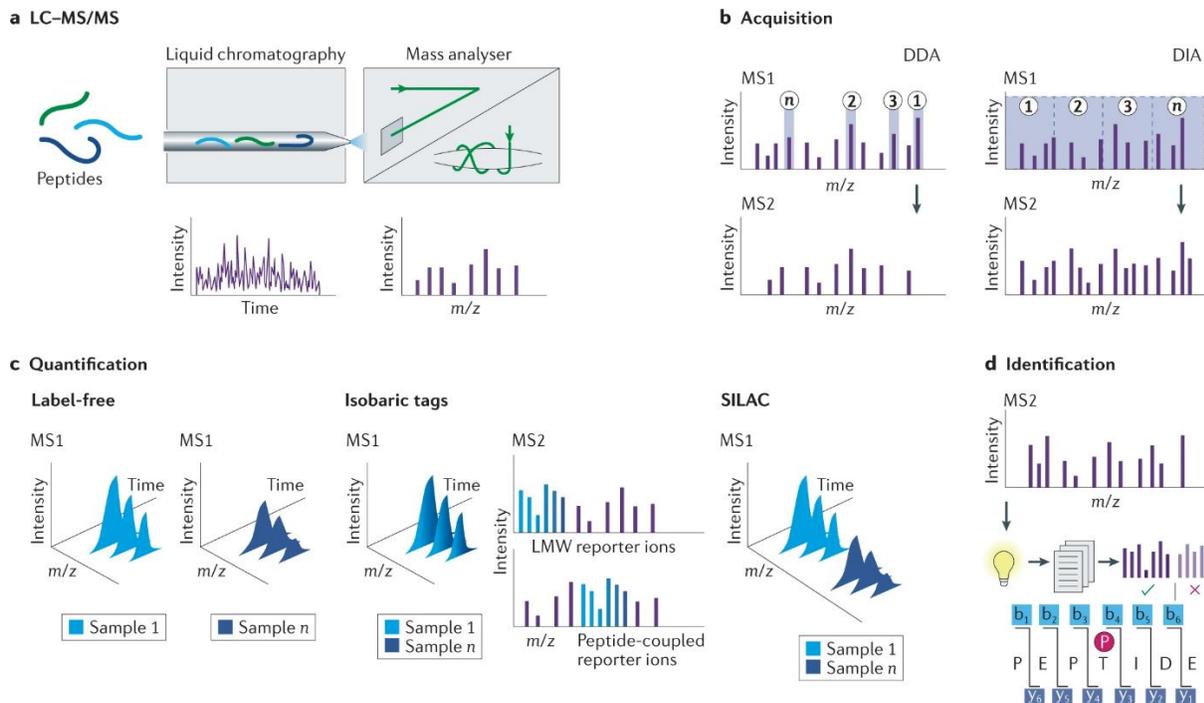


Figura 8. Principales estrategias de identificación y cuantificación de proteínas por espectrometría de masa. a | Los péptidos se separan en función de su hidrofobicidad mediante cromatografía líquida (LC) y se analizan en un espectrómetro de masa mediante un analizador de masa de tiempo de vuelo (TOF) u orbitrap. b | Los esquemas comunes de adquisición basados en el descubrimiento incluyen DDA (adquisición dependiente de los datos, en la que un número predefinido de los péptidos más abundantes en el MS1 se seleccionan para la fragmentación seguido de la adquisición secuencial de los espectros MS2) y DIA (adquisición independiente de los datos, en el que todos los péptidos en una ventana deslizante m/z en escaneos MS1 se seleccionan para fragmentación y análisis en escaneos MS2). c | Para la cuantificación sin marcación, las muestras se analizan secuencialmente y las intensidades relativas de los péptidos se comparan entre corridas LC/MS. Alternativamente, los péptidos de 6 a 10, y hasta 18, muestras se etiquetan isobáricamente, se mezclan, se analizan y se cuantifican juntos en una sola serie de MS mediante iones informadores de bajo peso molecular (LMW) o acoplados a péptidos a nivel de MS2. En la marcación metabólica, como la marcación isotópica estable con aminoácidos en cultivo celular (SILAC), se analizan y cuantifican juntas hasta tres muestras en función de sus intensidades peptídicas relativas. d | Las secuencias peptídicas y los aminoácidos modificados postraduccionalmente se identifican normalmente comparando los espectros de masas con bases de datos específicas de organismos digeridos in silico; sin embargo, los nuevos algoritmos también facilitan la identificación espectral directa. Tomado de <sup>141</sup>.

### 3.2.9. Identificación de blancos y mecanismos de acción de drogas

La proteómica basada en MS es una herramienta valiosa para el estudio de las vías por las cuales los compuestos activos ejercen sus funciones, ya sea mediante la identificación de interacciones directas de estos con sus blancos o a través de medidas indirectas de los efectos que causan en ensayos celulares o *in vivo* <sup>160</sup>. Las estrategias más establecidas para la identificación directa usan el enriquecimiento de los blancos de fármacos a partir de extractos celulares o de células vivas a través de variantes del compuesto modificadas (usualmente añadiendo un grupo biotina) para facilitar su purificación <sup>161</sup>. Enfoques más recientes utilizan los cambios de estructura y propiedades que generan los compuestos sobre las proteínas diana. Ejemplos de esto son la estabilidad térmica y la resistencia a la proteólisis <sup>162,163</sup>. Para los métodos que usan sondas diseñadas a partir del compuesto bioactivo es importante que este conserve su reactividad/bioactividad luego de la modificación y puede ser útil fijar las interacciones de la molécula con las proteínas diana de forma covalente por ejemplo a través de grupos fotorreactivos como las azidas aromáticas <sup>164</sup>. Aunque los pasos de purificación por afinidad enriquecen las interacciones deseadas, el uso de blancos adecuados y de repositorios de contaminantes comunes contribuyen con la disminución de falsos positivos <sup>165</sup>. Otras estrategias que involucran sondas derivadas del compuesto o incluso sondas menos específicas también resultan informativas en cuanto a la interacción del compuesto con las proteínas blanco. Un ejemplo son los ensayos de competencia, en los que se incubaba una sonda de afinidad con un extracto celular en presencia o ausencia de concentraciones excesivas del compuesto bioactivo no derivatizado. En el análisis de MS, las proteínas blanco muestran niveles significativamente menores en la resina cuando los sitios de unión están bloqueados por el compuesto original, en comparación con el control no bloqueado <sup>141</sup>.

Las observaciones fenotípicas o marcas moleculares también pueden ser una forma de estudiar de manera indirecta los cambios generados por un fármaco sobre determinados blancos o vías moleculares. La creciente disponibilidad de métodos bioquímicos y de biología celular y molecular sumado a las prestaciones de la proteómica están permitiendo abarcar gran parte de las propiedades funcionales de las proteínas y más específicamente en respuesta a drogas. La regulación de la expresión, el recambio, la localización, la modificación postraduccional y la interacción proteína-proteína son algunas de las más relevantes <sup>146,147</sup>.

Los análisis a gran escala del proteoma permiten detectar variaciones en la abundancia de proteínas en respuesta al tratamiento con fármacos, lo que puede ser indicativo de aumentos en los niveles de expresión de estas o la estimulación de procesos degradativos <sup>166,167</sup>. En ambos casos los cambios pueden tener un rol terapéutico deseado o pueden estar relacionados con efectos adversos, secundarios o mecanismos compensatorios. Este tipo de análisis es un elemento clave en el enfoque basado en mecanismos de acción al generar datos representativos de la totalidad del proteoma.

Otras etapas del descubrimiento de fármacos, como los estudios de la patología de las enfermedades en identificación de blancos atacables farmacológicamente, o los relacionados con la seguridad y eficiencia durante el tratamiento, también pueden ser asistidas por análisis proteómicos <sup>141</sup>. La integración sistemática de los enfoques proteómicos a los distintos pasos del proceso, en conjunto con otro arsenal de herramientas biológicas, sin dudas contribuirá a disminuir los riesgos que implica la búsqueda de nuevos medicamentos.

### **3.3. Objetivos específicos del capítulo I**

1. Identificar el mecanismo de acción del SANA mediante un abordaje proteómico cuantitativo, no dirigido, en el modelo murino de obesidad inducida por dieta (DIO).
2. Identificar blancos moleculares del SANA involucrados en su mecanismo de acción.

### 3.4. Resultados

Debido a sus potentes efectos antiinflamatorios, los nitroalquenos han sido evaluados como fármacos en diferentes modelos animales de enfermedad vascular<sup>62,89,94-97</sup>. Más recientemente nuestro grupo ha diseñado nitroalquenos derivados de pequeñas moléculas también con efectos beneficiosos en el control de enfermedades de base inflamatoria<sup>112-114,116</sup>. Utilizando esta estrategia nuestro grupo diseñó un derivado nitroalqueno del salicilato, un fármaco ancestral con efectos antiinflamatorios<sup>121,122</sup> y metabólicos bien caracterizados<sup>118,128,131-133</sup>. La idea de desarrollar el derivado nitroalqueno del salicilato fue potenciar dichos efectos de manera de poder disminuir la dosis (g/día) necesaria para obtener los efectos biológicos en pacientes.

El objetivo principal de mi contribución en el marco de este estudio fue la elucidación del mecanismo de acción del ácido 5-(2-nitroetenil)salicílico a través de aproximaciones proteómicas cuantitativas no dirigidas.

#### 3.4.1. Síntesis y reactividad del SANA

El SANA fue sintetizado por el equipo de trabajo de la Dra. Virginia López. Se obtuvo mediante una síntesis de un solo paso consistente en una reacción nitroaldólica entre el ácido 5-formilsalicílico y nitrometano (Figura 9). Como producto final se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento de ~93%.

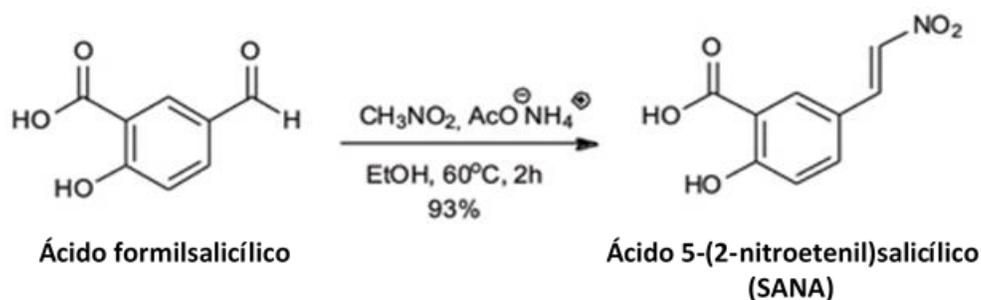


Figura 9. Reacción de síntesis del SANA. EtOH: etanol, AcONH<sub>4</sub>: acetato de amonio.

El compuesto fue controlado por espectrometría de masa de alta resolución (HRMS) en modo negativo utilizando un espectrómetro de masa híbrido de cuadrupolo-orbitrap (Q Exactive Plus,

Thermo Scientific). El valor de  $m/z$   $[M-H]^-$  teórico para la composición del SANA ( $C_9H_7NO_5$ ) es 208.0251, la señal promedio obtenida de 10 espectros MS consecutivos fue de 208.0249. En la Figura 10 se muestran los espectros MS (A) y MS/MS (B) representativos obtenidos por espectrometría de masa de alta resolución en modo negativo. El espectro de fragmentación muestra que las señales más intensas que se generan por la ruptura de la molécula son 121.03 y 164.03, cuyas estructuras más probables se muestran en la Figura 10B.

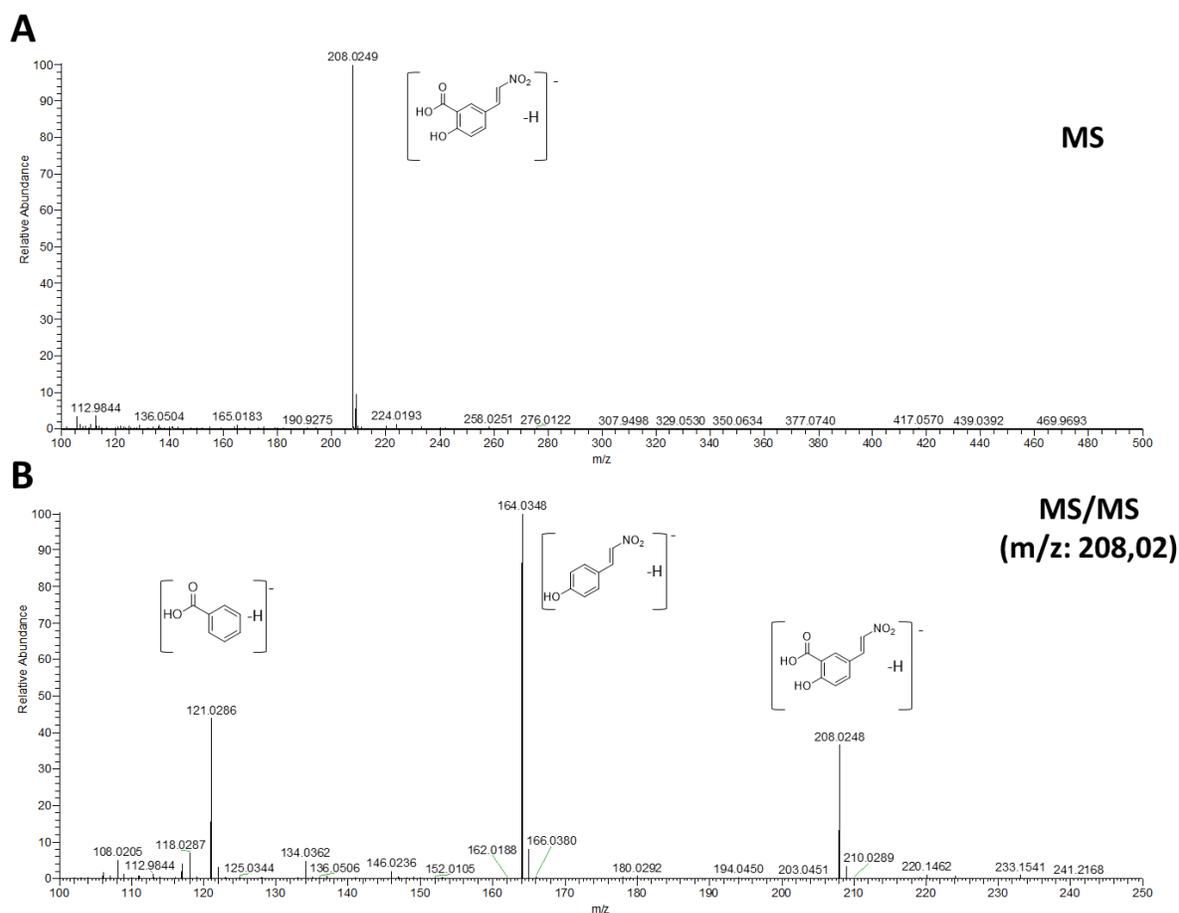


Figura 10. Espectros MS (A) y MS/MS (B) del SANA obtenidos con alta resolución en modo negativo en un espectrómetro de masa Q Exactive Plus (Thermo Scientific). HRMS:  $m/z$   $[M-H]^-$  teórica para  $C_9H_7NO_5$ : 208.0251, medida: 208.0249.

Para estudiar si el compuesto resultante de la incorporación del grupo nitroalqueno al salicilato mantenía la propiedad química de reaccionar por adición de Michael con tioles de bajo peso molecular (propiedades electrofílicas) como otros nitroalquenos, fue analizada la reactividad del

SANA con los nucleófilos modelo  $\beta$ -mercaptoetanol (BME) y glutatión reducido (GSH). Para ello, el compuesto (10  $\mu$ M) fue incubado con un exceso (100  $\mu$ M) de BME o GSH y la reacción se controló espectrofotométricamente. La Figura 11 muestra las medidas de absorbancia entre 200 - 600 nm a cada minuto durante los primeros 10 minutos de reacción entre el compuesto y cada nucleófilo (Figura 11A y B). En ambos casos la curva de absorbancia tiene un máximo alrededor de los 360 nm que corresponde a la conjugación del grupo nitroalqueno al anillo aromático del esqueleto salicilato. Como es esperado, cuando ocurre la reacción de adición de Michael con los nucleófilos, se reduce el doble enlace y se pierde la conjugación del grupo nitroalqueno (Figura 11C y D), alterando el cromóforo y generando una pérdida de la absorción UV-Visible. Dicha pérdida se observa como una caída a la longitud de onda de máxima absorción (360 nm), siendo abrupta en el primer minuto de reacción. Globalmente, los gráficos muestran que el SANA mantiene las propiedades electrofílicas características de los nitroalquenos.

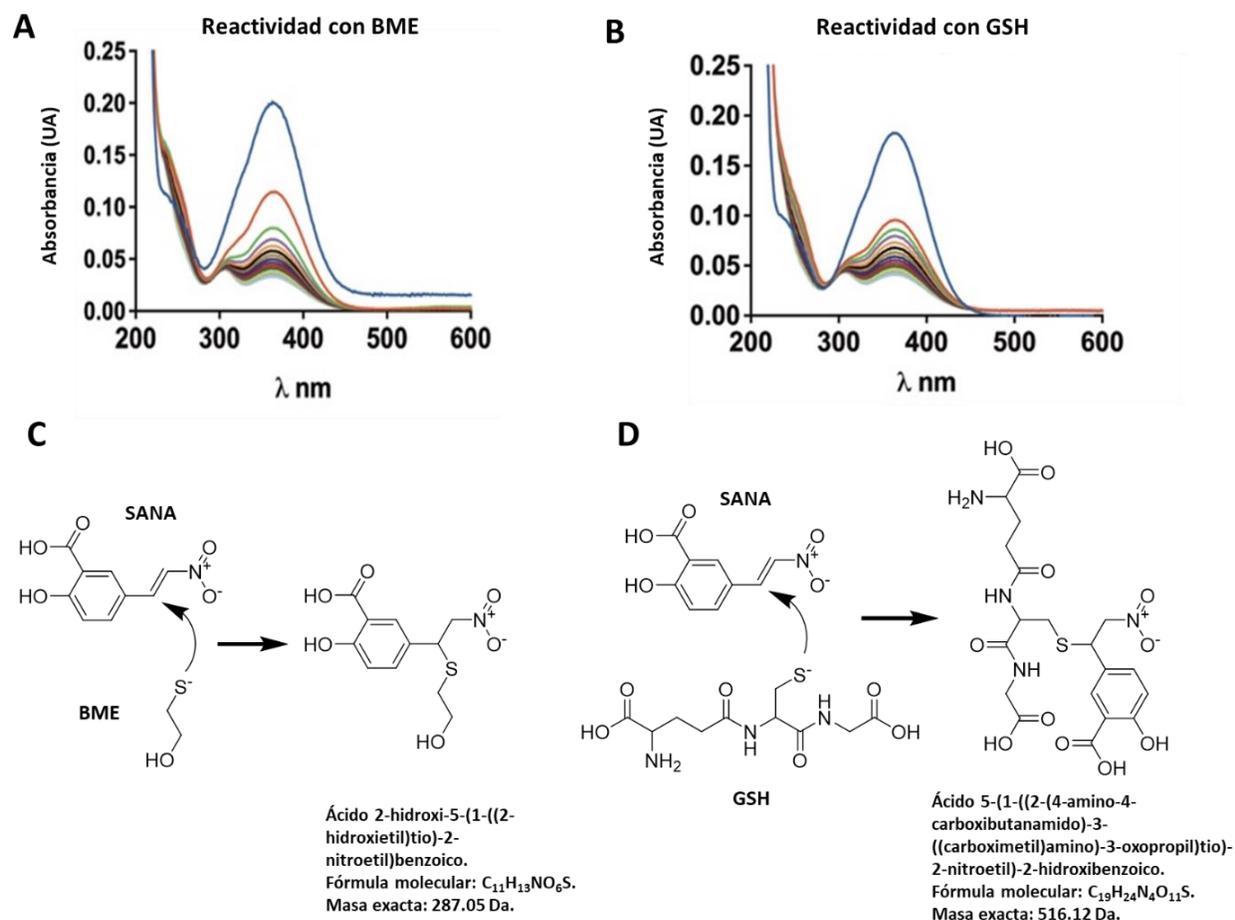


Figura 11. Reactividad del SANA con los tioles de baja masa molecular  $\beta$ -mercaptoetanol (BME) y glutatión reducido (GSH). El SANA (10  $\mu$ M), disuelto en solución tampón fosfato (20 mM), pH 7.4, se incubó con BME (A) o GSH (B) a 100  $\mu$ M. Los espectros de cada reacción se obtuvieron en el rango de 200 - 600 nm cada 60s durante 10 minutos. C y D: Esquemas de las reacciones mostradas en A y B respectivamente, donde se muestran los productos de la reacción de adición de Michael del SANA con cada uno de los nucleófilos.

Adicionalmente, las mezclas de reacción de SANA con cada nucleófilo fueron medidas por espectrometría de masa de alta resolución en modo negativo y se comprobó la formación de los productos de adición de Michael de  $m/z$   $[M-H]^-$ : 286.04 y 515.11, correspondientes a la reacción con BME y GSH respectivamente (Figura 12).

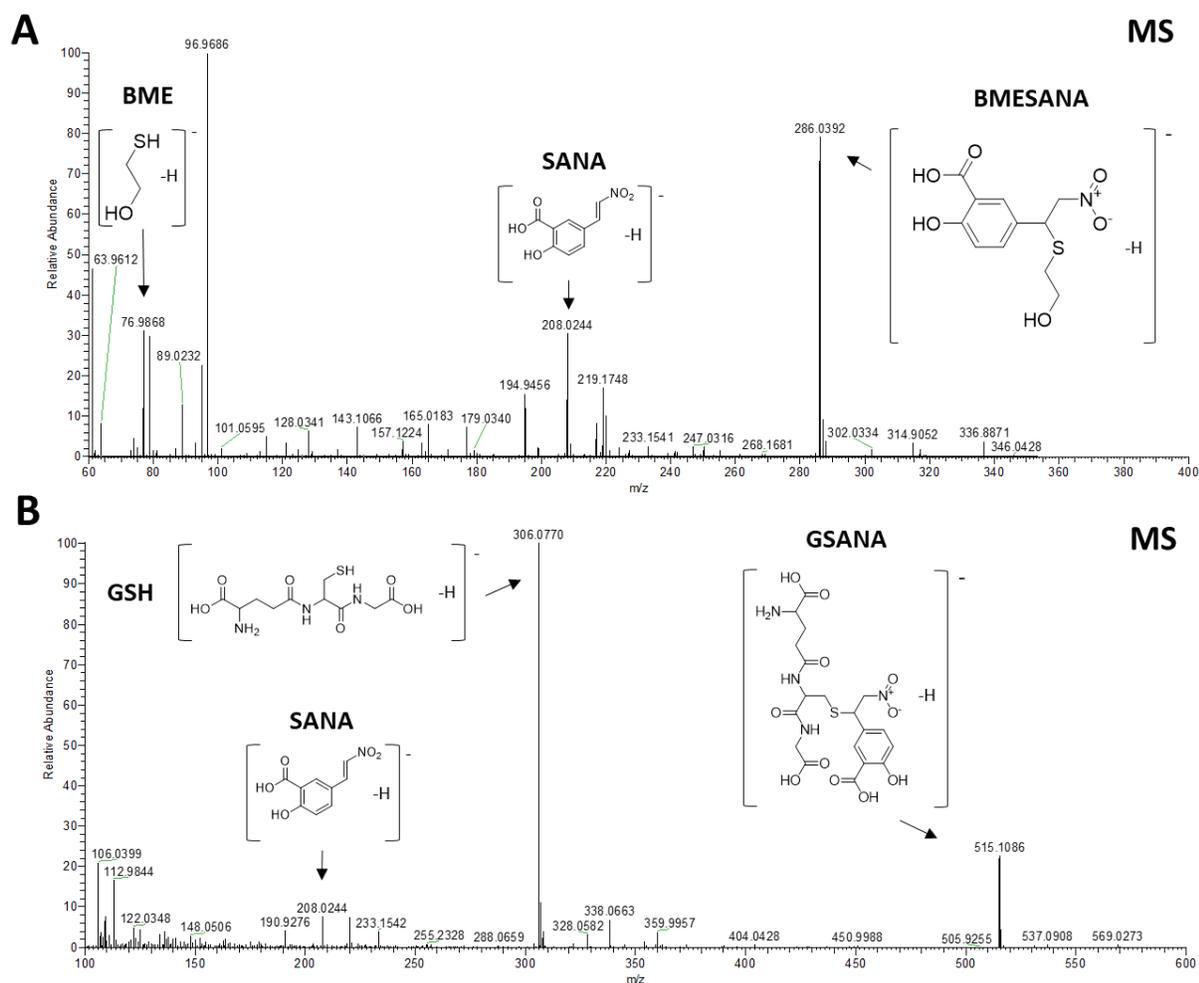


Figura 12. Espectros de masa de las mezclas de reacción del SANA con los nucleófilos BME (A) y GSH (B), obtenidos con alta resolución en modo negativo en un espectrómetro de masa Q Exactive Plus (Thermo Scientific). Entre corchetes se muestran las estructuras químicas del SANA, BME, GSH y los productos de cada reacción (BMESANA y GSANA), con la pérdida de un protón característica de la adquisición en modo negativo. BMESANA: ácido 2-hidroxi-5-(1-((2-hidroxi)etil)tio)-2-nitroetil)benzoico. GSANA: ácido 5-(1-((2-(4-amino-4-carboxibutanamido)-3-((carboximetil)amino)-3-oxopropil)tio)-2-nitroetil)-2-hidroxibenzoico.

### 3.4.2. Efectos del SANA en un modelo de obesidad inducido por dieta rica en grasa (HFD)

Partiendo de que el SANA fue diseñado tomando como base el salicilato, un fármaco con efectos metabólicos<sup>17,123,124,128,131-135</sup> y esperando que la adición del grupo nitroalquenilo aumentara su potencia y eficacia, se estudió su efecto en un modelo murino de obesidad inducida por dieta

(DIO). Los estudios en este modelo se hicieron en colaboración con la MSc. Karina Cal, del Laboratorio de Patologías del Metabolismo y el Envejecimiento (Institut Pasteur de Montevideo) quien es co-primera autora del manuscrito adjunto a este capítulo. La alimentación de ratones con dieta rica en grasa (HFD) es un modelo ampliamente utilizado en estudios relacionados con la obesidad. Por tanto, para estudiar los efectos metabólicos del SANA, se alimentaron ratones macho C57BL6/J con HFD en presencia o ausencia de SANA (peleteado con la comida). El registro semanal del peso de los ratones durante un período de tratamiento de 8 semanas mostró que el SANA los protegía del aumento de peso inducido por la dieta (Figura 13A-C). En promedio, los ratones control mantenidos en HFD tuvieron un incremento de peso de aproximadamente 40% al cabo de las 8 semanas con respecto al peso inicial (semana 0, Figura 13C), un valor de incremento consistente con experimentos similares utilizando este modelo de obesidad en roedores<sup>168,169</sup>. En contraste, los ratones tratados con SANA no experimentaron un incremento de peso superior al 10% durante el mismo período. Las diferencias de peso entre ambos grupos no estuvieron asociadas a un cambio significativo en la ingesta total de alimento (Figura 13D). El análisis de la glucosa basal mostró una disminución significativa de este parámetro en los animales tratados con SANA (Figura 13E), manteniéndose en valores similares al grupo control alimentado con dieta normal, aproximadamente 100 mg/dL (ver figura 2E del manuscrito adjunto a este capítulo). Al terminar el tratamiento, los ratones fueron sacrificados y se colectaron muestras de sangre y tejidos para estudios bioquímicos, histológicos y moleculares. Como parte del perfil metabólico de los animales tratados con SANA se comprobó que tenían menores valores de insulina y ácidos grasos libres en sangre (Figura 13F y G respectivamente). Una caracterización más completa de los efectos metabólicos producidos por el SANA en el modelo de HFD se muestra en las figuras 1 - 3 de los resultados del manuscrito “A nitroalkene derivative of salicylate alleviates diet-induced obesity by activating creatine metabolism and non-shivering thermogenesis” que forma parte de esta tesis. En síntesis, dichas figuras muestran que el SANA disminuye la masa grasa de los distintos depósitos de tejido adiposo y aumenta la masa magra. Además, previene el daño hepático inducido por la HFD. Mejora la tolerancia a la glucosa y disminuye los niveles circulantes de leptina. Interesantemente el SANA también mostró efectos protectores frente a ratones con obesidad ya establecida (5 semanas de una dieta alta en grasas). Los ratones obesos tratados con SANA perdieron peso, mostraron una glucemia basal disminuida y mejor tolerancia a la glucosa.

No presentaron signos de esteatosis hepática, de toxicidad renal ni hepática o mortalidad asociada a la administración en un período de hasta 25 semanas.

El conjunto de estos resultados indica que el SANA tiene un efecto protector contra el aumento de peso inducido por una dieta rica en grasa y produce una disminución significativa del peso en ratones obesos, siendo también capaz de mitigar las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad.

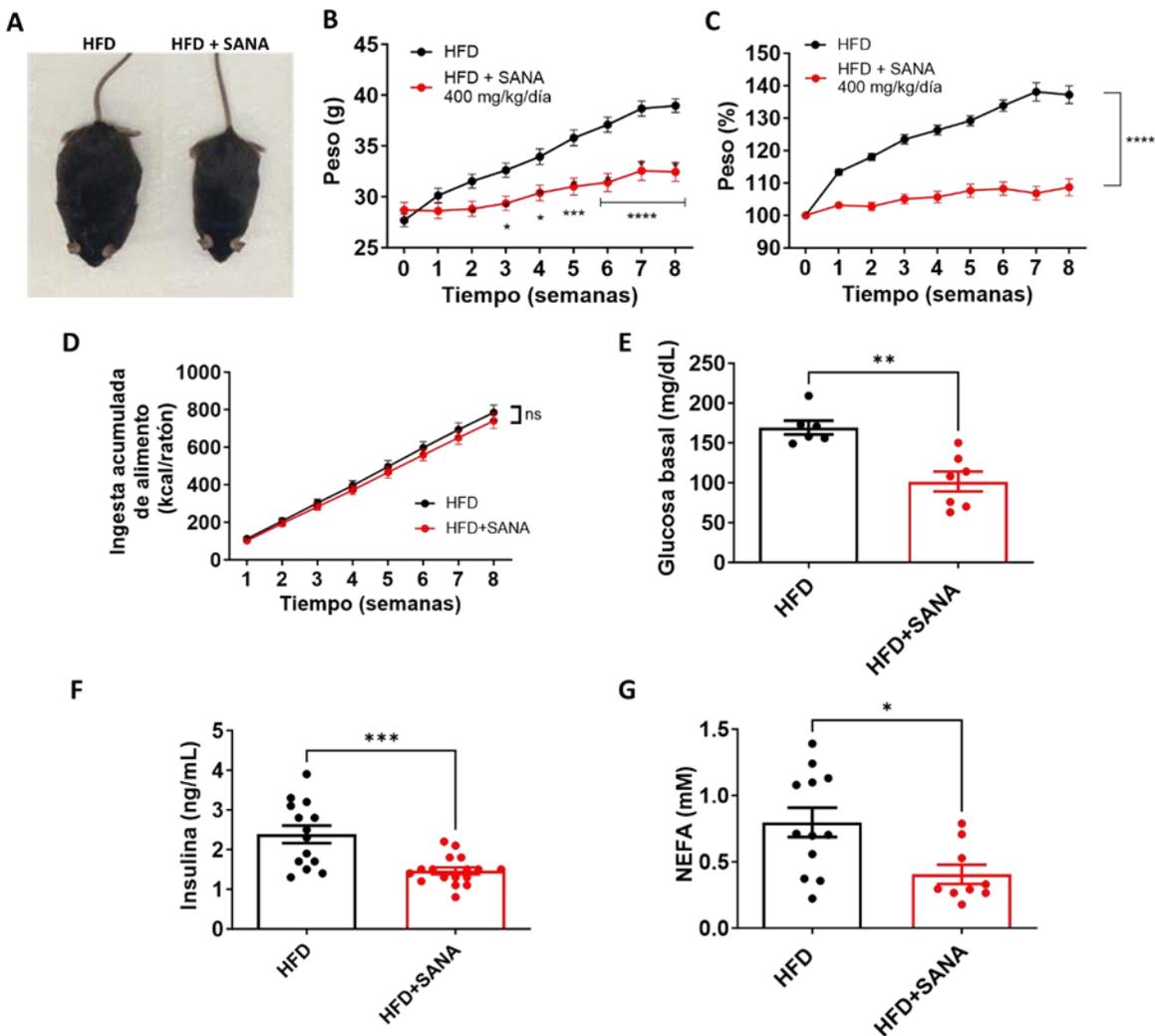


Figura 13. Modelo de obesidad inducida por dieta rica en grasa (HFD) en ratones C57BL6/J tratados o no con SANA (400 mg/kg/día, por vía oral mezclado con la dieta). **A**: imagen representativa de los ratones al finalizar el tratamiento. **B-C**: ganancia de peso: en B expresada en gramos (g) y en C en porcentaje con respecto al peso inicial. n = 30 por condición. **D**: ingesta acumulativa de alimentos. El consumo de comida se midió durante un período de 24 horas y se expresó como calorías totales por ratón, independientemente del peso corporal. n = 4 por condición. **E-G**: glucosa

basal (n = 6-7 por condición), insulina (n = 14-17 por condición), y ácidos grasos no esterificados (NEFA, n = 14-17 por condición) cuantificados en plasma. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  SEM. Análisis estadísticos: B-D: ANOVA de dos vías con prueba de comparaciones múltiples de Šidák; E-G: Prueba de t no pareada de dos colas. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001.

### 3.4.3. Evaluación de la forma saturada del SANA en el modelo de DIO

Luego de constatar los efectos producidos por el SANA en el peso y los niveles de glucosa sanguínea en animales con DIO, surgió la interrogante de si tales efectos provenían de la molécula íntegra o de algún metabolito generado a partir de esta. Para abordar esta pregunta primeramente se hicieron extracciones orgánicas de plasma de animales tratados con SANA (10 mg/kg, sonda gástrica) y se analizaron por HPLC. En la Figura 14A se muestran cromatogramas representativos del plasma control (panel izquierdo, Figura 14Ai) y de animales tratados con SANA (panel derecho Figura 14Ad), usando ácido salicílico como estándar interno. En el cromatograma del plasma de animales tratados con SANA (Figura 14Ad), además de las señales correspondientes al SANA (11-12 min, 360 nm) y del estándar interno (SA, 8-9 min, 300 nm), se detectó un pico con absorbancia a 300 nm y un tiempo de retención de 10 minutos marcado como M1. Este pico fue colectado y se confirmó que la masa exacta correspondía con la del derivado alcano del SANA: ácido 5-(2-nitroetil) salicílico, C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub> (M-H: 210.0389). A continuación, M1 fue sintetizado por nuestro grupo y administrado (20 mg/kg/día, vía subcutánea) a ratones alimentados con HFD a los cuales se les determinó la ganancia de peso (Figura 14B). Adicionalmente se midieron los niveles de glucosa basal en comparación con ratones en dieta normal (Figura 14C). Tanto para la ganancia de peso como para el análisis de la glucosa basal, el tratamiento con M1 fue comparado contra las condiciones: sólo dieta y dieta+SANA. Como se puede observar en la Figura 14B y C, el metabolito M1 no tuvo efecto sobre la ganancia de peso ni el control de la glucosa en los animales con DIO, lo cual confirma que el grupo nitroalquenilo es imprescindible para que el SANA ejerza sus efectos metabólicos.

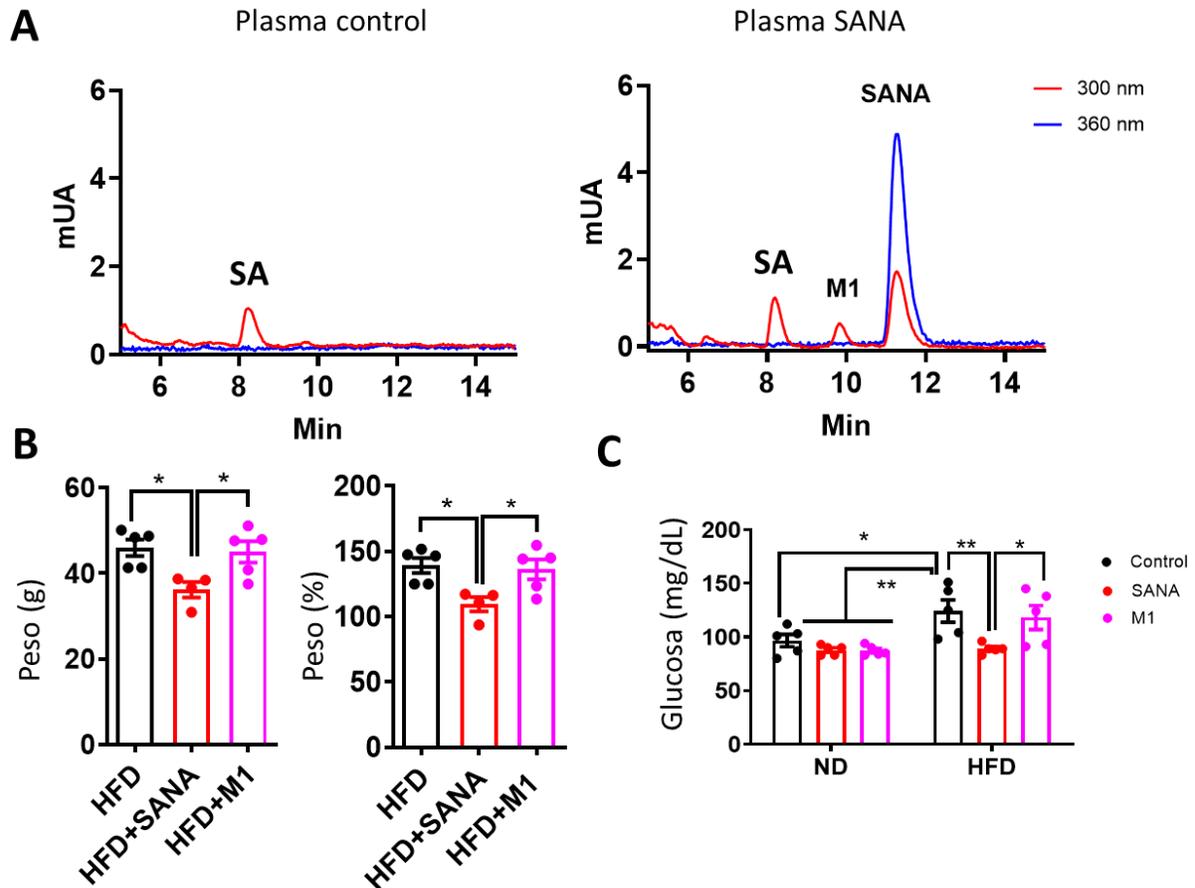


Figura 14. El metabolito saturado del SANA (M1) no genera un efecto en el peso ni en el control de la glucosa en ratones con DIO. **A:** Cromatogramas representativos de extracción orgánica de plasma de ratones control (panel izquierdo) y ratones tratados con SANA (10 mg/kg, sonda gástrica) (panel derecho). Se utilizó ácido salicílico (SA) como patrón interno. M1 indica el pico asignado al metabolito principal de SANA, ácido 5-(2-nitroetil)salicílico. **B:** Ganancia de peso (panel izquierdo) y porcentaje del peso inicial (en el día 0) (panel derecho) de ratones alimentados con HFD y tratados con SANA (20 mg/kg/día, SC) o M1 (20 mg/kg/día SC) durante 8 semanas (n=4-5 por condición). **C:** Niveles de glucosa basal de ratones alimentados con dieta normal (ND) o después de 8 semanas de HFD y tratados con SANA (20 mg/kg/día, SC) o M1 (20 mg/kg/día SC) (n=5 por condición). Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  SEM. Análisis estadísticos: C) ANOVA ordinario de una vía con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni; D) ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

### 3.4.4. Análisis proteómico del tejido adiposo blanco inguinal (iWAT)

Teniendo en cuenta que el fenotipo protector contra la DIO desencadenado por SANA no estaba relacionado a cambios en la ingesta, y conociendo por resultados de nuestro equipo que el SANA tampoco induce cambios en la actividad física de los animales (ver manuscrito adjunto al capítulo),

una hipótesis capaz de justificar tal efecto sería el aumento en el gasto energético a nivel del tejido adiposo. El tejido adiposo blanco es la forma más abundante de tejido adiposo, que se encuentra en casi todas las áreas del cuerpo, representando el tejido subcutáneo el 80% o más del total de la grasa en humanos y alrededor de la mitad en roedores <sup>170</sup>. En los depósitos de WAT se pueden desarrollar adipocitos beige, capaces de impactar en el gasto energético a través de su participación en la respuesta termogénica. El reporte reciente de nuevas vías termogénicas y el rol importante del WAT en la homeostasis metabólica, ***motivó la utilización de un análisis proteómico no dirigido en iWAT como abordaje de descubrimiento para dilucidar las vías metabólicas involucradas en el mecanismo de acción del SANA.***

Para llevar a cabo dicho objetivo, se colectaron muestras de tejido adiposo blanco inguinal de ratones mantenidos en HFD con o sin SANA. Las muestras fueron homogeneizadas en solución tampón de lisis (RIPA) y el contenido proteico fue cuantificado por el método colorimétrico de Bradford. Para el análisis proteómico los extractos de proteicos fueron cargados en una SDS-PAGE preparativa, previo a la digestión en gel de las proteínas. Los péptidos trípticos generados fueron medidos por nano HPLC/MS.

En la Figura 15 se muestra una perspectiva global de los cromatogramas obtenidos para este set de muestras, incluyendo el número de fragmentaciones generadas a lo largo del gradiente y la distribución de cargas de los iones precursores medidos. Como se puede observar, para todas las muestras, entre 40 y 120 min ocurre la elución de la mayoría de los picos (Figura 15A) y esto coincide con una tendencia al máximo en el número de fragmentaciones por ciclo (Figura 15B). La distribución de estados de carga de los precursores (Figura 15C), con una mayor frecuencia de 2+ y 3+, es característica de un proceso de digestión tríptica adecuada <sup>171</sup>.

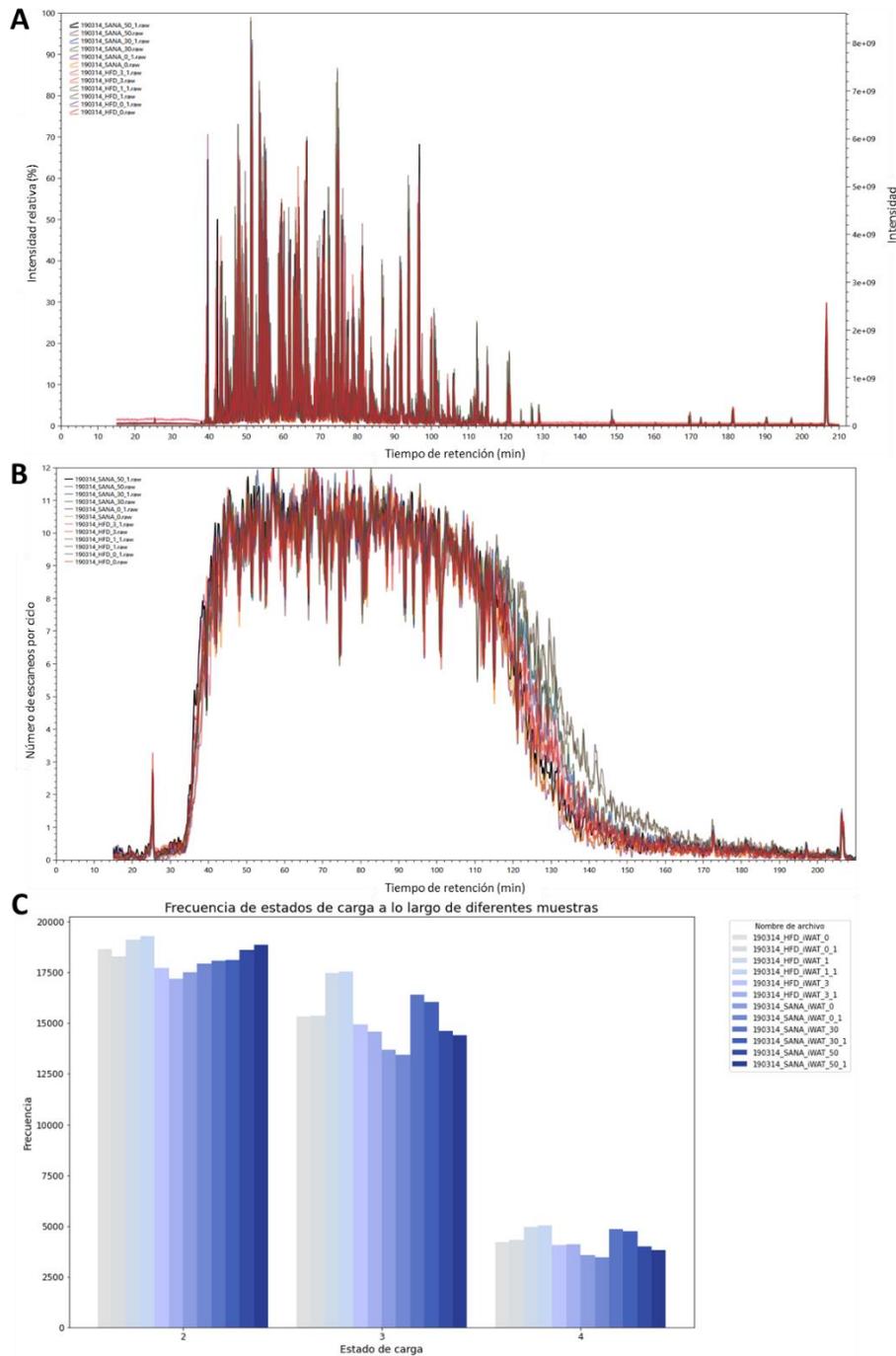


Figura 15. Análisis global de las corridas de nano HPLC/MS en el proteoma total de iWAT de ratones mantenidos en HFD, tratados o no con SANA. **A**: superposición de cromatogramas obtenido con la herramienta RawVegetable (<http://patternlabforproteomics.org/rawvegetable/>) de la plataforma Patternlab for Proteomics. **B**: número de escaneos por ciclo de adquisición a lo largo del gradiente de separación. El gráfico se obtuvo con la herramienta RawVegetable. **C**: distribución de estados de carga (2+, 3+ y 4+) de los precursores fragmentados a lo largo de cada corrida. El gráfico se obtuvo con la herramienta RawMeat v2.1 para el análisis de archivos .raw de Thermo Scientific. Los códigos de colores indican los archivos crudos (.raw) de cada réplica de ambas condiciones biológicas.

Los espectros MS y MS/MS obtenidos se utilizaron para la identificación de los péptidos y los análisis cuantitativos a nivel de proteínas mediante el software PatternLab for Proteomics (PatternLab). Cerca de 3000 proteínas fueron identificadas a lo largo del total de 6 réplicas biológicas entre las dos condiciones. El análisis proteómico cuantitativo libre de marcaje en iWAT de ratones reveló un cambio consistente en el patrón de expresión de proteínas entre ratones obesos y ratones obesos tratados con SANA (Figura 16), representado en un mapa de calor de clústeres de proteínas según su distribución de intensidad a lo largo de las réplicas de cada condición generado con el módulo Clustergram del programa PatternLab. En cuanto a la calidad de los datos generados, se constató que la distribución general de estos era similar entre las réplicas biológicas del mismo grupo experimental.

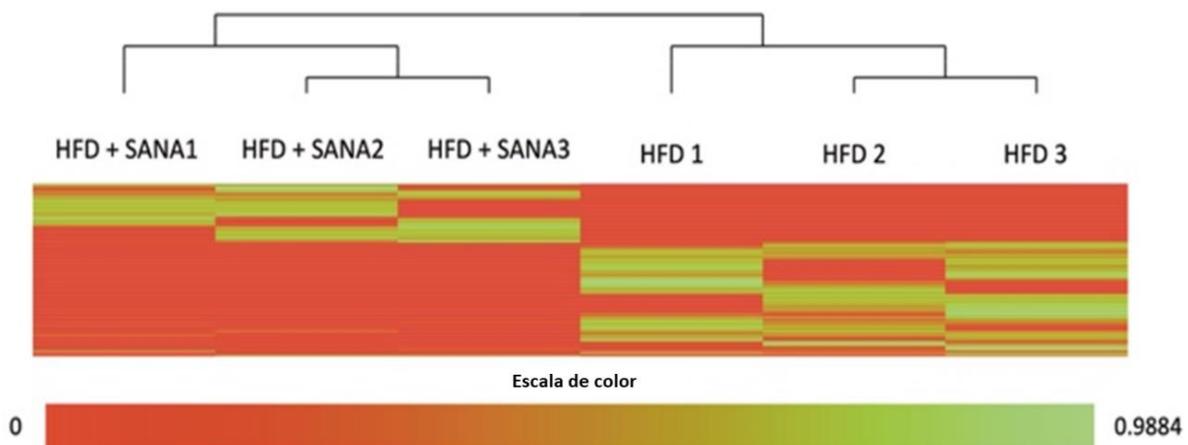


Figura 16. Gráfico de calor del proteoma total de iWAT de ratones alimentados con HFD tratados o no con SANA. El gráfico fue generado con la herramienta Clustergram del software Patternlab aplicando agrupamiento jerárquico a los perfiles proteómicos de ambas condiciones biológicas. Cada fila corresponde a una proteína individual y las columnas a las réplicas biológicas de cada condición. El color degradado indica la abundancia relativa de 0 (rojo) a 1 (verde).

Además, se realizaron análisis cuantitativos para comparar ambas condiciones biológicas mediante dos módulos del Patternlab que permiten determinar de forma estadísticamente significativa las proteínas exclusivamente detectadas (diagrama de Venn) y las proteínas aumentadas (TFold) en cada condición. En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos con ambos módulos. Como se observa en la Figura 17A, 2815 proteínas resultaron comunes a las dos condiciones, mientras

que 37 y 51 proteínas se detectaron de forma exclusiva en las condiciones HFD y HFD+SANA respectivamente. Las proteínas presentes en ambas condiciones fueron analizadas cuantitativamente para detectar diferencias significativas en la abundancia relativa teniendo en cuenta el número de espectros (SC) asignados. De esta manera, 58 proteínas resultaron relativamente más abundantes en las muestras de los animales tratados con SANA y 36 proteínas se encontraron disminuidas en dicha condición. Los resultados se muestran como un gráfico de volcán donde el eje x representa el  $\text{Log}_2(\text{tasa de cambio})$  y el eje y el  $\text{Log}_2(\text{valor } p_{\text{ajustado}})$  (Figura 17B). Las proteínas detectadas únicamente en HFD o HFD+SANA, así como aquellas diferencialmente abundantes entre condiciones se listan en los Anexos 2 y 3.

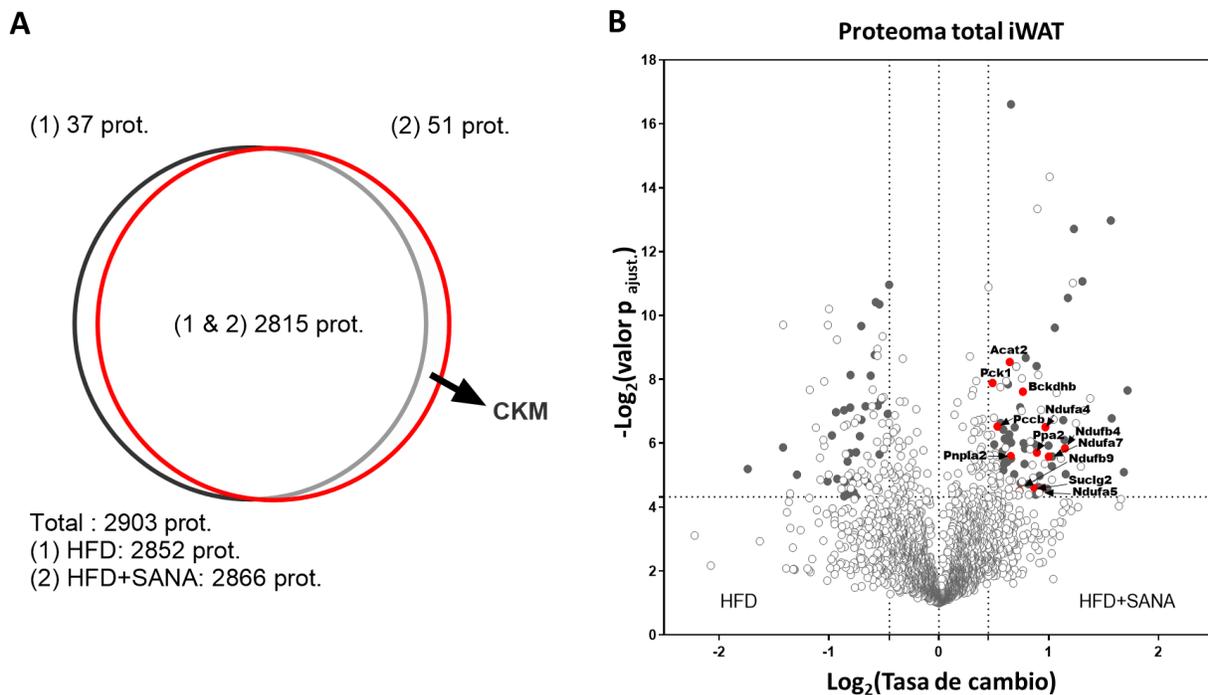


Figura 17. Análisis cuantitativos del proteoma total de iWAT de ratones alimentados con HFD tratados o no con SANA. **A:** Diagrama de Venn que indica las proteínas detectadas exclusivamente en cada condición (valor  $p < 0,05$ ). CKM: creatina quinasa tipo M. **B:** Gráfico de volcán que muestra las proteínas encontradas en ambas condiciones con abundancia estadísticamente diferencial (valor  $q_{\text{BH}} < 0,05$ ). Cada punto representa una proteína detectada en al menos 4 réplicas biológicas del total de 6 en ambas condiciones. Los puntos oscuros corresponden a proteínas estadísticamente diferenciales. En rojo se resaltan las proteínas diferencialmente aumentadas en la condición HFD+SANA, asociadas a los procesos biológicos: metabolismo del propanoato (propionato), del piruvato y la fosforilación oxidativa. Análisis estadístico para determinar las proteínas con abundancia relativa diferencial: pruebas

de t (una prueba por proteína) con ajuste para múltiples comparaciones por el método Benjamini–Hochberg (BH) con un umbral de q BH de 0.05.

En suma, 109 proteínas resultaron sobrerrepresentadas en la condición HFD+SANA. Esta lista fue utilizada para el análisis de enriquecimiento en procesos biológicos usando la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)<sup>172,173</sup> a través de la herramienta web de análisis de enriquecimiento funcional WebGestalt<sup>174,175</sup>. Los procesos biológicos enriquecidos en las muestras de los animales tratados con SANA se muestran en la Figura 18, destacándose vías relacionadas con el catabolismo (metabolismo del propanoato y metabolismo del piruvato) y la fosforilación oxidativa. A pesar de no ser uno de los procesos con tasa de enriquecimiento más elevada, otra de las vías estimuladas por SANA resultó ser la termogénesis con un valor de  $p=5,20E-07$  (Figura 18, Tabla 1). Resultados de nuestro grupo, obtenidos mediante estudios de respirometría, mostraron un aumento de la respiración mitocondrial en adipocitos aislados de los ratones tratados con SANA (ver manuscrito adjunto al capítulo), lo cual es coherente con el aumento observado en proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa a nivel del proteoma de iWAT.

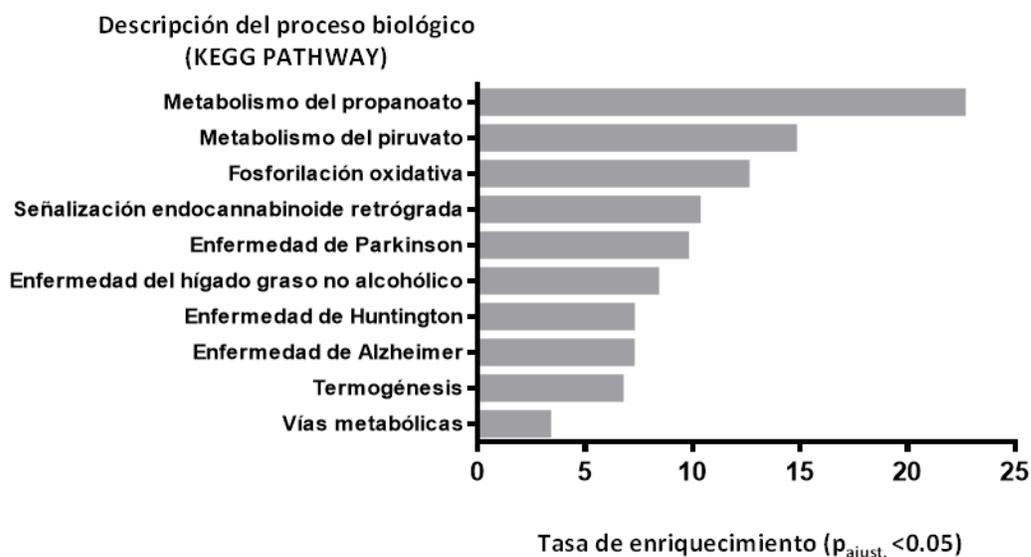


Figura 18. Análisis de sobrerrepresentación de procesos biológicos a partir de las proteínas aumentadas en el proteoma total de iWAT de ratones alimentados con HFD tratados con SANA. El análisis fue realizado mediante la herramienta WebGestalt<sup>174,175</sup>, usando la base de datos KEGG PATHWAYS y teniendo como referencia el genoma total de *Mus musculus*. Los valores de p para los procesos biológicos enriquecidos fueron ajustados por el método Benjamini–Hochberg (BH) para pruebas múltiples con un umbral de FDR de 0.05.

Tabla 1. Análisis de procesos biológicos a partir de las proteínas sobrerrepresentadas en el proteoma total de iWAT de ratones alimentados con HFD tratados con SANA. WebGestalt/KEGG PATHWAYS. Coincid.: coincidencias; enriq.: enriquecimiento.

Identificador del proceso biológico	Descripción	Tamaño	Coincid.	Valor esperado	Tasa de enriq.	Valor p	FDR
mmu00640	Metabolismo del propanoato	31	5	2.21E-01	2.26E+01	2.29E-06	9.17E-05
mmu00620	Metabolismo del piruvato	38	4	2.71E-01	1.48E+01	1.44E-04	4.61E-03
mmu00190	Fosforilación oxidativa	134	12	9.55E-01	1.26E+01	1.16E-10	1.86E-08
mmu04723	Señalización endocannabinoide retrógrada	150	11	1.07E+00	1.03E+01	6.37E-09	6.82E-07

mmu05012	Enfermedad de Parkinson	144	10	1.03E+00	9.74E+00	5.65E-08	4.53E-06
mmu04932	Enfermedad del hígado graso no alcohólico	151	9	1.08E+00	8.36E+00	1.02E-06	4.68E-05
mmu05016	Enfermedad de Huntington	194	10	1.38E+00	7.23E+00	9.21E-07	4.68E-05
mmu05010	Enfermedad de Alzheimer	175	9	1.25E+00	7.21E+00	3.49E-06	1.24E-04
mmu04714	Termogénesis	230	11	1.64E+00	6.71E+00	5.20E-07	3.34E-05
mmu01100	Vías metabólicas	1351	32	9.63E+00	3.32E+00	2.44E-11	7.83E-09

### 3.4.5. Análisis proteómico de mitocondrias enriquecidas a partir de tejido adiposo blanco inguinal (iWAT)

Dado que el análisis proteómico a nivel de tejido adiposo blanco total mostró un aumento en vías metabólicas que involucran mayormente a la mitocondria, a continuación, se amplió el análisis a mitocondrias aisladas de iWAT. Para eso las muestras de tejido adiposo blanco colectadas de los ratones mantenidos en HFD con o sin SANA, fueron disgregadas en solución tampón de homogeneización y sometidas a fraccionamiento subcelular mediante centrifugación diferencial. Las fracciones enriquecidas en mitocondrias fueron lisadas en solución tampón RIPA y el contenido proteico fue cuantificado por el método colorimétrico de Bradford. Para el análisis proteómico los extractos de proteínas mitocondriales fueron cargadas en una SDS-PAGE preparativa, previo a la digestión en gel de las proteínas. Los péptidos trípticos generados se midieron por nano HPLC/MS. En la Figura 19 se muestra una perspectiva global de los cromatogramas obtenidos para este set de muestras, incluyendo el número de fragmentaciones generadas a lo largo del gradiente y la distribución de cargas de los iones precursores medidos. Como se puede observar, entre 40 y 140 min ocurre la elución de la mayoría de los picos (Figura 19A) y esto coincide con una tendencia al máximo en el número de fragmentaciones por ciclo

(Figura 19B). La distribución de estados de carga de los precursores (Figura 19C), con una mayor frecuencia de 2+ y 3+, es característica de un proceso de digestión trípica adecuada <sup>171</sup>.

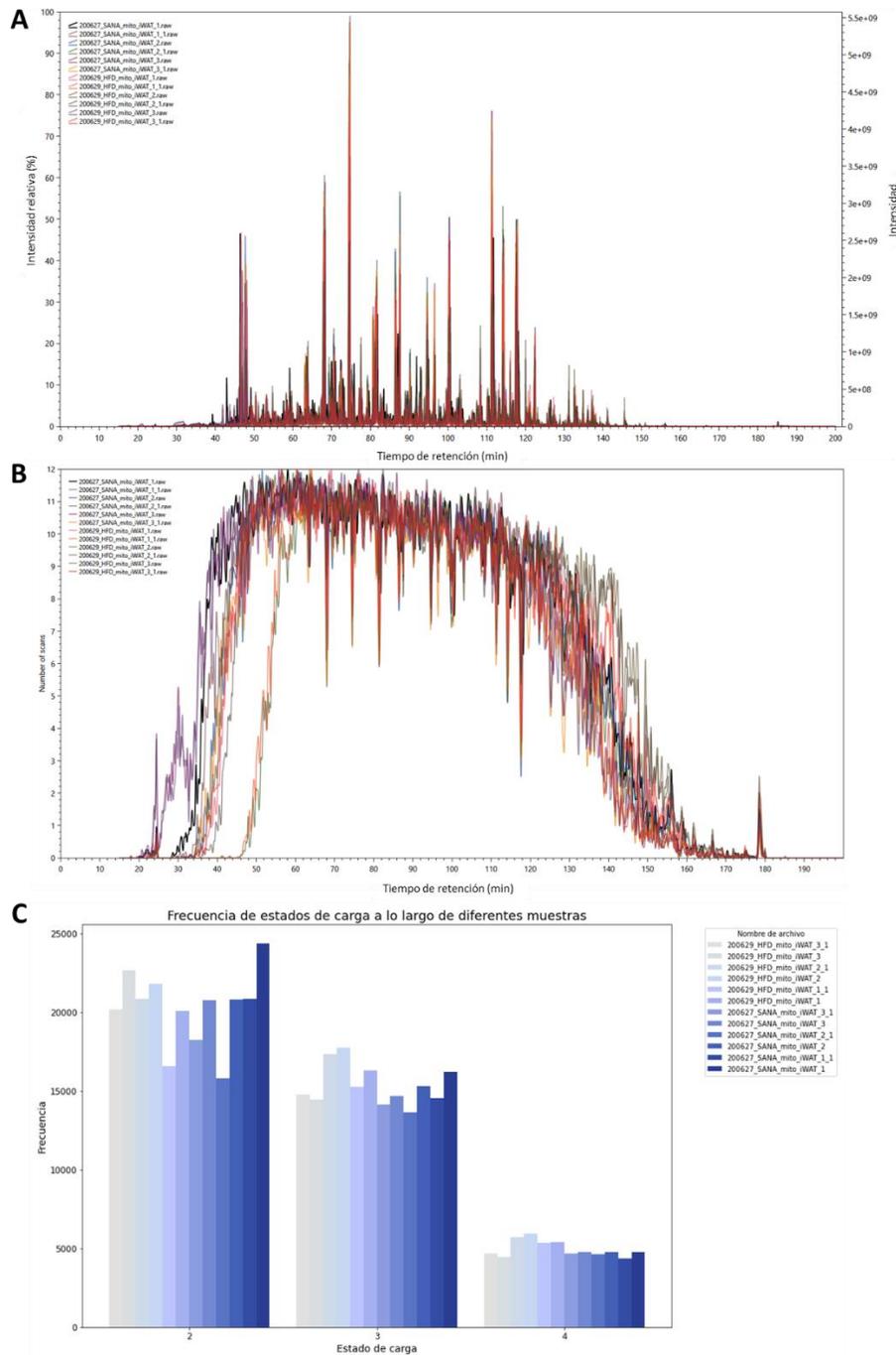


Figura 19. Análisis global de las corridas de nano HPLC/MS en el proteoma mitocondrial de iWAT de ratones mantenidos en HFD, tratados o no con SANA. **A:** superposición de cromatogramas obtenido con la herramienta RawVegetable (<http://patternlabforproteomics.org/rawvegetable/>) de la plataforma Patternlab for Proteomics. **B:** número de escaneos por ciclo de adquisición a lo largo del gradiente de separación. El gráfico se obtuvo con la herramienta RawVegetable. **C:** distribución de estados de carga (2+, 3+ y 4+) de los precursores fragmentados a lo largo de cada corrida. El gráfico se obtuvo con la herramienta RawMeat v2.1 para el análisis de archivos .raw de Thermo Scientific. Los códigos de colores indican los archivos crudos (.raw) de cada réplica de ambas condiciones biológicas.

Los espectros MS y MS/MS obtenidos fueron utilizados para la identificación de los péptidos y los análisis cuantitativos a nivel de proteínas mediante el software PatternLab. Se identificaron aproximadamente 2500 proteínas entre las dos condiciones biológicas.

Inicialmente se evaluaron los proteomas de ambas condiciones en cuanto al contenido de proteínas mitocondriales. Para esto se utilizó la información cuantitativa contenida en el proteoma respecto al factor de abundancia espectral normalizado (NSAF) de los marcadores de localización celular TOMM40 (membrana mitocondrial externa, MME), COX4I1 (membrana mitocondrial interna, MMI), MDH2 (matriz mitocondrial, MM) y GAPDH (citosol) entre ambas condiciones y con respecto a los extractos totales de iWAT. Los valores de NSAF ofrecen una medida de la abundancia relativa de las proteínas intra e intermuestra. La abundancia de estos marcadores ha sido usada anteriormente para evaluar el contenido mitocondrial en proteomas de origen humano<sup>176</sup>. No se observaron diferencias en los valores de NSAF de dichos marcadores entre las condiciones HFD y HFD+SANA en ninguno de los dos proteomas, total y mitocondrial. Mientras que para los tres marcadores mitocondriales se obtuvo un incremento significativo en el proteoma mitocondrial con respecto al total (Figura 20).

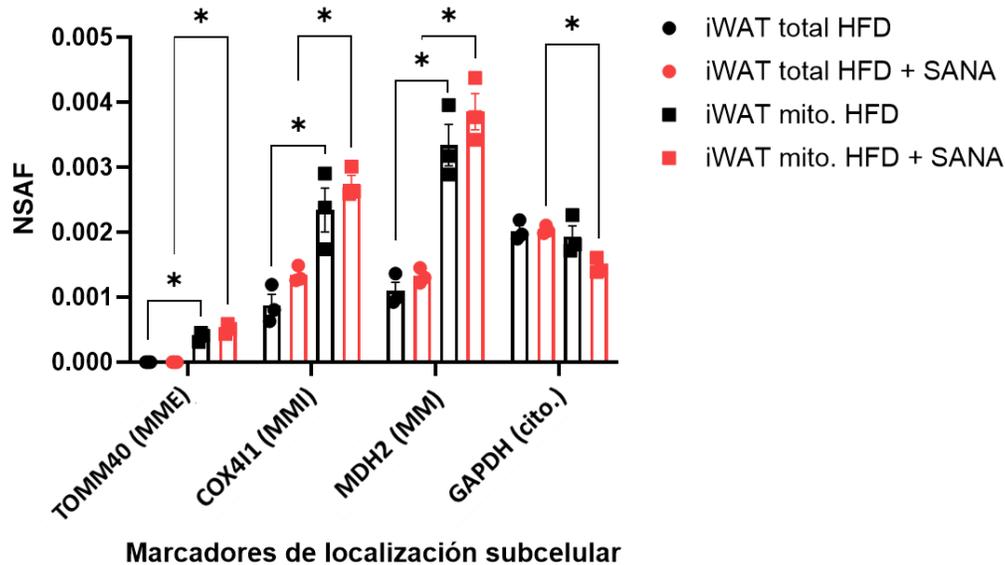


Figura 20. Análisis por LC/MS de la abundancia de marcadores de localización celular en los proteomas total y mitocondrial de iWAT.  $n = 3$  por condición biológica. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  SEM. Análisis estadístico: prueba de t no pareada de dos colas, significancia estadística  $p < 0.05$ . NSAF: factor de abundancia espectral normalizado. MME: membrana mitocondrial externa, MMI: membrana mitocondrial interna, MM: matriz mitocondrial.

El análisis global de agrupamiento o “clustering” de los proteomas mitocondriales de iWAT de ratones HFD y HFD+SANA se puede observar en el mapa de calor de la Figura 21. La comparación mostró un cambio marcado en el perfil de expresión de proteínas entre los tratamientos y una distribución de intensidad de las proteínas muy similar entre las réplicas biológicas de cada grupo experimental.

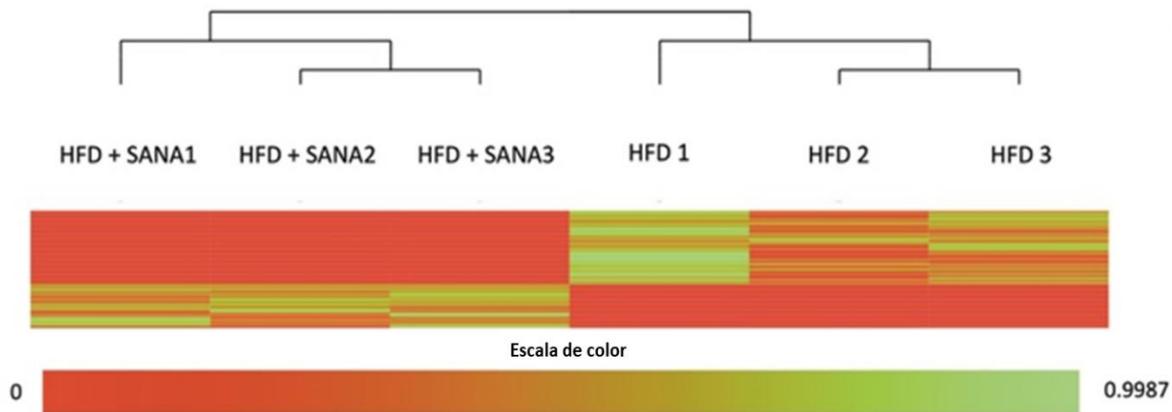


Figura 21. Gráfico de calor del proteoma mitocondrial de iWAT de ratones alimentados con HFD tratados o no con SANA. El gráfico fue generado con la herramienta Clustergram del software Patternlab aplicando agrupamiento jerárquico a los perfiles proteómicos de ambas condiciones biológicas. Cada fila corresponde a una proteína individual y las columnas a las réplicas biológicas de cada condición. El color degradado indica la abundancia relativa de 0 (rojo) a 1 (verde).

En la Figura 22 se muestran los resultados de los análisis diferenciales obtenidos con los módulos estadísticos diagrama de Venn y TFold de PatternLab. Como se observa en la Figura 22A, 2246 proteínas resultaron comunes a las dos condiciones, mientras que 128 y 118 proteínas se detectaron de forma exclusiva en las condiciones HFD y HFD+SANA respectivamente. El análisis cuantitativo de las proteínas comunes a ambas condiciones usando SC resultó en 262 proteínas con mayor abundancia relativa en las muestras de los animales tratados con SANA y 109 proteínas disminuidas en dicha condición. Los resultados se muestran como un gráfico de volcán donde el eje x representa el  $\text{Log}_2(\text{tasa de cambio})$  y el eje y el  $-\text{Log}_2(\text{valor } p_{\text{ajustado}})$  (Figura 22B). Las proteínas detectadas únicamente en HFD o HFD+SANA, así como aquellas diferencialmente abundantes entre condiciones, se listan en los Anexos 4 y 5.

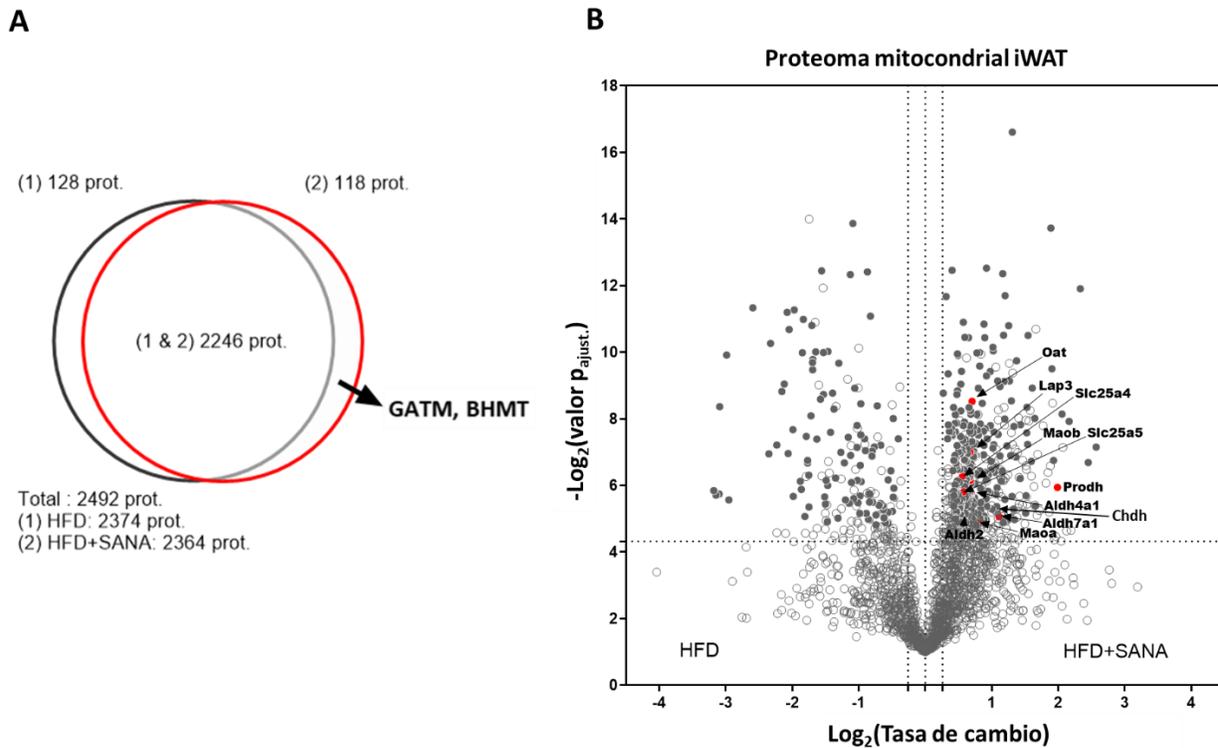


Figura 22. Análisis cuantitativos del proteoma mitocondrial de iWAT de ratones alimentados con HFD tratados o no con SANA. **A:** Diagrama de Venn que indica las proteínas detectadas exclusivamente en cada condición (valor  $p < 0,05$ ). GATM: glicina amidinotransferasa, mitocondrial, BHMT: betaína--homocisteína S-metiltransferasa 1. **B:** Gráfico de volcán que muestra las proteínas encontradas en ambas condiciones con abundancia estadísticamente diferencial (valor  $q_{BH} < 0,05$ ). Cada punto representa una proteína detectada en al menos 4 réplicas biológicas del total de 6 en ambas condiciones. Los puntos oscuros corresponden a proteínas estadísticamente diferenciales. En rojo se resaltan proteínas diferencialmente aumentadas en la condición HFD+SANA, asociadas a los procesos biológicos: metabolismo de arginina/creatina y prolina, y el de glicina, serina y treonina. OAT: ornitina aminotransferasa, mitocondrial, PRODH: prolina deshidrogenasa 1, mitocondrial, CHDH: colina deshidrogenasa, ALDH7A1: semialdehído alfa-aminoalifático deshidrogenasa.

En este caso, el perfil de proteínas diferenciales mostró un mayor cambio en el proteoma del tejido en respuesta al SANA, en cierto modo, sugiriendo una actividad preferencial del fármaco en procesos relacionados con la mitocondria. En total 380 proteínas resultaron estadísticamente sobrerrepresentadas en HFD+SANA (ver Anexos 4 y 5). El análisis de enriquecimiento en procesos biológicos basado en estas proteínas mostró que entre los procesos aumentados significativamente por SANA estaban el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), el metabolismo de arginina/creatina y prolina, la fosforilación oxidativa y la termogénesis (Figura 23; Tabla 2, Tabla 3 y

Tabla 4). Este patrón de vías metabólicas en un contexto de aumento del gasto energético, presumiblemente asociado a la termogénesis, resultó muy semejante al mostrado previamente por Kazak y colaboradores <sup>177</sup> en un modelo murino de termogénesis inducida por frío. En dicho trabajo se describe una vía termogénica dependiente de creatina alternativa a la clásica basada en la actividad de UCP1. La vía fue descrita inicialmente como una marca del tejido adiposo beige <sup>177</sup>, lo cual es consecuente con los cambios histológicos que detectamos en iWAT de los ratones tratados con el fármaco (ver figura 5b del manuscrito adjunto a este capítulo). Curiosamente, entre las proteínas detectadas de forma exclusiva en las mitocondrias de ratones tratados con SANA estaba la glicina amidinotransferasa (GATM) (Figura 22A), proteína responsable del paso limitante en la velocidad de la síntesis de creatina. Alineado con esto ya habíamos encontrado, a nivel del proteoma total, a la creatina quinasa M (CKM) como una de las proteínas exclusivas del tratamiento con SANA (Figura 17A). Si bien no hay evidencias de que CKM participe en la termogénesis dependiente de creatina, el aumento significativo en su expresión puede ser indicativo de un efecto del SANA en el metabolismo de la creatina y de hecho este hallazgo resultó una pista clave para comenzar a generar una hipótesis conectando al SANA con dicha vía.

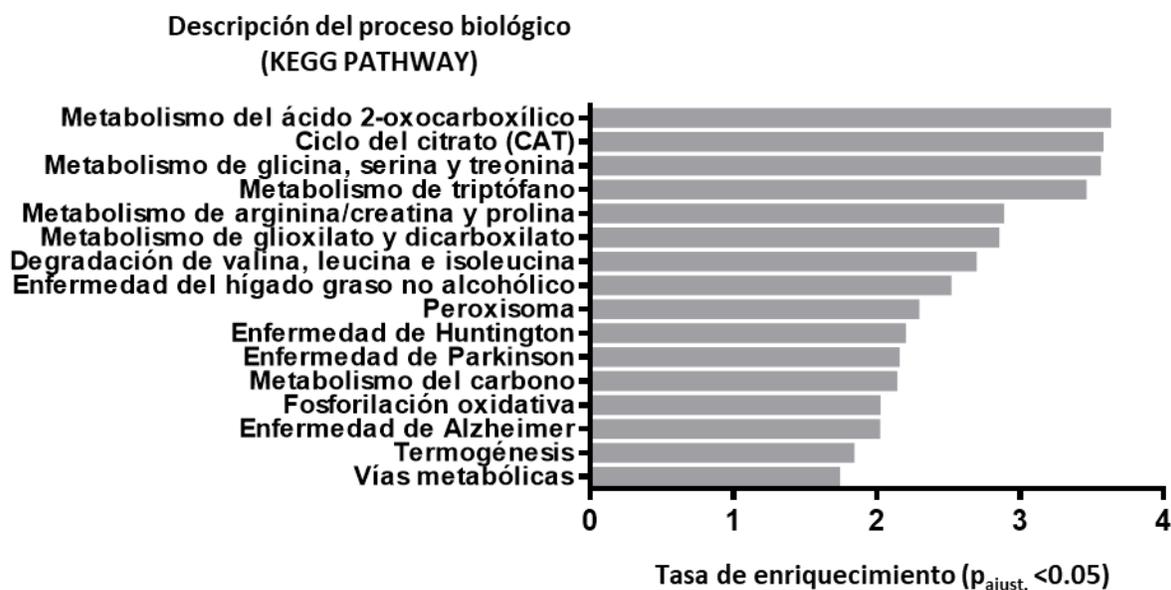


Figura 23. Análisis de procesos biológicos a partir de las proteínas sobrerrepresentadas en el proteoma mitocondrial de iWAT de ratones alimentados con HFD tratados con SANA. El análisis fue realizado mediante la herramienta WebGestalt <sup>174,175</sup>, usando la base de datos KEGG PATHWAYS y teniendo como referencia la lista total de proteínas identificadas en los extractos mitocondriales de iWAT. Los valores de p para los procesos biológicos enriquecidos fueron ajustados por el método Benjamini–Hochberg (BH) para pruebas múltiples con un umbral de FDR de 0.05.

Tabla 2. Análisis de procesos biológicos a partir de las proteínas sobrerrepresentadas en el proteoma mitocondrial de iWAT de ratones alimentados con HFD+SANA. WebGestalt/KEGG PATHWAYS. Coincid.: coincidencias; enriq.: enriquecimiento.

Identificador del proceso biológico	Descripción	Tamaño	Coincid.	Valor esperado	Tasa de enriq.	Valor p	FDR
mmu01210	Metabolismo del ácido 2-oxocarboxílico	10	6	1.66E+00	3.62E+00	2.25E-03	3.84E-02
mmu00020	Ciclo del citrato (CAT)	22	13	3.64E+00	3.57E+00	6.09E-06	3.12E-04
mmu00260	Metabolismo de glicina, serina y treonina	17	10	2.82E+00	3.55E+00	8.39E-05	2.40E-03
mmu00380	Metabolismo de triptófano	14	8	2.32E+00	3.45E+00	6.03E-04	1.29E-02
mmu00330	Metabolismo de arginina/creatina y prolina	21	10	3.48E+00	2.87E+00	8.20E-04	1.62E-02
mmu00630	Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato	17	8	2.82E+00	2.84E+00	3.10E-03	4.96E-02
mmu00280	Degradación de valina, leucina e isoleucina	36	16	5.96E+00	2.68E+00	5.99E-05	2.40E-03
mmu04932	Enfermedad del hígado graso no alcohólico	65	27	1.08E+01	2.51E+00	7.14E-07	9.14E-05
mmu04146	Peroxisoma	37	14	6.13E+00	2.28E+00	1.30E-03	2.38E-02
mmu05016	Enfermedad de Huntington	91	33	1.51E+01	2.19E+00	1.58E-06	1.35E-04
mmu05012	Enfermedad de Parkinson	90	32	1.49E+01	2.15E+00	3.89E-06	2.49E-04
mmu01200	Metabolismo del carbono	68	24	1.13E+01	2.13E+00	8.51E-05	2.40E-03
mmu00190	Fosforilación oxidativa	81	27	1.34E+01	2.01E+00	9.38E-05	2.40E-03

mmu05010	Enfermedad de Alzheimer	81	27	1.34E+01	2.01E+00	9.38E-05	2.40E-03
mmu04714	Termogénesis	102	31	1.69E+01	1.83E+00	1.99E-04	4.62E-03
mmu01100	Vías metabólicas	355	102	5.88E+01	1.73E+00	8.77E-13	2.25E-10

Tabla 3. Proteínas de la ruta metabólica de arginina/creatina y prolina sobrerrepresentadas en HFD+SANA mediante análisis proteómico. Identif.: Identificador; norm.: normalizada. \* Detectada exclusivamente en la condición HFD+SANA utilizando el módulo Diagrama de Venn de PatternLab con  $p < 0,05$ .

Metabolismo de arginina/creatina y prolina						
Identif. UniProt	Descripción	Gen	Señal promedio norm. HFD+SANA	Señal promedio norm. HFD	Tasa de cambio HFD+SANA /HFD	Valor p
Q9WU79	Proline dehydrogenase 1, mitochondrial	Prodh	7.53E-04	1.90E-04	3.96	1.63E-02
Q9DBF1	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	Aldh7a1	6.01E-04	2.78E-04	2.16	3.01E-02
Q64133	Amine oxidase [flavin-containing] A	Maoa	9.06E-04	5.21E-04	1.74	3.46E-02
P29758	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	Oat	1.48E-03	9.09E-04	1.63	2.72E-03
Q8CHT0	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	Aldh4a1	1.00E-03	6.22E-04	1.61	1.85E-02
Q8BW75	Amine oxidase [flavin-containing] B	Maob	1.37E-03	8.57E-04	1.60	1.40E-02
Q9CPY7	Cytosol aminopeptidase	Lap3	1.01E-03	6.36E-04	1.59	7.83E-03
P47738	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	Aldh2	3.89E-03	2.68E-03	1.45	2.89E-02
P26443	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Glud1	2.77E-03	2.15E-03	1.28	5.07E-03
Q9DCU9	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase, mitochondrial	Hoga1	6.86E-05	ND	NA	*

Q9D964	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	Gatm	3.81E-05	ND	NA	*
--------	---	------	----------	----	----	---

Tabla 4. Proteínas de la ruta metabólica de glicina, serina y treonina sobrerrepresentadas en HFD+SANA mediante análisis proteómico. Identif.: Identificador; norm.: normalizada. \* Detectada exclusivamente en la condición HFD+SANA utilizando el módulo Diagrama de Venn de PatternLab con  $p < 0,05$ .

Metabolismo de glicina, serina y treonina						
Identif. UniProt	Descripción	Gen	Señal promedio norm. HFD+SANA	Señal promedio norm. HFD	Tasa de cambio HFD+SANA /HFD	Valor p
Q9DBF1	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	Aldh7a1	6.01E-04	2.78E-04	2.16	3.01E-02
Q99LB7	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial	Sardh	1.00E-03	4.73E-04	2.12	2.54E-02
Q8BJ64	Choline dehydrogenase, mitochondrial	Chdh	1.33E-03	6.26E-04	2.12	2.52E-02
Q91Z53	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	Grhpr	4.26E-04	2.26E-04	1.88	3.17E-02
Q64133	Amine oxidase [flavin-containing] A	Maoa	9.06E-04	5.21E-04	1.74	3.46E-02
Q8BW75	Amine oxidase [flavin-containing] B	Maob	1.37E-03	8.57E-04	1.60	1.40E-02
O70423	Membrane primary amine oxidase	Aoc3	3.86E-03	3.06E-03	1.26	5.93E-03
O35490	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	Bhmt	1.07E-04	ND	NA	*
O88986	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, mitochondrial	Gcat	3.81E-05	ND	NA	*
Q9D964	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	Gatm	3.81E-05	ND	NA	*

### **3.4.6. Validación del mecanismo propuesto como responsable de los efectos metabólicos del SANA**

Con el objetivo de confirmar nuestras observaciones en relación a la firma metabólica de termogénesis dependiente de creatina mencionada anteriormente <sup>177</sup>, se realizaron análisis cuantitativos de metabolitos por LC-MS/MS a partir de extractos de iWAT de animales en HFD tratados o no con SANA. Estos análisis se realizaron en colaboración con el Dr. Eric Kelley en la Universidad de West Virginia. Para los análisis, los metabolitos se obtuvieron de la fase acuosa de una mezcla fría de agua, metanol y cloroformo en proporciones iguales. En la Figura 24 se muestran los valores de cuantificación de los principales metabolitos relacionados con el metabolismo de creatina normalizados por la cantidad de tejido expresado como peso húmedo. En el caso de la creatina, fosfocreatina, metionina, betaína y arginina se constató un aumento significativo producto del tratamiento con SANA. Mientras que la ornitina, prolina y glicina tuvieron una tendencia al alza, pero no resultó significativa. En el caso de los niveles de glucosa la tendencia fue hacia la disminución en el iWAT de los ratones HFD+SANA.

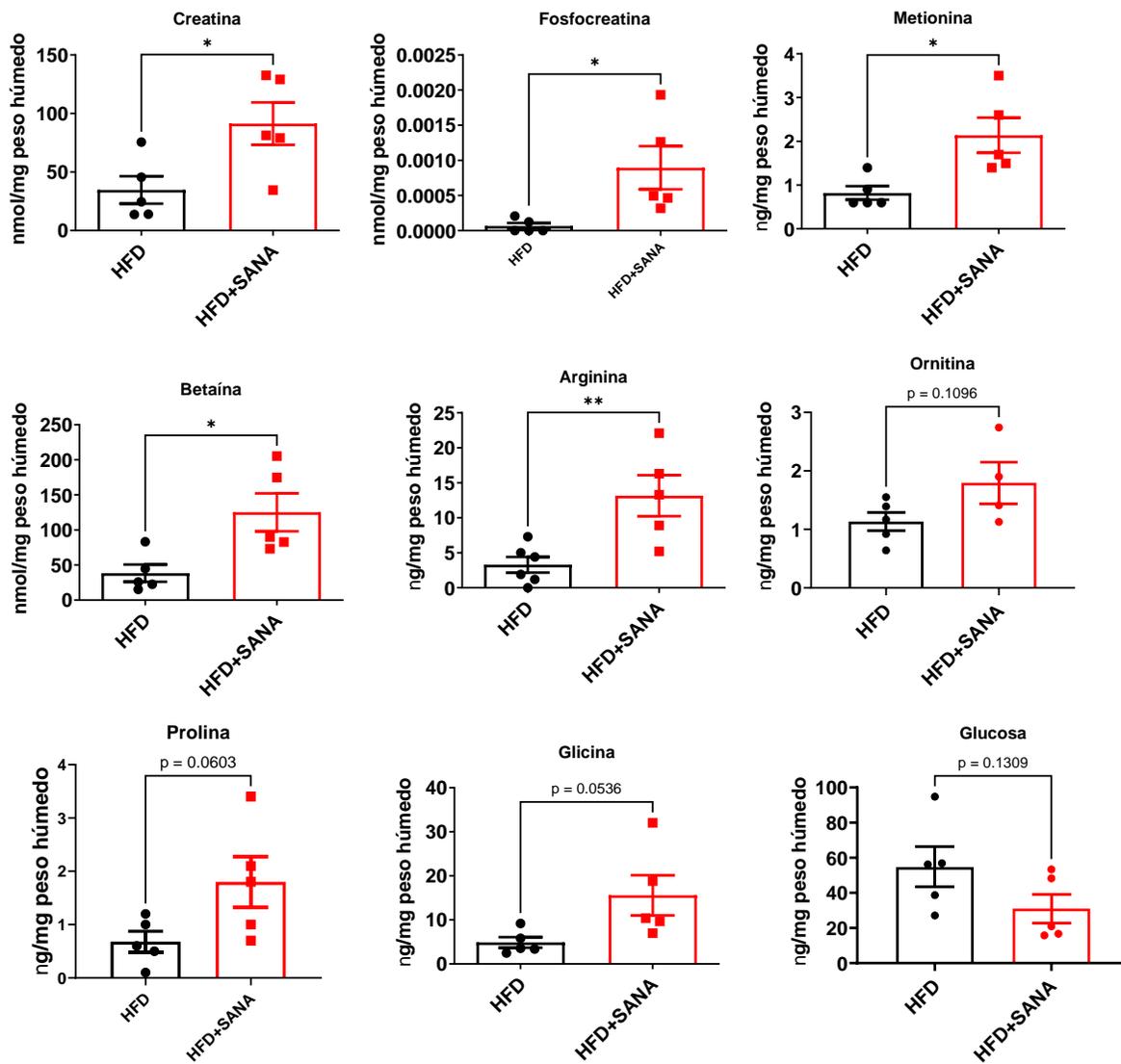


Figura 24. Análisis por LC/MS de metabolitos en iWAT de animales alimentados con dieta rica en grasa tratados o no con SANA.  $n = 4-6$  por condición. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  SEM. Análisis estadísticos: prueba de t no pareada de dos colas. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

En concordancia con la sobrerrepresentación de CKM y GATM (Figuras 15A y 19A) detectada en los proteomas de tejido adiposo subcutáneo total y mitocondrial de animales en HFD tratados con SANA, y el aumento de metabolitos relacionados al metabolismo de la creatina, se encontró un aumento significativo en los niveles de expresión génica de marcadores termogénicos (Figura

25). Los genes termogénicos Prdm16 y Pgc1 $\alpha$  fueron regulados al alza por SANA. Al igual que Ckm y Ckmt1, otros genes involucrados en el metabolismo, transporte y síntesis de creatina, incluyendo Ant1, Gatm, Oat, Prodh y Crt aumentaron sus niveles de expresión a causa del tratamiento con SANA. Un efecto contrario se observó en el caso de Ucp1, lo cual es consistente con la regulación compensatoria entre UCP1 y la bioenergética dependiente de creatina observada por Kazak y colaboradores <sup>177</sup> en ratones y humanos. CKB y ALPL o TNAP, recientemente postuladas como reguladores de la termogénesis dependiente de creatina <sup>32,33</sup>, no resultaron cambiados en respuesta al SANA.

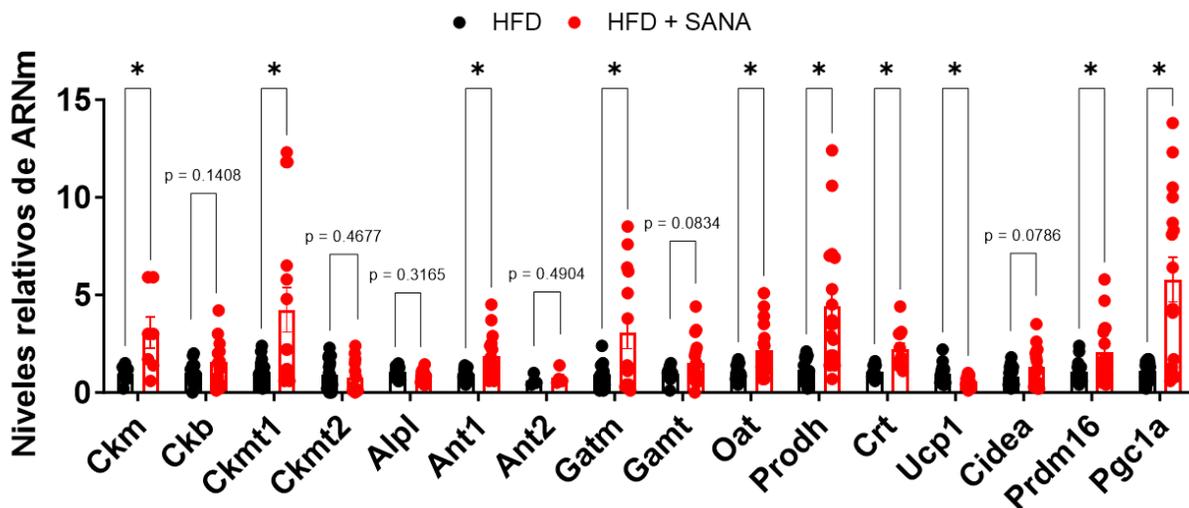


Figura 25. Expresión de marcadores de termogénesis por qPCR en iWAT de ratones alimentados con HFD o HFD+SANA (400 mg/kg/día, PO). n = 4-20 por condición. Ckm: creatina quinasa tipo m; Ckb: creatina quinasa tipo b; Ckmt1: creatina quinasa tipo U, mitocondrial; Ckmt2: creatina quinasa tipo S, mitocondrial; Alpl: fosfatasa alcalina, isoenzima no específica de tejido; Ant1: ADP/ATP translocasa 1; Ant2: ADP/ATP translocasa 2; Gatm; glicina amidinotransferasa, mitocondrial; Gamt: guanidinoacetato N-metiltransferasa; Oat: ornitina aminotransferasa, mitocondrial; Prodh: prolina deshidrogenasa 1, mitocondrial; Crt: transportador de creatina; Ucp1: proteína desacoplante 1; Cidea: lípido transferasa CIDEA; Prdm16: histona-lisina N-metiltransferasa PRDM16; Pgc1a: PGC-1-alpha. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  SEM. Análisis estadístico: prueba de t no pareada de dos colas. \* p < 0.05.

Mediante análisis por western blot de mitocondrias aisladas de iWAT (Figura 26) se corroboró que la enzima CKMT1, originalmente propuesta como la creatina quinasa clave de la termogénesis dependiente de creatina en el tejido adiposo beige <sup>177</sup>, estaba aumentada en respuesta a SANA. La

isoenzima CKMT2 y UCP1 no mostraron cambios a nivel de proteína. A diferencia de lo observado en cuanto a Ckmt2 a nivel de ARNm y proteína en el tejido adiposo blanco/beige de los animales HFD+SANA, en el tejido marrón (BAT) la expresión de esta isoforma aumentó considerablemente (ver figura 5F del manuscrito adjunto al capítulo).

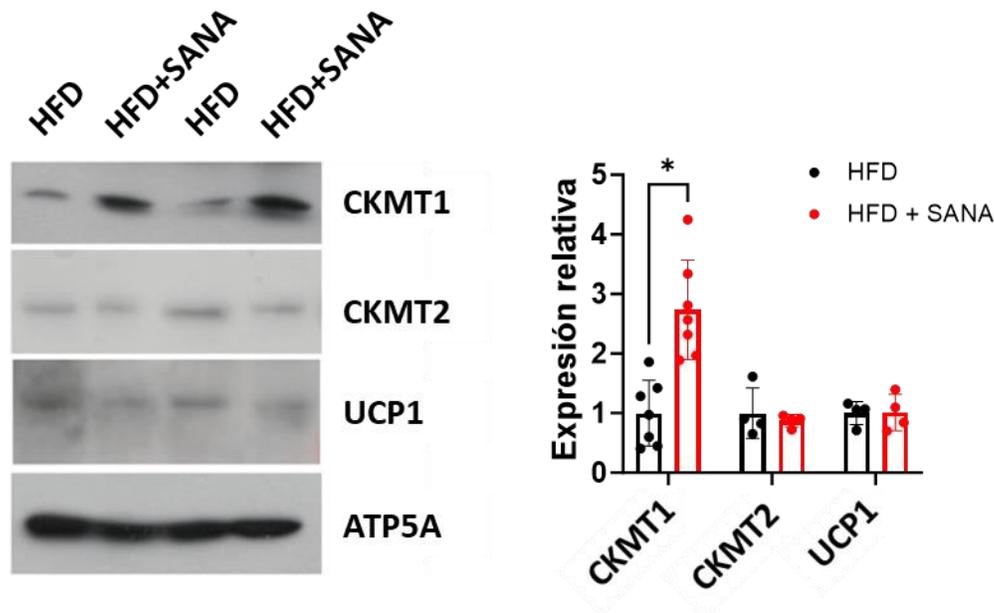


Figura 26. Análisis por WB de la expresión de las proteínas CKMT1, CKMT2 y UCP1 en mitocondrias aisladas de iWAT de ratones alimentados con HFD o HFD+SANA (400 mg/kg/día, PO). Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  SEM. Análisis estadístico: Prueba de t no pareada de dos colas.

Con la finalidad de confirmar *in vivo* los efectos termogénicos producidos por el SANA, se midió la temperatura corporal de los animales. Las imágenes obtenidas por termografía infrarroja de animales mantenidos en HFD mostraron un aumento de la temperatura corporal superficial en la región del lomo y también en el espacio interescapular (correspondiente al tejido adiposo marrón) en los ratones tratados con SANA (Figura 27A).

Posteriormente, mediante un modelo de respuesta al frío se buscó comprobar la dependencia del efecto termogénico del SANA con la creatina. Con ese fin, ratones en dieta normal previamente aclimatados a 22 °C fueron tratados con ácido  $\beta$ -guanidinopropiónico ( $\beta$ -GPA) (0,4 g/kg en PBS pH 7,5, IP)<sup>178</sup> en combinación o no con SANA (20 mg/kg/día, SC) por 5 días antes de ser sometidos a frío (4 °C). El  $\beta$ -GPA es un análogo de la creatina capaz de inhibir su transporte y como resultado reducir los niveles celulares de esta<sup>177</sup>. El tratamiento con  $\beta$ -GPA se realizó de

forma aguda debido a que la exposición crónica puede inducir pérdida de peso<sup>177,178</sup>. Los valores de temperatura corporal central fueron obtenidos con una sonda rectal cada 1 h por períodos de 6 h antes y después de la exposición al frío. El tratamiento con  $\beta$ -GPA revirtió el efecto del SANA sobre la respuesta termogénica, confirmando que la creatina es necesaria para que ejerza dicho efecto (Figura 27B). Este experimento fue realizado por Karina Cal en el marco de su tesis de doctorado.

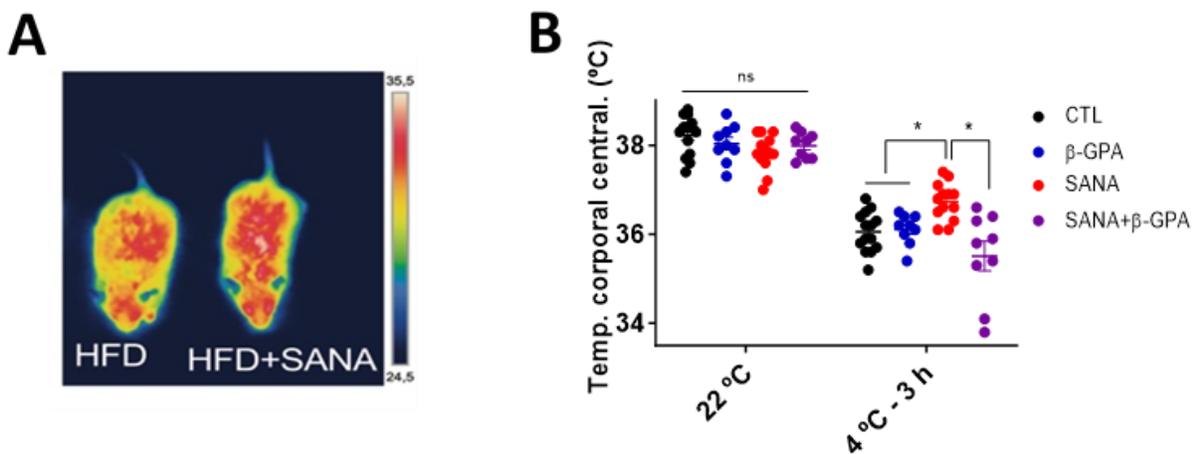


Figura 27. Confirmación in vivo del efecto del SANA sobre la temperatura corporal en ratones sometidos a dieta rica en grasa (A) y en un modelo de repuesta al frío (B). **A:** Imagen térmica representativa obtenida por termografía infrarroja de ratones alimentados con HFD o HFD+SANA (400 mg/kg/día, PO). **B:** Medidas de temperatura corporal central obtenidas usando una sonda rectal. Los ratones fueron alimentados con dieta normal y mantenidos a 22 °C previo al tratamiento con ácido  $\beta$ -guanidinopropiónico ( $\beta$ -GPA) (0,4 g/kg en PBS pH 7,5, IP) en combinación o no con SANA (20 mg/kg/día, SC) por 5 días antes de ser sometidos a frío (4 °C). Los valores de temperatura fueron obtenidos cada 1 h por períodos de 6 h antes y después de la exposición al frío. n = 9-14 por condición. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  SEM. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. \* p < 0.05.

### 3.4.7. Análisis de los niveles de expresión de marcas moleculares del metabolismo de un carbono vinculadas a la síntesis de creatina

Junto con marcadores del metabolismo de creatina y del ciclo fútil de fosforilación/desfosforilación de este metabolito, el grupo de Bruce M. Spiegelman<sup>177</sup> mostró que la fosfoetanolamina/fosfocolina fosfatasa (PHOSPHO1, UniProt: Q8R2H9) es un regulador del

metabolismo oxidativo en adipocitos y sigue un patrón de expresión recíproco con UCP1, apuntando a su rol en la termogénesis independiente de UCP1.

Teniendo en cuenta el conocimiento previo sobre el rol de PHOSPHO1 en el metabolismo energético<sup>177,179-181</sup>, y dado que el tratamiento con SANA provocó la activación de la vía termogénica dependiente de creatina y la disminución de UCP1 a nivel de expresión de ARNm, comprobamos los niveles de expresión de esta fosfatasa en el tejido adiposo de los animales sometidos a dieta rica en grasa con o sin SANA. Mientras que PHOSPHO1 no pudo ser identificada por espectrometría de masa, sí la encontramos aumentada significativamente en la condición HFD+SANA a nivel de ARNm (Figura 28). Este aumento en la expresión de Phospho1, sumado a su conocida baja actividad fosfatasa ante PCr<sup>177</sup>, sugiere que vías que involucran a mejores sustratos de Phospho1 como fosfoetanolamina y fosfocolina<sup>182</sup> podrían estar aumentadas concomitantemente con la termogénesis dependiente de creatina. En esta línea, el análisis del proteoma mitocondrial de iWAT mostró que la colina deshidrogenasa (CHDH, UniProt: Q8BJ64), la semialdehído alfa-aminoadípico deshidrogenasa (ALDH7A1, UniProt: Q9DBF1) y la betaína--homocisteína S-metiltransferasa 1 (BHMT, UniProt: O35490) estaban sobrerrepresentadas producto del tratamiento con SANA (Anexos 4 y 5). Estas tres enzimas forman parte de las reacciones del metabolismo de un carbono (1C) por las cuales se obtiene metionina a partir de colina<sup>183</sup>. El aumento en los niveles de expresión de Chdh, Aldh7a1 y Bhmt (pero no su isoforma Bhmt2) también fue comprobado a nivel de ARNm (Figura 28).

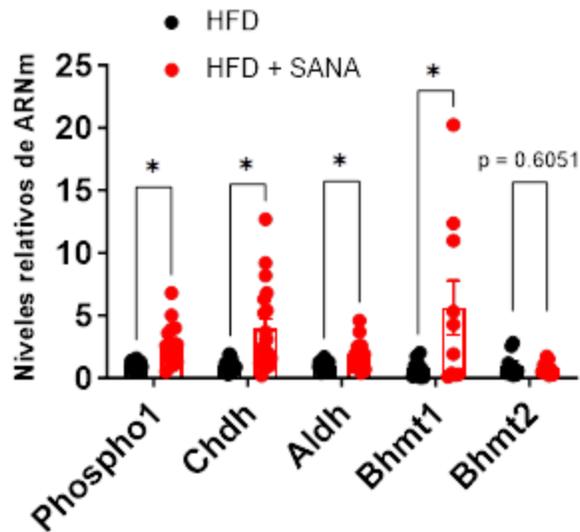


Figura 28. Expresión de marcadores del metabolismo de colina y betaína por qPCR en iWAT de ratones alimentados con HFD o HFD+SANA (400 mg/kg/día, PO). n = 9-19 por condición. Phospho1: fosfoetanolamina/fosfocolina fosfatasa; Chdh: colina deshidrogenasa, mitocondrial; semialdehído alfa-aminoalípico deshidrogenasa (Aldh, 18); Bhmt1: betaína--homocisteína S-metiltransferasa 1; Bhmt2: betaína--homocisteína S-metiltransferasa 2. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  SEM. Análisis estadístico: prueba de t no pareada de dos colas. \* p < 0.05.

En suma, la sobreexpresión de genes/proteínas de vías relacionadas con el metabolismo de arginina/creatina y prolina (

Tabla 3) y el de glicina, serina y treonina (

Tabla 4) permitió proponer un modelo de mecanismo por el cual el SANA estaría potenciando el metabolismo de creatina como sustento de un ciclo de fosforilación/fosforilación de este metabolito (Figura 29).

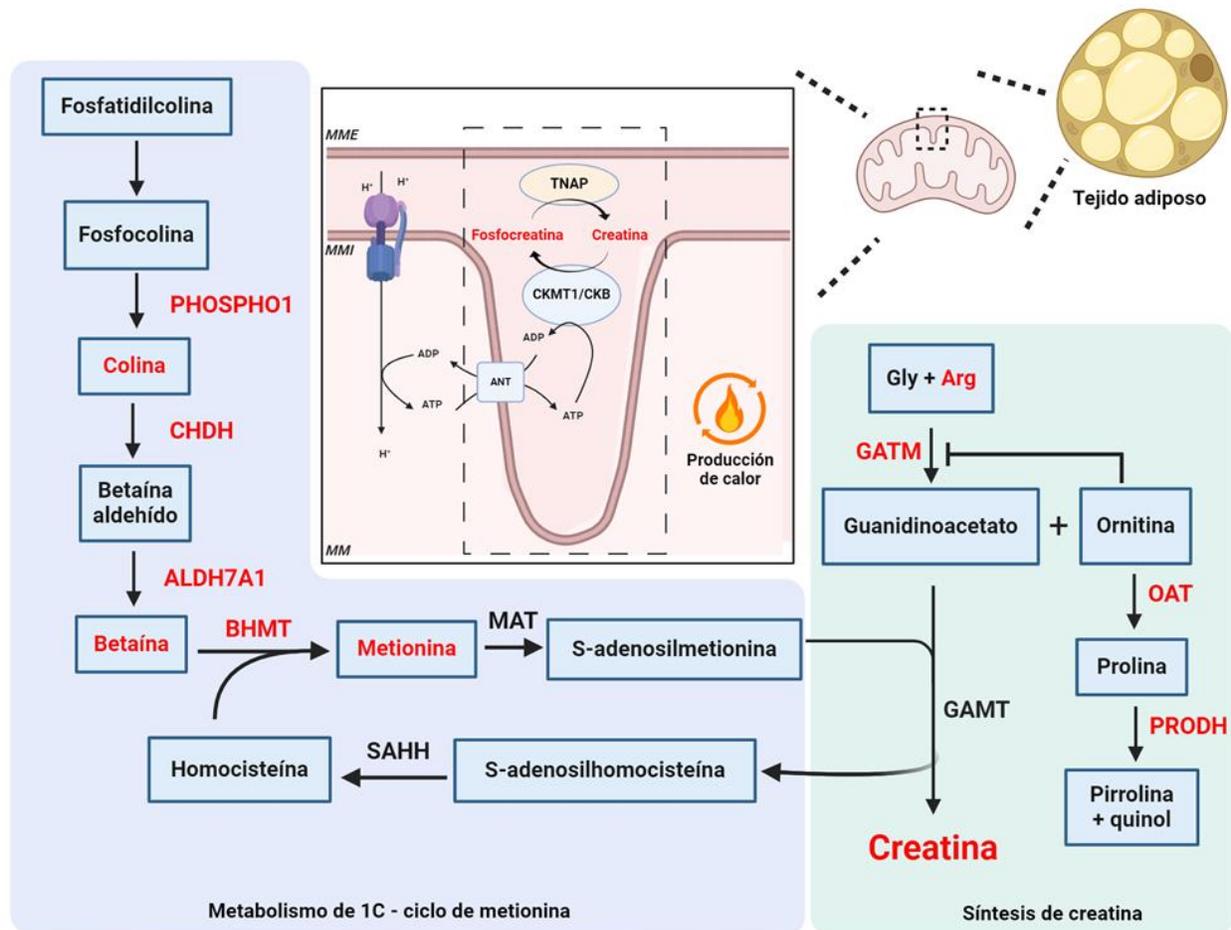


Figura 29. Representación esquemática de la vía termogénica dependiente de creatina impulsada por el SANA en el tejido adiposo. Sombreado en azul y verde se muestran las rutas simplificadas del metabolismo de un carbono (1C) y de la síntesis de creatina, respectivamente. Las enzimas y metabolitos resaltados en rojo muestran los elementos de la vía regulados positivamente por el SANA de acuerdo con resultados obtenidos mediante proteómica, qPCR y análisis de metabolitos por LC-MS/MS. PHOSPHO1: fosfoetanolamina/fosfocolina fosfatasa; CHDH: colina deshidrogenasa, mitocondrial; ALDH7A1: semialdehído alfa-aminoadípico deshidrogenasa; BHMT: betaína--homocisteína S-metiltransferasa 1; MAT: S-adenosilmetionina sintasa; SAHH: adenosilhomocisteinasa; GATM: glicina amidinotransferasa mitocondrial; GAMT: guanidinoacetato N-metiltransferasa; OAT: ornitina aminotransferasa mitocondrial; PRODH: prolina deshidrogenasa; TNAP: fosfatasa alcalina, isoenzima tisular inespecífica; CKMT1: creatina quinasa mitocondrial 1; CKB: creatina quinasa B; ANT: ADP/ATP translocasa; MME: membrana mitocondrial externa; MMI: membrana mitocondrial interna; MM: matriz mitocondrial. La figura fue creada usando BioRender.

Buscando profundizar en el rol del metabolismo de 1C en la termogénesis dependiente de creatina fue utilizado un modelo de respuesta al frío, una estrategia común en el estudio de la fisiología de este proceso. Para eso, dos grupos de ratones fueron mantenidos a 22 °C o 4 °C durante 48 hs y al terminar este período se tomaron muestras de iWAT y BAT y se realizaron análisis de expresión

de génica por qPCR. De manera similar a lo obtenido con el modelo de DIO producto del tratamiento con SANA, hubo un aumento significativo en los niveles de expresión de genes de la vía de producción de betaína a partir de fosfocolina (Figura 30, paneles superiores), concomitantemente con la regulación positiva de la termogénesis dependiente de creatina (Figura 30 paneles inferiores) tanto en iWAT como en BAT. De manera similar a lo que se observó a causa del tratamiento con SANA (Figura 25, iWAT y Figura 5F del manuscrito adjunto a este capítulo, BAT), la exposición al frío provocó el aumento de más de una creatina quinasa simultáneamente, lo cual sugiere que puede haber cierta redundancia entre las quinasas que participan en esta vía.

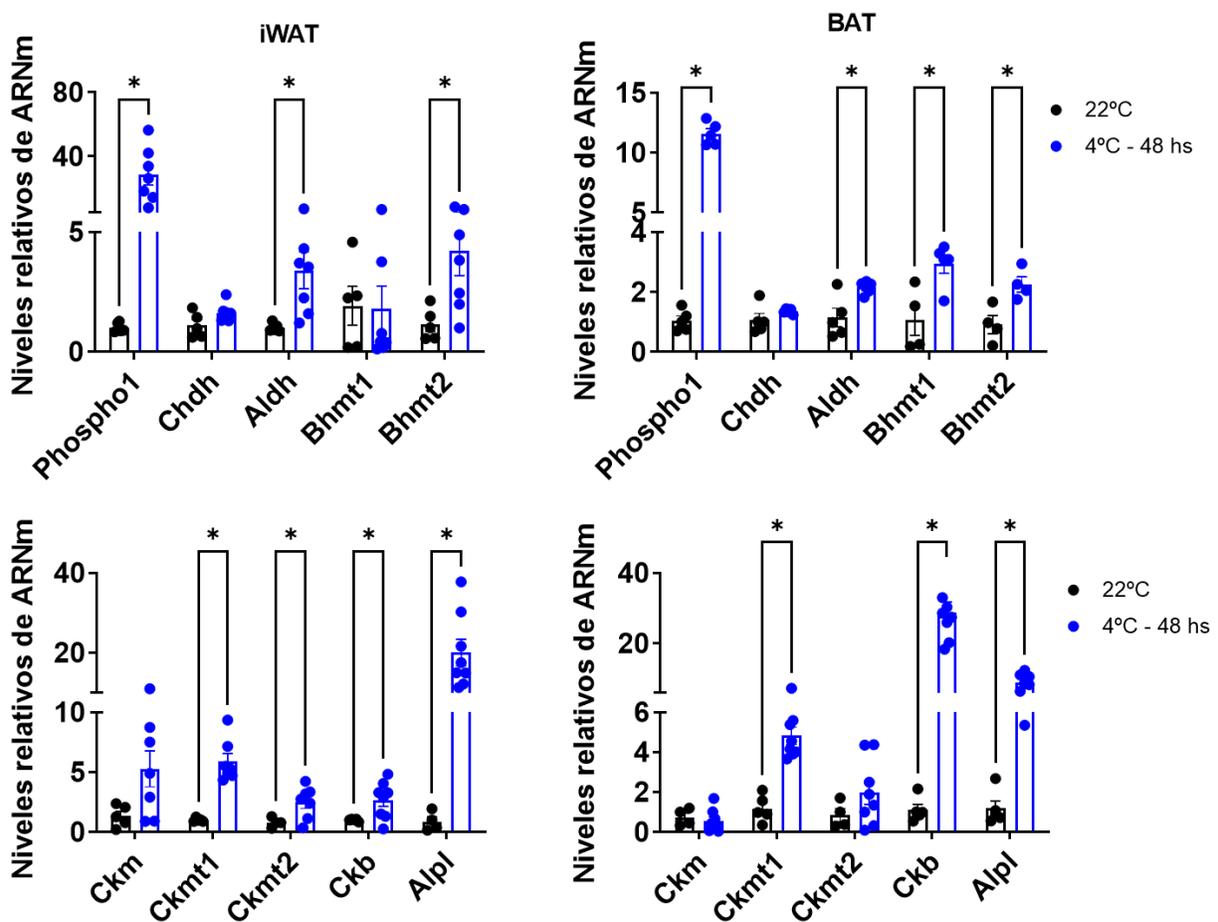


Figura 30. La vía de reciclaje de metionina está regulada positivamente junto con los genes conocidos para la termogénesis dependiente de creatina durante la exposición al frío en iWAT (paneles izquierdos) y BAT (paneles derechos). Los ratones fueron alimentados con dieta normal y mantenidos a temperatura ambiente (22 °C) o 4 °C durante 48h. n = 4–8 por condición. Phospho1: fosfoetanolamina/fosfocolina fosfatasa; Chdh: colina deshidrogenasa, mitocondrial; Aldh: semialdehído alfa-aminoadípico deshidrogenasa; Bhmt1: betaína--homocisteína S-metiltransferasa 1; Bhmt2: betaína--homocisteína S-metiltransferasa 2; Ckm: creatina quinasa tipo m; Ckmt1: creatina

quinasa tipo U mitocondrial; Ckmt2: creatina quinasa tipo S, mitocondrial; Ckb: creatina quinasa tipo b; Alpl: fosfatasa alcalina, isoenzima no específica de tejido. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  SEM. Análisis estadístico: Prueba de t no pareada de dos colas. \*  $p < 0.05$ .

Hasta el momento, nuestros resultados han establecido una conexión entre el metabolismo de 1C y la termogénesis dependiente de creatina. Es notablemente interesante que la implementación de una estrategia farmacológica para tratar la obesidad haya revelado indicios de una conexión entre vías metabólicas aún no caracterizadas en el tejido adiposo y que hasta ahora no se consideran relacionadas con la termogénesis. A raíz de estos resultados, en nuestro grupo surgió la motivación de estudiar si efectivamente el metabolismo de un carbono, descrito fundamentalmente en el hígado, estaba aumentado como parte de la respuesta termogénica. Con ese objetivo se realizó el análisis proteómico de extractos enriquecidos en mitocondrias, obtenidos a partir de hígados de ratones mantenidos a 4 °C y 22 °C durante 48 horas. Dicho análisis se realizó en colaboración con Jorge Rodríguez y Camila Espasandín como parte del trabajo de doctorado de esta última. Para el estudio se obtuvieron preparados de mitocondrias por centrifugación diferencial a partir de muestras de hígado y se analizaron mediante una estrategia proteómica de tipo shotgun. El análisis de los datos de espectrometría de masa usando el programa PatternLab V (PLV) mostró perfiles proteómicos globales diferentes entre las dos condiciones biológicas. Lo anterior se puede observar en un mapa de calor generado con la herramienta Clustergram del PLV (Figura 31A). Se pudo identificar un total de 1543 proteínas entre las 8 réplicas biológicas de las dos condiciones, de las cuales 1394 proteínas fueron comunes a las dos condiciones. 27 proteínas fueron detectadas exclusivamente en la condición 4 °C y 35 proteínas a 22 °C (Figura 31B y Anexo 6), mientras que 24 proteínas resultaron significativamente sobrerrepresentadas a 4 °C y 3 proteínas resultaron subrepresentadas en comparación con 22 °C (Tabla 5). Interesantemente entre las proteínas más abundantes en ambas condiciones se encontraba BHMT, con promedios de 549 y 1128 espectros por réplica biológica en las condiciones 22 °C y 4 °C respectivamente. Si bien es sabido que esta proteína es muy abundante en el hígado, encontrarla con un alto nivel de espectros en un preparado mitocondrial nos dio otro indicio de que podría estar al menos parcialmente localizada en la mitocondria. BHMT también fue una de las proteínas más sobrerrepresentadas en la condición 4 °C. La S-adenosilmetionina sintasa isoforma tipo 1 (MAT1A, UniProt: Q91X83) y la cistationina gamma-liasa (CTH, UniProt: Q8VCN5) también resultaron aumentadas en respuesta al frío. Junto

con BHMT, estas dos proteínas forman parte del metabolismo de un carbono y están anotadas como proteínas citosólicas. Sin embargo un trabajo reciente, mostró que MAT1A está localizada en la matriz mitocondrial <sup>184</sup>. La base de datos de interacciones proteína-proteína String (<https://string-db.org/>, accedido 21/12/2023) muestra que BHMT tiene un alto puntaje de interacción tanto con MAT1A (0.974) como con CTH (0.961), además de con la proteína ALDH7A1, responsable de metabolizar la betaína aldehído proveniente de colina a betaína en la mitocondria <sup>183</sup>. El análisis de procesos biológicos usando la herramienta Webgestalt <sup>175</sup> a partir de las proteínas sobrerrepresentadas en respuesta al frío mostró un mayor impacto en el metabolismo de la metionina junto con el metabolismo del colesterol, de alfa-aminoácidos y ácidos carboxílicos (Figura 32).

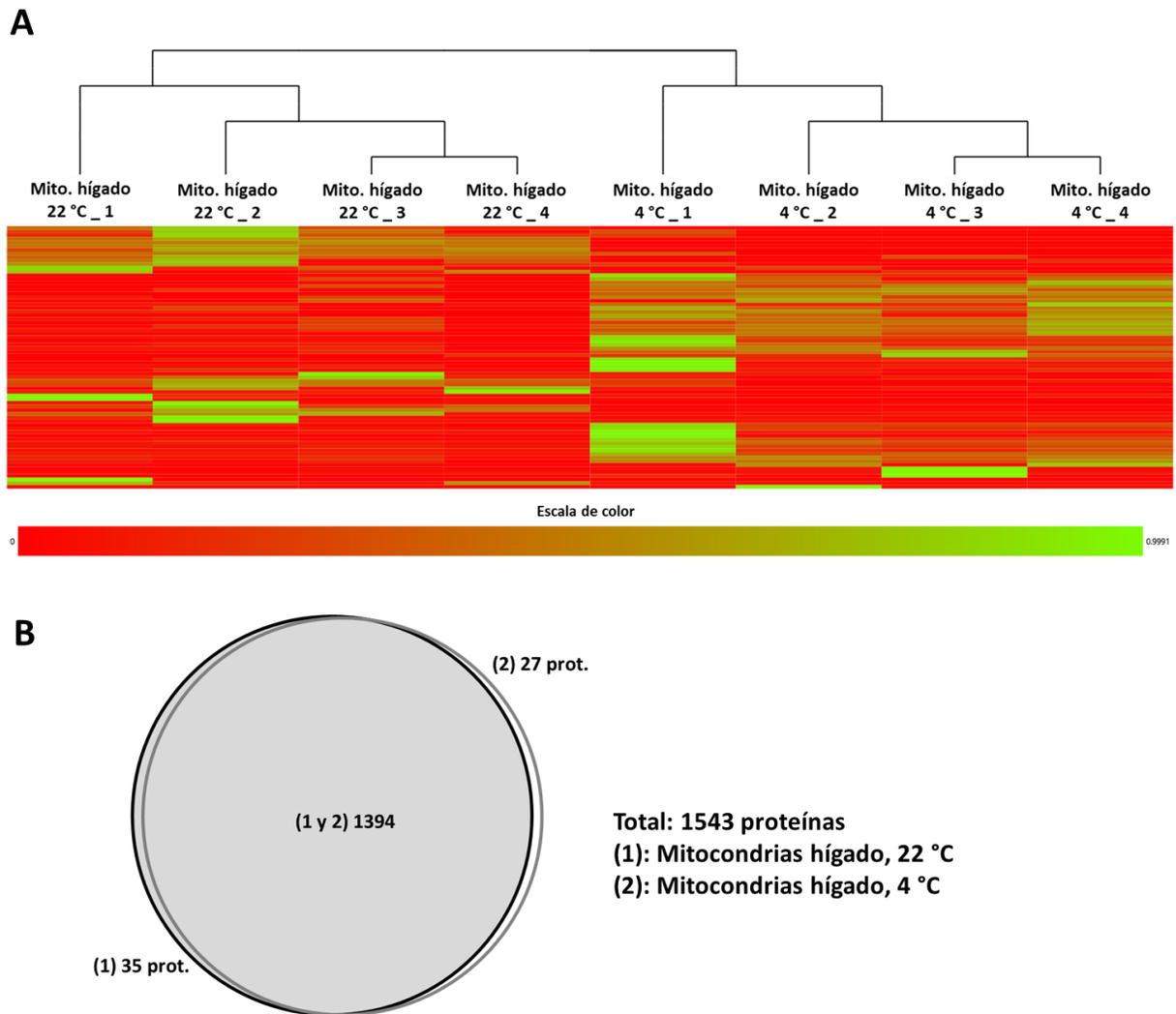


Figura 31. Análisis cuantitativos de los proteomas mitocondriales de hígado de ratones sometidos a un modelo de respuesta al frío. Los animales fueron aclimatados a 18 °C durante 24 h y posteriormente mantenidos a 4 °C o 22 °C durante las siguientes 48 h. Los extractos mitocondriales de hígado fueron analizados mediante una estrategia proteómica de tipo shotgun. n = 4 por condición. **A:** Gráfico de calor generado con la herramienta Clustergram del software Patternlab aplicando agrupamiento jerárquico a los perfiles proteómicos de ambas condiciones biológicas. Cada fila corresponde a una proteína individual y las columnas a las réplicas biológicas de cada condición. El color degradado indica la abundancia relativa de 0 (rojo) a 1 (verde). **B:** Diagrama de Venn utilizando PLV que muestra la distribución de proteínas comunes y exclusivas a cada condición biológica,  $p < 0.05$ .

Tabla 5. Proteínas significativamente diferenciales entre los proteomas mitocondriales de hígado de ratones mantenidos a 22 °C y 4 °C. Las proteínas comunes a ambas condiciones fueron analizadas cuantitativamente mediante la herramienta “Pairwise comparison” del PLV, que realiza un análisis estadístico a nivel de péptidos entre las condiciones y posteriormente extrapola valores de tasa de cambio (TC) y probabilidad a las proteínas correspondientes. Para el análisis estadístico se fijaron cortes de tasa de cambio y valor de p de 2 ( $\text{Log}_2(\text{TC}) \geq 1$ ) y 0.05 respectivamente. Los identificadores (Identif.) corresponden a una base de datos de proteínas de *Mus musculus*

descargada de UniProt. No. pépt.: número de péptidos identificados/cuantificados); Cobert.: cobertura de la proteína; Cond. biol. (mito. hígado): condición biológica (mitocondrias hígado).

Identif.	No. pépt.	Cobert. (%)	Log <sub>2</sub> (TC)	Valor p	Descripción	Cond. biol. (mito. hígado)
Q91X83	9	32.3	2.0	9.3E-05	S-adenosylmethionine synthase isoform type-1 GN=Mat1a PE=1 SV=1	4 °C
Q8VCN5	15	61.1	1.8	1.0E-06	Cystathionine gamma-lyase GN=Cth PE=1 SV=1	4 °C
Q9QYG0	12	42.6	1.6	4.7E-04	Protein NDRG2 GN=Ndr2 PE=1 SV=1	4 °C
O35728	30	62.3	1.5	1.1E-04	Cytochrome P450 4A14 GN=Cyp4a14 PE=1 SV=1	4 °C
P12791	20	33.2	1.5	3.0E-03	Cytochrome P450 2B10 GN=Cyp2b10 PE=1 SV=1	4 °C
Q05915	7	28.2	1.5	8.6E-03	GTP cyclohydrolase 1 GN=Gch1 PE=1 SV=1	4 °C
Q9JKJ9	12	28.7	1.4	2.9E-02	24-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase GN=Cyp39a1 PE=1 SV=1	4 °C
Q64505	11	35.0	1.4	3.4E-02	Cytochrome P450 7A1 GN=Cyp7a1 PE=2 SV=2	4 °C
O35490	40	75.4	1.4	8.9E-11	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 GN=Bhmt PE=1 SV=1	4 °C
Q8R1S9	5	9.7	1.4	3.4E-02	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 4 GN=Slc38a4 PE=1 SV=1	4 °C
P35576	7	26.1	1.3	5.8E-03	Glucose-6-phosphatase catalytic subunit 1 GN=G6pc1 PE=1 SV=2	4 °C
Q9QY30	39	35.8	1.3	1.9E-13	Bile salt export pump GN=Abcb11 PE=1 SV=2	4 °C
Q8VI47	26	21.5	1.3	2.4E-06	ATP-binding cassette sub-family C member 2 GN=Abcc2 PE=1 SV=2	4 °C
O09158	22	40.8	1.3	1.0E-05	Cytochrome P450 3A25 GN=Cyp3a25 PE=1 SV=1	4 °C
O88833	20	46.6	1.2	1.3E-02	Cytochrome P450 4A10 GN=Cyp4a10 PE=1 SV=2	4 °C
P29758	39	82.7	1.2	5.7E-06	Ornithine aminotransferase, mitochondrial GN=Oat PE=1 SV=1	4 °C

P52840	11	45.7	1.2	1.9E-05	Sulfotransferase 1A1 GN=Sult1a1 PE=1 SV=1	4 °C
P30999	21	31.3	1.1	1.2E-03	Catenin delta-1 GN=Ctnnd1 PE=1 SV=2	4 °C
O88736	7	29.0	1.1	8.2E-06	3-keto-steroid reductase/17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 7 GN=Hsd17b7 PE=1 SV=1	4 °C
P58735	11	17.9	1.1	1.0E-03	Sulfate anion transporter 1 GN=Slc26a1 PE=1 SV=1	4 °C
Q8BGG9	12	38.3	1.0	1.1E-04	Acyl-coenzyme A amino acid N-acyltransferase 2 GN=Acnat2 PE=1 SV=1	4 °C
Q8K0C4	21	52.7	1.0	4.8E-03	Lanosterol 14-alpha demethylase GN=Cyp51a1 PE=1 SV=1	4 °C
P16331	14	40.6	1.0	3.2E-02	Phenylalanine-4-hydroxylase GN=Pah PE=1 SV=4	4 °C
Q61301	7	8.5	1.0	9.2E-04	Catenin alpha-2 GN=Ctnna2 PE=1 SV=3	4 °C
Q9CQS8	3	21.9	1.0	8.4E-03	Protein transport protein Sec61 subunit beta GN=Sec61b PE=1 SV=3	22 °C
E9Q5K4	20	41.9	1.1	6.4E-06	Cytochrome P450 2C44 GN=Cyp2c23 PE=1 SV=1	22 °C
Q61285	17	26.9	1.2	1.0E-02	ATP-binding cassette sub-family D member 2 GN=Abcd2 PE=1 SV=2	22 °C

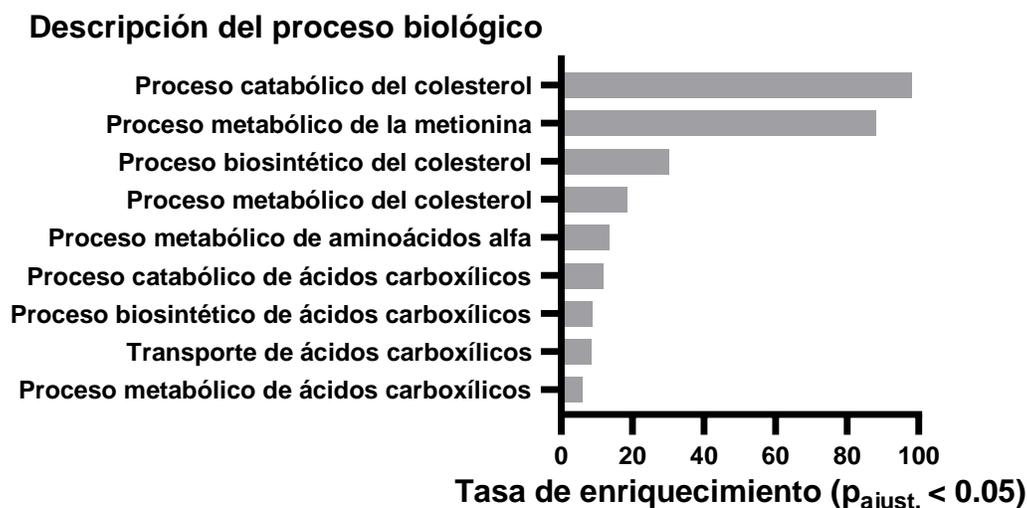


Figura 32. Análisis de sobrerrepresentación de procesos biológicos (Webgestalt) basado en las proteínas aumentadas en el proteoma mitocondrial de hígado de ratones mantenidos a 4 °C en comparación con sus controles a 22 °C. Para el análisis se utilizó la base de datos “geneontology” de la herramienta Webgestalt referenciado a una base de datos del genoma de *Mus musculus* de UniProt. Los procesos con un FDR < 0.05 fueron considerados significativamente enriquecidos.

En conjunto, los resultados obtenidos a partir de los proteomas comparativos de mitocondrias de tejido adiposo e hígado apuntan a que la obtención de betaína a partir de colina y el reciclaje de metionina, que son parte del metabolismo de  $1C^{185}$ , desempeñan un rol significativo en la repuesta termogénica dependiente de creatina. El análisis de expresión génica confirmó que Phospho1, Chdh, Aldh7a1 y Bhmt se sobreexpresan en el tejido adiposo a causa del tratamiento con SANA (Figura 28), concomitantemente con un aumento en los niveles de creatina, fosfocreatina, betaína y metionina (Figura 24). Esto sugiere que la metabolización de fosfocolina podría ser utilizada para generar metabolitos necesarios en el reciclaje de metionina (ver esquema Figura 29). Utilizando un modelo de repuesta al frío se comprobó que, independientemente del efecto del SANA, esta vía está activa en tejido adiposo. Lo anterior coincide con la sobreexpresión de la termogénesis dependiente de creatina tanto en iWAT como en BAT (Figura 30) y que el metabolismo de la metionina está significativamente incrementado en el hígado como parte de la repuesta termogénica (Figura 32).

### **3.4.8. Identificación de proteínas de unión a SANA**

#### **3.4.8.1. Diseño y evaluación de SANA biotilado (bSANA) para la identificación de blancos del SANA**

Como parte de la dilucidación del mecanismo por el cual el SANA ejerce su efecto sobre el tejido adiposo se abordó la identificación de proteínas blanco del fármaco. Para eso fue diseñado y sintetizado un análogo biotilado del SANA (bSANA) por el grupo de química orgánica a cargo de la Dra. Virginia López. En el bSANA la biotina se une mediante una cadena espaciadora al grupo carboxilo del esqueleto salicilato del SANA formando un enlace amida (Figura 33). La masa exacta del bSANA fue confirmada por espectrometría de masa de alta resolución (Figura 33). Teniendo en cuenta que esto genera un cambio en la estructura de la molécula a nivel del salicilato, es esperable que los blancos potenciales encontrados usando esta estrategia se justifiquen mayormente por la reactividad de tipo nitroalqueno del SANA. Para comprobar si la molécula biotilada mantenía sus propiedades electrofílicas, fue incubada con  $\beta$ -mercaptoetanol en una relación molar 1:10 (bSANA:BME) y se obtuvieron espectros de absorbancia de la reacción en un rango de longitud de onda de 200 a 600 nm cada 1 minuto en un lapso de 10 minutos. Al igual que se observó anteriormente con el SANA (Figura 11), el bSANA reaccionó con BME, mostrando una caída rápida de la absorbancia en su valor máximo (440 nm) durante el primer minuto de reacción (Figura 34A). No obstante, el gráfico de absorbancia en el máximo en función del tiempo para bSANA y SANA muestra una caída menos abrupta en el caso de bSANA, lo que sugiere cualitativamente una menor reactividad electrofílica de bSANA con nucleófilos de baja masa molecular (Figura 34). Es importante tener en cuenta que para tener un valor cuantitativo sería necesario utilizar una técnica que permita seguir la cinética de la reacción de forma rápida, por ejemplo, la espectrometría de flujo detenido (stopped flow).

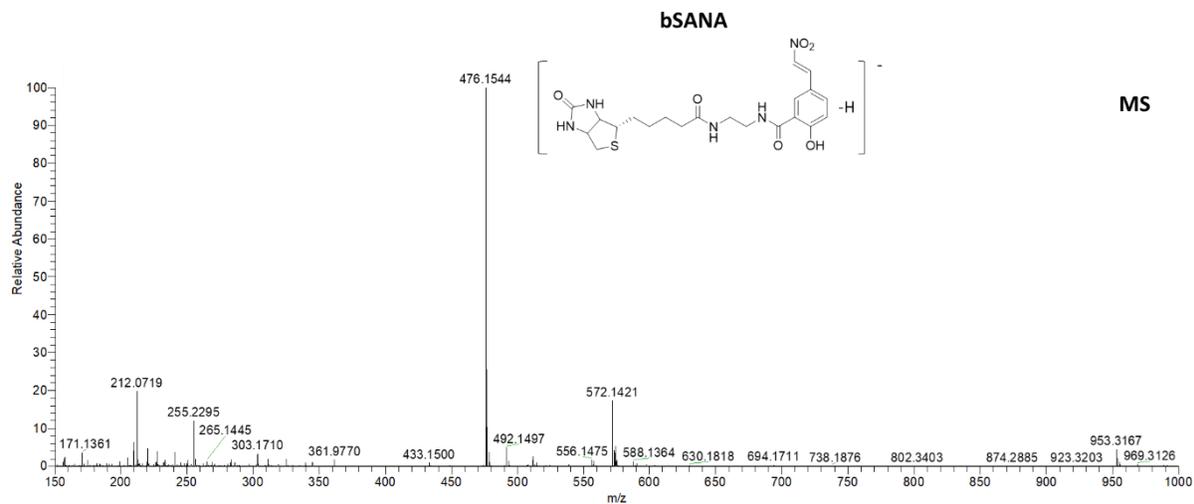


Figura 33. Espectro MS del bSANA obtenido con alta resolución en modo negativo en un espectrómetro de masa Q Exactive Plus (Thermo Scientific). HRMS: m/z [M-H]<sup>-</sup> teórica para C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>5</sub>: 476.1604, medida: 476.1544.

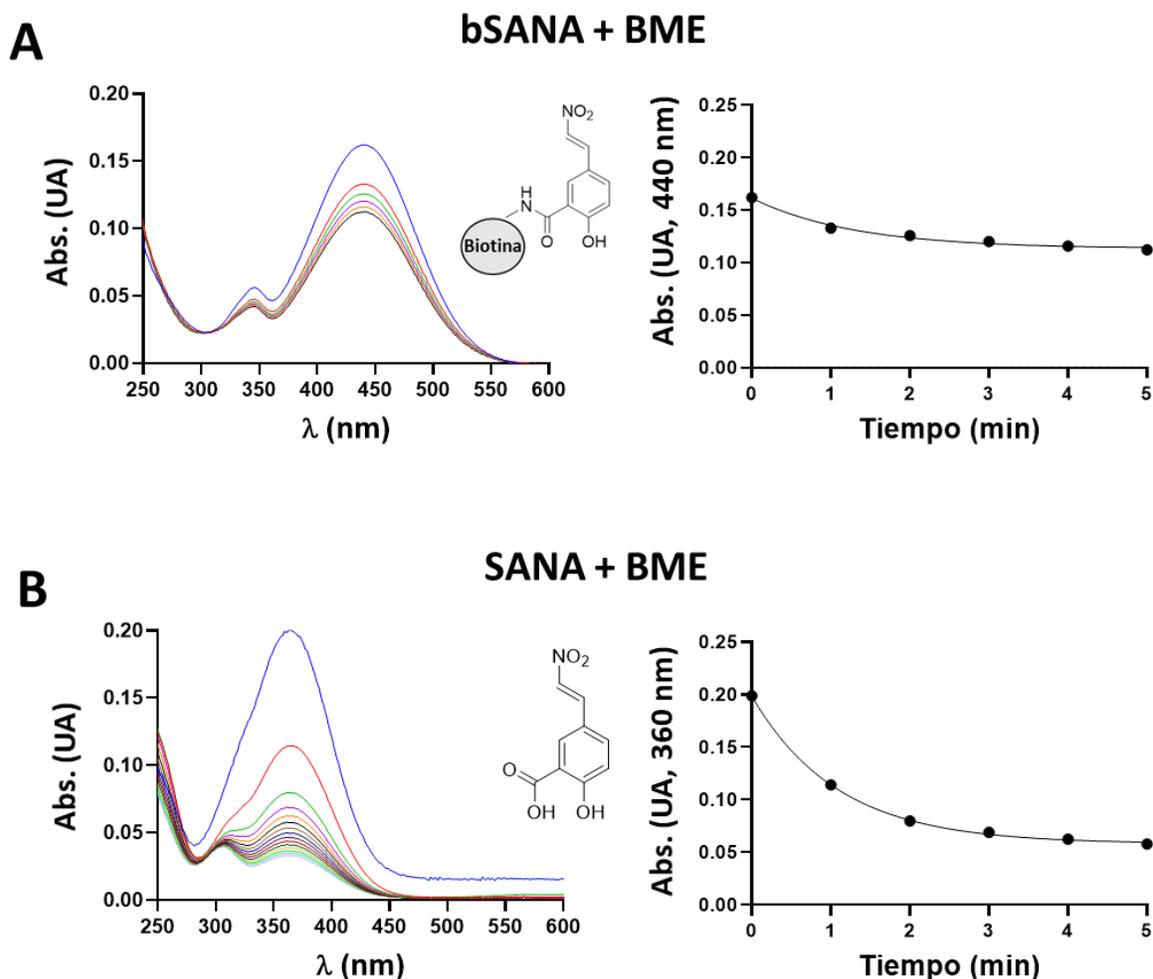


Figura 34. Propiedades electrofílicas del SANA biotilado (bSANA) (**A**) en comparación con el SANA (**B**). Ambos compuestos ( $10 \mu\text{M}$ ) fueron incubados con  $\beta$ -mercaptoetanol (BME,  $100 \mu\text{M}$ ) y se obtuvieron espectros de absorbancia (Abs.) de las reacciones en el intervalo 200 - 600 nm cada 60s durante 10 minutos. En los paneles derechos de A y B se muestra la absorbancia a 440 nm y 360 nm respectivamente durante los primeros 5 minutos de cada reacción.

La modificación postraduccional de proteínas por nitroalquenos o nitroalquilación está descrita como una reacción de adición de Michael mayormente en cisteína y en menor medida en histidina, lisina y arginina<sup>186,187</sup>. Basados en un trabajo previo<sup>71</sup> en el que se caracterizó la reactividad de nitroalquenos de ácidos grasos con GAPDH, evaluamos la reactividad *in vitro* del SANA y su análogo biotilado con la proteína modelo catalasa de *Bos taurus*. Esta proteína contiene 4 cisteínas (Figura 35) y no se ha reportado que se encuentren formando puentes disulfuro, de manera que serían potencialmente modificables por el grupo nitroalquenilo del SANA y bSANA.

Para evaluar la reactividad se expuso una solución de la proteína (estándar comercial de alta pureza) a cada uno de los nitroalquenos, o DMSO como control, en una relación molar de 1:10 proteína:nitroalqueno. Posteriormente se llevó a cabo una digestión triptica corta de la proteína y se analizaron los péptidos obtenidos por nano HPLC/MS. El análisis de los datos se realizó usando el software PatternLab. Para la identificación, las modificaciones con SANA y bSANA se definieron como variables en cisteínas e histidinas. Las masas exactas adicionadas por las modificaciones con ambas moléculas fueron de 209.0320 (SANA) y 477.1679 (bSANA). Para ser considerados modificados, los péptidos debieron cumplir con los siguientes requerimientos: 1- ser identificado en las 3 réplicas de cada condición con más de 6 espectros en el total de las réplicas de dicha condición; 2- resultar exclusivos o con una abundancia significativamente mayor en las condiciones tratadas con los compuestos con respecto al control y entre cada compuesto. El análisis estadístico para determinar dicha significancia fue realizado a nivel de péptidos con los módulos Venn diagram y TFold de Patternlab, teniendo en cuenta el número de espectros asignados a cada péptido. Las secuencias de péptidos modificados por SANA y bSANA se muestran en la

Tabla 6. La tasa de modificación de His fue muy escasa en el caso del bSANA, resultado en 10 espectros totales asignados, y nula en el caso del SANA. Por el contrario, las 4 cisteínas (Cys<sub>232</sub>, Cys<sub>377</sub>, Cys<sub>393</sub> y Cys<sub>460</sub>) de la proteína fueron modificadas por ambos nitroalquenos. En la Figura 36 se muestran espectros representativos del péptido modificado más abundantes para cada compuesto: LGPNYLQIPVNC[209.0320]PYR (modificado con SANA en Cys<sub>377</sub>) y LVNANGEAVYC[477.1679]K (modificado con bSANA en Cys<sub>232</sub>). En ambos espectros se lograron identificaciones inequívocas basadas en un alto nivel de justificación de las señales de m/z.

En la Figura 37 se muestra la cantidad de espectros asignados a cada residuo de catalasa modificado con SANA o bSANA, normalizado por la cantidad de espectros totales de la proteína en cada réplica. Como se puede observar, la tasa de modificación de las cisteínas 232 y 393 no presentó diferencias entre SANA y bSANA. En el caso de las Cys<sub>377</sub> y Cys<sub>460</sub> la tasa fue significativamente mayor con SANA, ascendiendo a aproximadamente el doble en la Cys<sub>460</sub>. Teniendo en cuenta la estructura de la proteína, modelada con la herramienta 3D viewer de

AlphaFold (Figura 38), las diferencias en la reactividad entre ambos compuestos no se justificarían meramente por un efecto estérico a causa del grupo biotina, lo cual es esperable dado que la reactividad de los grupos tioles de proteínas es un fenómeno complejo y multifactorial <sup>188</sup>. Es importante tener en cuenta que este análisis cuantitativo de sitios de modificación se basa en las identificaciones asignadas a los péptidos que contienen el residuo modificable. Por lo tanto, la cantidad de espectros obtenidos de estos péptidos también está condicionada por el efecto de cada secuencia específica sobre el proceso de digestión trípica y el desempeño en el espectrómetro de masa.

1	MADNRDPASDQMK <u>H</u> WKEQRAAQKPDVLTGGGNPVGDKLNSLTVGPRGPLLVQDVVFTDE	60
61	MA <u>H</u> FDRERIPERVV <u>H</u> AKGAGAFGYFEVT <u>H</u> DITRYSKAKVFE <u>H</u> IGKRTPIAVRFSTVAGES	120
121	GSADTVRDRPRGFAVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDALLFPSFI <u>H</u> SQKRNPQT <u>H</u> LKDPD	180
181	MVWDFWLSRPESL <u>H</u> QVSFLFSDRGIPDGH <u>R</u> <u>H</u> MNGYGS <u>H</u> TFKLVNANGEAVY <u>C</u> KF <u>H</u> YKTDQ	240
241	GIKNLSVEDAARLA <u>H</u> EDPDYGLRDLFNAIATGNYPSTLYIQVMTFSEAEIFPFNPFDLT	300
301	KVWP <u>H</u> GDYPLIPVGKLVNLRNPVNYFAEVEQLAFDPSNMPPGIEPSPDKMLQGRLFAYPD	360
361	<u>T</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>H</u> RLGPNYLQIPVN <u>C</u> PYRARVANYQRDGP <u>M</u> <u>C</u> MMDNQGGAPNYYPNSFSAPE <u>H</u> QPSALE	420
421	<u>H</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>H</u> FSGDVQRFNSANDDNVTQVRTFYLVNNEEQRKRL <u>C</u> ENIAG <u>H</u> LKDAQLFIQKKAVK	480
481	NFSDV <u>H</u> PEYGSRIQALLDKYNEEKPKNAV <u>H</u> TYVQHGS <u>H</u> LSAREKANL	527

Figura 35. Secuencia de aminoácidos de la proteína modelo catalasa bovina (*Bos taurus*), identificador de UniProt P00432. En rojo se resaltan los residuos de cisteína y en azul las histidinas.

Tabla 6. Péptidos tríplicos de catalasa bovina modificados con SANA o bSANA identificados por LC-MS/MS.

Péptidos identificados con la modificación SANA (209.0320) en C y/o H.			
Secuencia	Réplicas	Espectros totales	Residuo

LGPNYLQIPVNC[209.0320]PYR	3	155	C377
LC[209.0320]ENIAGHLK	3	136	C460
LVNANGEAVYC[209.0320]K	3	92	C232
DGPMC[209.0320]MMDNQGGAPNYYPNSFSAPEHQPSALEHR	3	82	C393
LC[209.0320]ENIAGHLKDAQLFIQK	3	81	C460
DGPMC[209.0320]M[15.9949]MDNQGGAPNYYPNSFSAPEHQPSALEHR	3	42	C393
DGPM[15.9949]C[209.0320]MMDNQGGAPNYYPNSFSAPEHQPSALEHR	3	40	C393
RLC[209.0320]ENIAGHLK	3	40	C460
HRLGPNYLQIPVNC[209.0320]PYR	3	37	C377
LC[209.0320]ENIAGHLKDAQLFIQK	3	36	C460
RLC[209.0320]ENIAGHLKDAQLFIQK	3	25	C460
LGPNYLQIPVNC[209.0320]PYRAR	3	24	C377
HMNGYGSHTFKLVNANGEAVYC[209.0320]K	3	20	C232
LVNANGEAVYC[209.0320]KFHYKTDQGIK	3	19	C232
HRLGPNYLQIPVNC[209.0320]PYRAR	3	19	C377
LVNANGEAVYC[209.0320]KFHYK	3	14	C232
HM[15.9949]NGYGSHTFKLVNANGEAVYC[209.0320]K	3	7	C232
<b>Péptidos identificados con la modificación bSANA (477.1679) en C y/o H.</b>			
<b>Secuencia</b>	<b>Réplicas</b>	<b>Espectros totales</b>	<b>Residuo</b>
LVNANGEAVYC[477.1679]K	3	120	C232
LGPNYLQIPVNC[477.1679]PYR	3	110	C377
DGPMC[477.1679]MMDNQGGAPNYYPNSFSAPEHQPSALEHR	3	63	C393
LC[477.1679]ENIAGHLK	3	52	C460
DGPM[15.9949]C[477.1679]MMDNQGGAPNYYPNSFSAPEHQPSALEHR	3	51	C393
LC[477.1679]ENIAGHLKDAQLFIQK	3	43	C460
RLC[477.1679]ENIAGHLK	3	23	C460
HRLGPNYLQIPVNC[477.1679]PYR	3	21	C377
HMNGYGSHTFKLVNANGEAVYC[477.1679]K	3	19	C232
LC[477.1679]ENIAGHLKDAQLFIQK	3	18	C460
DGPMC[477.1679]MM[15.9949]DNQGGAPNYYPNSFSAPEHQPSALEHR	3	16	C393

DGPMC[477.1679]M[15.9949]MDNQGGAPNYYPNSFSAPEHQPSALEHR	3	15	C393
LGPNYLQIPVNC[477.1679]PYRAR	3	13	C377
RLC[477.1679]ENIAGHLKDAQLFIQK	3	12	C460
HRLGPNYLQIPVNC[477.1679]PYRAR	3	12	C377
LVNANGEAVYC[477.1679]KFHYK	3	12	C232
LC[477.1679]ENIAGH[477.1679]LKDAQLFIQK	3	10	C460/H46 6
LVNANGEAVYC[477.1679]KFHYKTDQGIK	3	8	C232



series que contienen (M-bSANA) corresponden a la masa del precursor luego de la pérdida de la modificación durante la fragmentación.

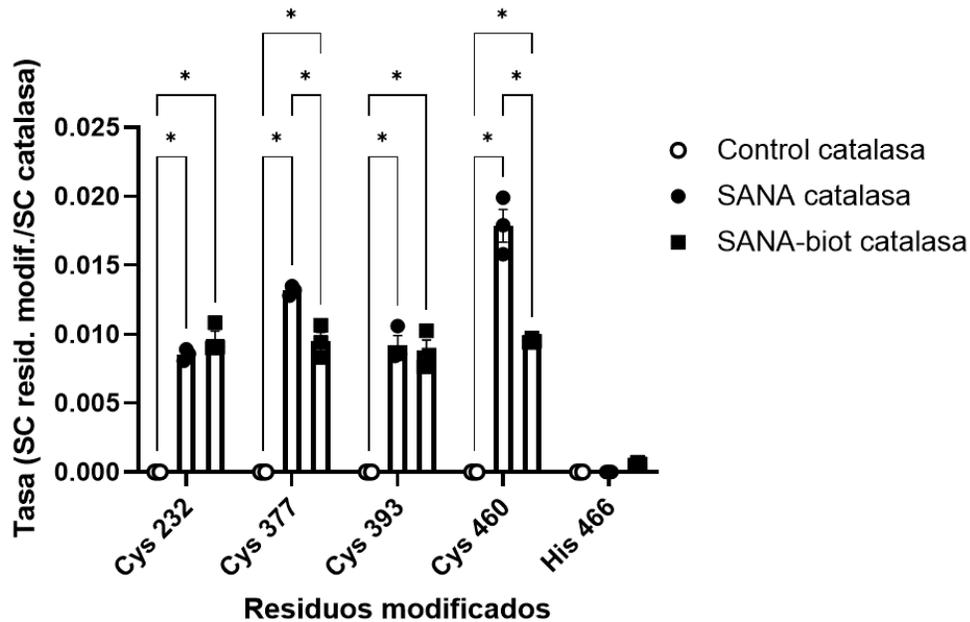


Figura 37. Tasa de modificación en Cys e His de catalasa bovina por SANA y SANA biotina (SANA-biot) in vitro. Las barras representan el número de espectros asignados a péptidos con residuos modificados (SC resid. modif.) normalizado por el número de espectros totales asignados a la catalasa en cada réplica de las condiciones: SANA catalasa y SANA-biot catalasa. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  SEM. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con test de Tukey para múltiples comparaciones,  $p_{\text{ajust.}} < 0.05$  (\*) se consideró estadísticamente significativo.

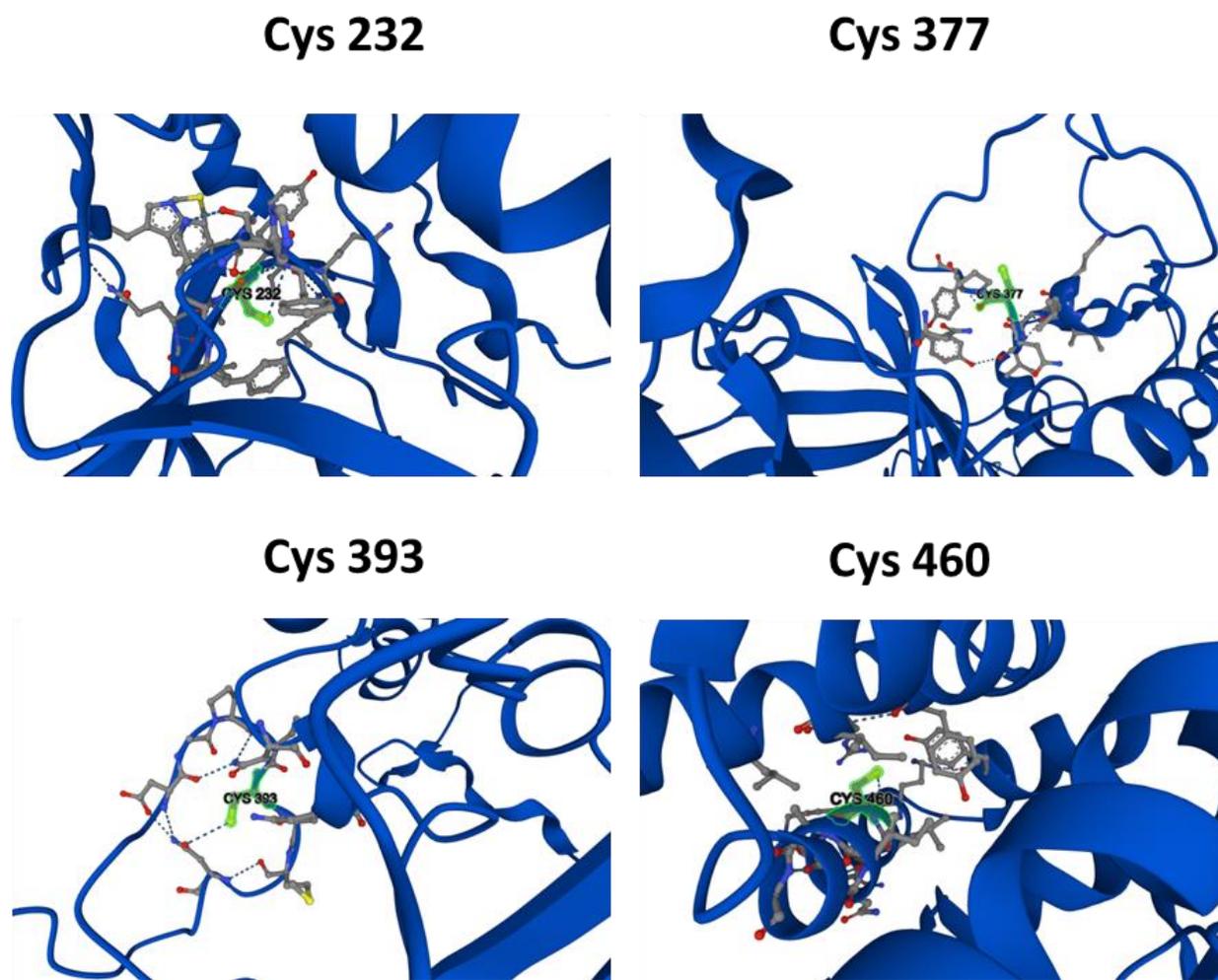


Figura 38. Representación de las cisteínas modificadas con SANA y bSANA en la estructura de la catalasa bovina (UniProt: P00432). El modelado de la estructura fue obtenido con la herramienta 3D viewer de AlphaFold.

### 3.4.8.2. Búsqueda no dirigida de proteínas de unión a SANA

Esperando obtener una lista representativa de potenciales proteínas de unión al SANA, se hizo reaccionar *in vitro* su análogo biotinilado (bSANA) con un extracto proteico total de tejido adiposo marrón (BAT) murino. Para eso se utilizó una resina comercial de tipo streptavidina (StrepTactin sepharose), con gran afinidad por la biotina, y de esa forma capturar las proteínas unidas al bSANA, tomando como control el lisado de BAT incubado con SANA. Posteriormente se prosiguió a una estrategia proteómica shotgun para identificar las proteínas recuperadas diferencialmente con el bSANA (Figura 39). El uso del control incubado con SANA sin biotinilar

permite restar las identificaciones correspondientes al pegado inespecífico de proteínas del lisado a la resina y a las proteínas biotiniladas endógenamente.

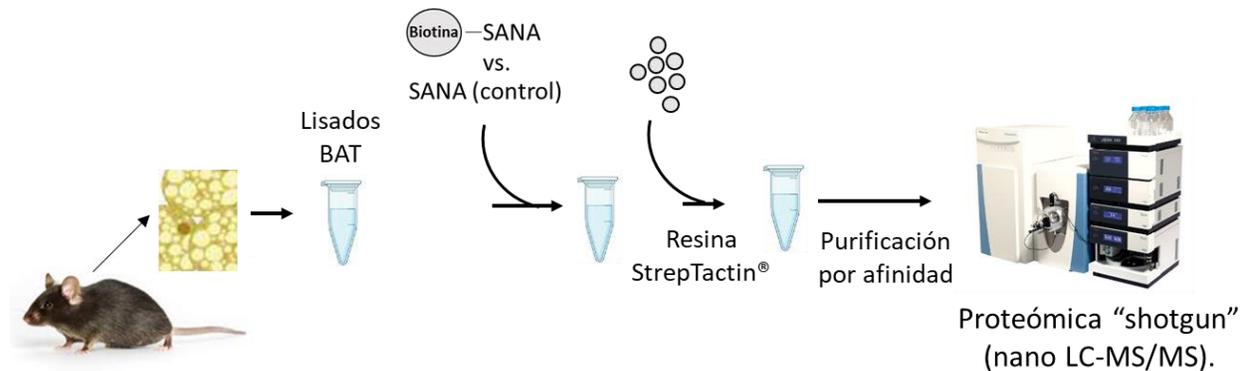


Figura 39. Identificación de proteínas de unión al SANA en tejido adiposo marrón (BAT). Los extractos proteicos de BAT fueron incubados con SANA biotinilado o con SANA, usado como control, previo a la purificación por afinidad ("pull-down") anti-biotina y análisis por nano LC-MS/MS.

Un escalado multidimensional generado con el módulo Buzios del PLV mostró una marcada diferencia entre los patrones proteómicos a lo largo de las dos condiciones biológicas: BAT+SANA biotinilado (bSANA, bS) y el control BAT+SANA (SANA, S). La representación gráfica de dicho análisis es un gráfico bidimensional que contiene una vista global de cada réplica biológica ajustado a dos componentes principales 1 y 2 (CP1 y CP2) (Figura 40A). Utilizando el módulo diagrama de Venn del PatternLab se encontraron 235 proteínas, de las 481 identificadas entre las dos condiciones, exclusivas de la condición BAT+bSANA. Otras 60 proteínas resultaron significativamente ( $q_{BH} < 0.05$ ) sobrerrepresentadas con una tasa de cambio mayor o igual a 1.5 en la condición de interés al realizar un análisis cuantitativo mediante la herramienta TFold del mismo software. En suma, el análisis de LC/MS mostró que el bSANA se unía a 295 proteínas y curiosamente, CKMT estaba entre las proteínas exclusivas recuperadas con mayor número de espectros en la condición BAT+bSANA (Figura 40B y Anexo 7). Las proteínas CKMT1 y CKMT2 de origen murino presentan un alto nivel de similitud (Figura 41). Si bien encontramos péptidos correspondientes a ambas proteínas entre los identificados en la condición BAT+bSANA, la cantidad de péptidos únicos asignada a CKMT2 y su abundancia en términos de número de

espectros fue muy superior. Lo anterior apunta a una mayor confiabilidad en la identificación de CKMT2 (Tabla 7). Ambas enzimas comparten la mayor parte de los residuos potencialmente modificables por el SANA y el bSANA: 6 cisteínas y 8 histidinas; sin embargo, la histidina 67 y la cisteína 77 son exclusivas de CKMT1, mientras que las histidinas 45 y 152 y las cisteínas 67 y 238 se encuentran solamente en CKMT2. Obviando las posibles diferencias en la reactividad de dichos residuos, la superioridad meramente numérica de CKMT2 en cuanto a residuos potencialmente modificables por SANA y bSANA podría ser una causa de la mayor cantidad de péptidos y espectros identificados de dicha proteína al enriquecer contra bSANA. Por otro lado, en 2 sets de datos <sup>189,190</sup> que contienen análisis de expresión génica por RNA-seq de BAT de ratones C57BL/6J mantenidos a temperatura ambiente, mientras que *ckmt2* tuvo valores cuantificables en ambos experimentos, *ckmt1* no fue detectable. Lo cual apunta a que los niveles de expresión de *ckmt1* en este tejido serían considerablemente menores que los de *ckmt2*.

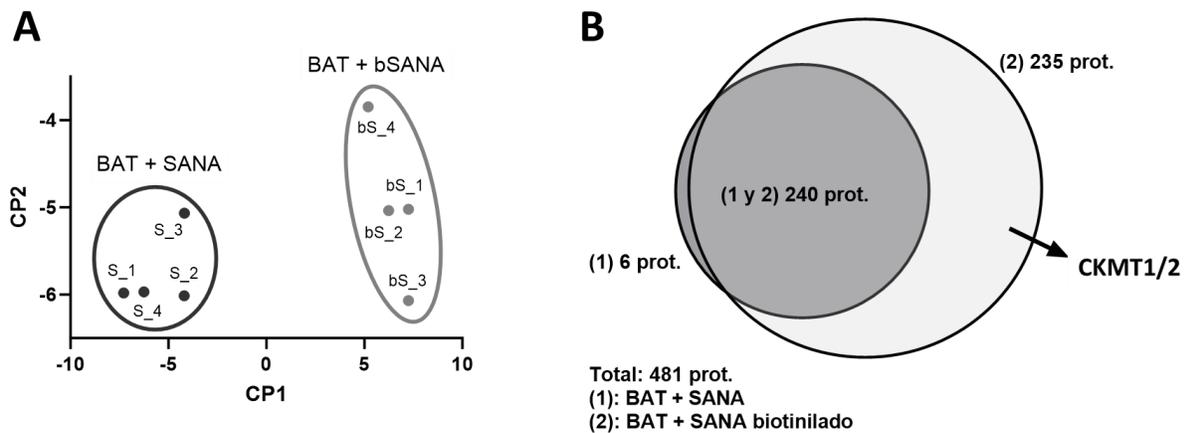


Figura 40. Análisis proteómico de la purificación por afinidad de proteínas de unión a SANA biotinilado en lisados de tejido adiposo marrón. **A**: Escalado multidimensional generado con el módulo Buzios del PLV (algoritmo Springs), que representa cada réplica biológica en un gráfico bidimensional, proporcionando una vista global de patrones proteómicos a lo largo de las dos condiciones biológicas: BAT+SANA biotinilado (bSANA, bS) y el control BAT+SANA (SANA, S). Cada punto representa un perfil proteómico único, codificado como un vector donde cada componente corresponde al valor cuantitativo de una proteína específica. Los dos ejes corresponden a los componentes principales primero y segundo (CP1 y CP2), que representan la máxima variabilidad en el conjunto de datos. Los distintos grupos dentro del gráfico (delimitados por óvalos) indican condiciones biológicas con perfiles proteómicos similares. **B**: Análisis diagrama de Venn utilizando PLV que muestra la distribución de proteínas (prot.) comunes y exclusivas a cada condición biológica.

Puntuación	Esperado (Valor E)	Método	Identities	Positivos	Espacios
703 bits(1815)	0	Ajuste de matriz compositiva	329/413(80%)	367/413(88%)	0/413(0%)
Ckmt1 1	MAGPFSRLLSARPGRLRLLAGAGSLTAGILLRPE SVGAAAERRRLYPPSAEYPDLRKH				60
ckmt2 1	MASAFSKLLTGRNASLLFTTLGTSALTTGYLLNRQKVSADAREQHKLFPSSADYPDLRKH				60
ckmt1 61	NNCMASHLTPAVYARLCKDKTTPGTWLDQC IQTGVDNPGHPFIKTVGMVAGDEETYEYVFA				120
ckmt2 61	NNCMA LTP +YA+L +K TP+G+TLDQC IQTGVDNPGHPFIKTVGMVAGDEE+YEVFA				120
ckmt1 121	ELFDPVIQERHNGYDPRTMKHTDLDASKIRSGYFDERYVLSRVRTGRSIRGLSLPPAC				180
ckmt2 121	DLFDPVIKLRHNGYDPRVMKHPTDLDASKITHGQFDERYVLSRVRTGRSIRGLSLPPAC				180
ckmt1 181	TRAERREVERVVVDALSGLKGDLAGRYRLSEMTEAEQQQLIDDHFLFDKPVSPLLTAAG				240
ckmt2 181	+RAERREVE V + AL GLKGDLAGRYY+LSEMTE +QQ+LIDDHFLFDKPVSPLLT AG				240
ckmt1 241	MARDWPDARGIWHNNEKS FLIWNNEEDHTRVISMEKGGNMKRVFERFCRGLKEVEKLIQE				300
ckmt2 241	MARDWPDARGIWHN +K+ FLIWNNEEDHTRVISMEKGGNMKRVFERFCRGLKEVE+LIQE				300
ckmt1 301	RGWEFMWNERLGYILTCPNSLGTGLRAGVHIKLPKLSKDNRFKILENLRQLKRGTTGGVD				360
ckmt2 301	RGWEFMWNERLGYILTCPNSLGTGLRAGVH+++P LSKD RF KILENLRQLKRGTTGGVD				360
ckmt1 361	TAATGSVFDISNLDRLGKSEVELVQLVIDGVNYLIDCERRLERGQDIRIPPL				413
ckmt2 361	TAA V+DISN+DR+G+SEVELVQ+VIDGVNYL+DCE++LERGQDI++PPPL				413

Figura 41. Alineamiento de secuencias con la herramienta Blastp<sup>191</sup> de las proteínas CKMT1 y CKMT2 de *Mus musculus*. En rojo se resaltan los residuos de cisteína y en azul las histidinas.

Tabla 7. Identificación de péptidos para CKMT1 y CKMT2 en BAT+SANA biotinilado

Secuencia	# total de espectros	P30275 (CKMT1)	Q6P8J7 (CKMT2)
DWPDAR	15	✓	✓
VISM[15.9949]EK	9	✓	✓
VM[15.9949]KHPTDLDASK	8		✓
YVLSSR	5	✓	✓
EVENVAITALEGLKGDLAGR	5		✓
LSEMTEQDQQR	4		✓

LGYILTCPSNLGTGLR	4	✓	✓
ITHGQFDER	4		✓
GWEFMWNER	4	✓	✓
LSEM[15.9949]TEQDQQR	4		✓
SEVELVQIVIDGVNYLVDCEK	3		✓
TVGMVAGDEESYEVFADLFDPVIK	2		✓
GLSLPPACSR	1		✓
LIDDHFLFDKPVSPLLTCAGM[15.9949]AR	1		✓
VMKHPTDL DASK	1		✓
HPTDL DASK	1		✓
MTPSGYTL DQCIQTGV DNP GHPFIK	1		✓
GTGGVDTAATGSVFDISNLDR	1	✓	

Otra de las proteínas encontradas de forma exclusiva en el pull-down de BAT+bSANA fue la fosfoetanolamina/fosfocolina fosfatasa (PHOSPHO1, UniProt: Q8R2H9). De manera similar a las creatina quinasas, Phospho1 también aumentó su expresión a nivel de ARNm en respuesta a SANA. Esta proteína tanto en ratón como en humano contiene cisteínas libres e histidinas que podrían ser modificadas por el SANA.

### 3.4.8.3. Análisis *in vitro* de la modificación covalente de CKMT2 recombinante por el SANA

Con el objetivo de confirmar la unión covalente directa de SANA a CKMT2 de ratón, en colaboración con Leonardo Santos (PME), se expresó la proteína recombinante en la línea celular de riñón de embrión humano: HEK-293. El lisado, tratado o no con SANA, fue analizado mediante SDS-PAGE no reductora y WB utilizando anticuerpos anti-CKMT2 y anti-salicilato. Como se puede observar en la Figura 42A cuando el extracto fue incubado con SANA se co-detectaron bandas correspondientes al peso molecular de CKMT2 con ambos anticuerpos. La interacción SANA-CKMT2 también fue analizada usando CKMT2 murina expresada en *Escherichia coli* y purificada. La proteína se incubó con bSANA a concentraciones crecientes y se detectó usando estreptavidina conjugada a la peroxidasa de rábano picante (HRP). En la Figura 42B se observa que la intensidad de la banda correspondiente a CKMT2 recombinante aumenta proporcionalmente

con la concentración de bSANA. En este caso el peso molecular de la proteína es aproximadamente 40 kDa porque no contiene el péptido señal que define su localización mitocondrial.

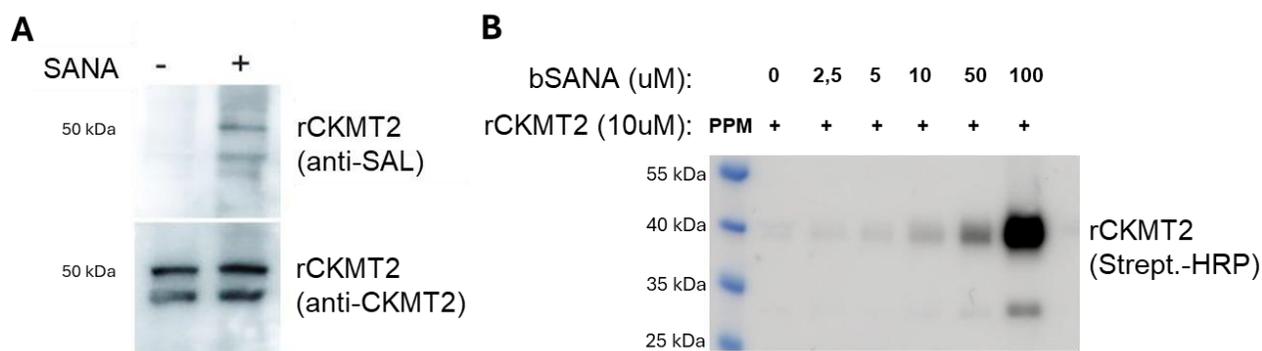


Figura 42. Análisis por WB de la interacción SANA-CKMT2 *in vitro*. **A:** Co-detección de CKMT2 murina recombinante (rCKMT2) expresada en células HEK-293, utilizando anticuerpos primarios contra salicilato (anti-SAL) y CKMT2 (anti-CKMT2) en presencia (+) o ausencia (-) de SANA. **B:** 10 uM de rCKMT2 expresada en *Escherichia coli* y purificada se trató con SANA biotinilado (bSANA) a 2.5, 5, 10, 50 y 100 uM por 1 h a 25 °C. La detección se realizó con estreptavidina conjugada a HRP (Strep.-HRP). A y B: Revelado mediante quimioluminiscencia usando un equipo ImageQuant 800.

Posteriormente se prosiguió a identificar los sitios de modificación por SANA en la proteína CKMT2 recombinante *in vitro* por nano HPLC/MS. Dado que el proceso de ruptura de las células produce la liberación de tioles de baja masa molecular abundantes como el glutatión que serían capaces de secuestrar al SANA, fue necesario buscar una alternativa para disminuir esta reacción no deseada. Para eso, el lisado de células HEK-293 fue pasado a través de un filtro de 10 kDa antes de la incubación con el fármaco. La reacción se realizó en una solución tampón AMBIC 50 mM, pH 8.0, a 25 °C por 30 min con concentraciones de SANA de 10 y 100 uM, resultando en una relación molar de 10:1 y 100:1 respectivamente con la proteína. Las mezclas de reacción fueron filtradas nuevamente usando el mismo punto de corte de 10 kDa con el objetivo de eliminar el exceso de SANA y así disminuir la reactividad asociada a la exposición de residuos durante la digestión con tripsina. Utilizando una estrategia de shotgun se identificó un promedio de aproximadamente 1000 proteínas únicas en los lisados de células HEK293 tratados incubados con

10 y 100 uM de SANA, estando la proteína CKMT2 recombinante entre las 50 de mayor abundancia teniendo en cuenta el NSAF.

Como resultado de la incubación del lisado celular con SANA a 10 uM se identificaron 84 secuencias modificadas con SANA en residuos de cisteína (13%), de las 626 secuencias totales identificadas que contenían este residuo, con al menos 2 espectros. Mientras que sólo 9 (0.2%) de las 4339 secuencias que contenían histidina se encontraron modificadas. Como era de esperar, la incubación con 100 uM de SANA generó una tasa más alta de residuos de Cys e His modificados. En este caso, el 82% de las secuencias que contenían cisteínas y el 1.5% de las que contenían histidinas se encontraron modificadas con SANA.

La identificación peptídica de CKMT2 murina recombinante señaló a la Cys<sub>238</sub>, contenida en el péptido LIDDHFLFDKPVSPLLTC<sub>[SANA]</sub>AGMAR, como blanco preferencial del SANA con 6 espectros asignados en cada una de las dos concentraciones de SANA utilizadas (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Las cisteínas 317 y 397 también se encontraron modificadas en menor medida y no se identificó ningún residuo de histidina unido a SANA.

Tabla 8. Análisis por nano HPLC/MS de la reacción *in vitro* de SANA con la CKMT2 murina recombinante en células HEK-293.

Secuencia	CKMT2 Cys #	10 uM SANA	100 uM SANA
		# espectros	# espectros
LIDDHFLFDKPVSPLLTC <sub>[SANA]</sub> AGMAR	238	6	6
LGYILTC <sub>[SANA]</sub> PSNLGTGLR	317	2	4
SEVELVQIVIDGVNYLVDC <sub>[SANA]</sub> EK	397	0	4
[SANA]: +209.0320 Da			

En suma, los resultados obtenidos demuestran la modificación covalente de CKMT2 recombinante por el SANA *in vitro*, confirmada mediante WB y nano HPLC/MS. La Cys<sub>238</sub> resultó ser el principal residuo modificado por el SANA. Estos hallazgos proporcionan información valiosa para comprender las vías de acción del fármaco. Además, pueden servir como base para su

optimización, o la de otros candidatos farmacológicos relacionados, integrando estrategias de modelado molecular, ingeniería de proteínas y diseño químico racional.

**3.5. Manuscrito: "A nitroalkene derivative of salicylate alleviates diet-induced obesity by activating creatine metabolism and non-shivering thermogenesis"**



Preprints are preliminary reports that have not undergone peer review.  
They should not be considered conclusive, used to inform clinical practice,  
or referenced by the media as validated information.

# A nitroalkene derivative of salicylate alleviates diet-induced obesity by activating creatine metabolism and non-shivering thermogenesis

**Carlos Escande** (✉ [escande@pasteur.edu.uy](mailto:escande@pasteur.edu.uy))

Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Karina Cal**

Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Alejandro Leyva**

Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Jorge Rodriguez-Duarte**

Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Santiago Ruiz**

Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay <https://orcid.org/0000-0002-2626-6160>

**Leonardo Santos**

Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Lucía Colella**

Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Mariana Ingold**

Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay <https://orcid.org/0000-0003-0901-6941>

**Cecilia Vilaseca**

Facultad de Medicina-UdelaR / Uruguay

**German Galliussi**

Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Lucía Ziegler**

CURE-UdelaR / Uruguay

**Thais Peclat**

Mayo Clinic <https://orcid.org/0000-0002-8907-5548>

**Mariana Bresque**

Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Rachel Handy**

University of Guelph / Canada

**Rachel King**

West Virginia University / USA

**Larisa Menezes dos Reis**

University of Campinas <https://orcid.org/0000-0003-1597-0176>

**Camila Espasandin**

Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Peter Breining**

Aarhus University

**Rosina Dapuyo**

Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Andres Lopez**

CENUR-UdelaR / Uruguay

**Katie Thompson**

Mayo Clinic

**Guillermo Agorrody**

Facultad de Medicina-UdelaR / Uruguay

**Evan DeVallance**

West Virginia University / USA

**Ethan Meadows**

West Virginia University / USA

**Sara Lewis**

West Virginia University / USA

**Gabriele Santana Barbosa**

Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis-UFRJ / Brazil

**Leonardo Osbourne Lai de Souza**

Laboratory of Bioenergetics and Mitochondrial Physiology, Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, UFRJ / Brazil

**Marina Santos Chichierchio**

Laboratory of Bioenergetics and Mitochondrial Physiology, Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, UFRJ / Brazil <https://orcid.org/0000-0002-3844-4788>

**Valeria Valez**

Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Udelar / Uruguay

**Adrian Aicardo**

Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Udelar / Uruguay  
<https://orcid.org/0000-0003-0226-204X>

**Paola Contreras**

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Udelar / Uruguay <https://orcid.org/0000-0001-9415-5393>

**Mikkel Vendelbo**

Department of Nuclear Medicine and PET, Aarhus University Hospital / Denmark

**Steen Jakobsen**

Department of Nuclear Medicine and PET, Aarhus University Hospital / Denmark

**Andres Kamaid**

Laboratory of Vascular Biology and Drug development, Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Williams Porcal**

Laboratory of Vascular Biology and Drug development, Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Aldo Calliari**

Laboratory of Metabolic Diseases and Aging, Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

**Jose Verdes**

Unidad Patología, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República / Uruguay

**Jianhai Du**

Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Department of Biochemistry, West Virginia University, Morgantown / USA

**Yekai Wang**

Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Department of Biochemistry, West Virginia University, Morgantown / USA

**John Hollander**

Division of Exercise Physiology, West Virginia University, Morgantown / USA

**Thomas White**

Mayo Clinic <https://orcid.org/0000-0001-7372-0306>

**Rafael Radi**

Universidad de la República, Montevideo

**Guillermo Moyna**

Laboratorio de Físicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, CENUR, Udelar / Uruguay

**Celia Quijano**

Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Udelar / Uruguay  
<https://orcid.org/0000-0001-9254-7123>

**Robert O'Doherty**

Department of Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Microbiology and Molecular Genetics; University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania / USA

**Pedro Manoel Moraes-Vieira**

University of Campinas, São <https://orcid.org/0000-0002-8263-786X>

**Graham Holloway**

University of Guelph

**Roberta Leonardi**

Department of Biochemistry and Molecular Medicine, West Virginia University, Morgantown, WV / USA

**Marcelo Mori**

Institute of Biology, University of Campinas (Unicamp) <https://orcid.org/0000-0001-7112-5263>

**Juliana Camacho-Pereira**

Laboratory of Bioenergetics and Mitochondrial Physiology, Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro / Brazil.

**Eric Kelley**

University of Pittsburgh

**Rosario Duran**

Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo, IIBCE / Uruguay.

**Gloria Lopez**

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Udelar / Uruguay. <https://orcid.org/0000-0001-7515-3915>

**Carlos Batthyany**

Laboratory of Vascular Biology and Drug development, Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay  
<https://orcid.org/0000-0002-0627-1982>

**Eduardo Chini**

Mayo Clinic <https://orcid.org/0000-0003-1555-4834>

---

**Article**

**Keywords:** Adipose tissue, obesity, creatine, thermogenesis, energy expenditure, salicylate derivative

**Posted Date:** July 12th, 2023

**DOI:** <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3101395/v1>

**License:**  This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.  
[Read Full License](#)

**Additional Declarations:** **Yes** there is potential Competing Interest. GVL, CB, and CE hold shares in EOLO USA Inc. ENC acts as a scientific advisor for EOLO USA Inc. KC, MB, LS and MI are employed by EOLO USA Inc. SANA is currently under Phase I clinical trial under the name of MVD1, sponsored by EOLO USA Inc.

---

1

2 **A nitroalkene derivative of salicylate alleviates diet-induced obesity**  
3 **by activating creatine metabolism and non-shivering thermogenesis.**

4

5 Karina Cal<sup>\*1,28</sup>, Alejandro Leyva<sup>\*2,3</sup>, Jorge Rodríguez-Duarte<sup>1,2</sup>, Santiago Ruiz<sup>1</sup>, Leonardo  
6 Santos<sup>1</sup>, Lucía Colella<sup>2,27</sup>, Mariana Ingold<sup>2,27</sup>, Cecilia Vilaseca<sup>4</sup>, German Galliussi<sup>2,5</sup>, Lucía  
7 Ziegler<sup>6</sup>, Thais R. Peclat<sup>7,8,9</sup>, Mariana Bresque<sup>1</sup>, Rachel M Handy<sup>10</sup>, Rachel King<sup>11</sup>, Larissa  
8 Menezes dos Reis<sup>12</sup>, Camila Espasandin<sup>1,13</sup>, Peter Breining<sup>14</sup>, Rosina Dapuzo<sup>1,2,15</sup>, Andrés  
9 Lopez<sup>16</sup>, Katie L. Thompson<sup>7,8,9</sup>, Guillermo Agorrodoy<sup>17</sup>, Evan DeVallance<sup>18</sup>, Ethan Meadows<sup>19</sup>,  
10 Sara E. Lewis<sup>18,19,35</sup>, Gabriele Catarine Santana Barbosa<sup>20</sup>, Leonardo Osbourne Lai de Souza<sup>20</sup>,  
11 Marina Santos Chichierchio<sup>20</sup>, Valeria Valez<sup>21,22,23</sup>, Adrián Aicardo<sup>22,23,24</sup>, Paola Contreras<sup>1,4</sup>,  
12 Mikkel H. Vendelbo<sup>14,25</sup>, Steen Jakobsen<sup>25</sup>, Andrés Kamaid<sup>2,3,26</sup>, Williams Porcal<sup>2,27</sup>, Aldo  
13 Calliari<sup>1,28</sup>, José Manuel Verdes<sup>29</sup>, Jianhai Du<sup>19,30</sup>, Yekai Wang<sup>30</sup>, John M Hollander<sup>19,31</sup>, Thomas  
14 A. White<sup>7</sup>, Rafael Radi<sup>22,23</sup>, Guillermo Moyna<sup>16</sup>, Celia Quijano<sup>22,23</sup>, Robert O'Doherty<sup>32,33</sup>, Pedro  
15 Moraes-Vieira<sup>12</sup>, Graham P Holloway<sup>10</sup>, Roberta Leonardi<sup>11,19</sup>, Marcelo A Mori<sup>34</sup>, Juliana  
16 Camacho-Pereira<sup>20</sup>, Eric E. Kelley<sup>18,19,35</sup>, Rosario Duran<sup>3</sup>, Gloria V. Lopez<sup>\*2,27</sup>, Carlos Batthyány<sup>\*2</sup>,  
17 Eduardo N. Chini<sup>7,8,9,36</sup> #, Carlos Escande<sup>1</sup>#

18

19 **1-** Laboratory of Metabolic Diseases and Aging, **2-** Laboratory of Vascular Biology and Drug Development,  
20 and **5-** Laboratory of Immunoregulation and Inflammation; Institut Pasteur Montevideo, Uruguay

21 **3-** Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo, IIBCE, Uruguay.

22 **4-** Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Udelar, Uruguay.

23 **6-** Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, Centro Universitario Regional del Este, Udelar,  
24 Maldonado, Uruguay

25

- 26 **7-** Mayo Clinic Robert and Arlene Kogod Center on Aging, **8-** Department of Anesthesiology, **9-** Department  
27 of Physiology and Biomedical Engineering; Mayo Clinic, Rochester, MN, USA
- 28 **10-** Department of Human Health and Nutritional Sciences, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada
- 29 **11-** Department of Biochemistry and Molecular Medicine, West Virginia University, Morgantown WV,  
30 USA.
- 31 **12-** Laboratory of Immunometabolism, Department of Genetics, Evolution, Microbiology, and Immunology,  
32 Institute of Biology, University of Campinas, SP, Brazil; Department of Immunology, Institute of Biomedical  
33 Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil; Obesity and Comorbidities Research Center (OCRC),  
34 University of Campinas, SP, Brazil; Experimental Medicine Research Cluster (EMRC), University of  
35 Campinas, SP, Brazil.
- 36 **13-** Unidad Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Udelar, Uruguay
- 37 **14-** Department of Biomedicine, Aarhus University, Denmark
- 38 **15-** Área I+D Biomédico, CUDIM, Uruguay
- 39 **16-** Laboratorio de Físicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte,  
40 Udelar, Uruguay.
- 41 **17-** Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Udelar, Uruguay.
- 42 **18-** Department of Physiology and Pharmacology, **19-** Mitochondria, Metabolism and Bioenergetics  
43 Working Group; School of Medicine, West Virginia University, Morgantown, WV, USA
- 44 **20-** Laboratory of Bioenergetics and Mitochondrial Physiology, Institute of Medical Biochemistry Leopoldo  
45 de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.
- 46 **21-** Cátedra de Bioquímica y Biofísica, Facultad de Odontología, Udelar, Uruguay.
- 47 **22-** Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), **23-** Departamento de Bioquímica, Facultad de  
48 Medicina, Udelar, Uruguay.
- 49 **24-** Departamento de Nutrición Clínica, Escuela de Nutrición, Udelar, Uruguay.
- 50 **25-** Department of Nuclear Medicine and PET, Aarhus University Hospital, Denmark
- 51 **26-** Unidad de Bioimagenología Avanzada. Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay
- 52 **27-** Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Udelar, Uruguay.

53

54 **28-** Unidad Biofísica, Departamento de Biociencias, **29-** Unidad Patología, Departamento de Patobiología;  
55 Facultad de Veterinaria, Udelar, Uruguay  
56 **30-** Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Department of Biochemistry, West Virginia  
57 University, Morgantown, USA  
58 **31-** Division of Exercise Physiology, West Virginia University, Morgantown, USA  
59 **32-** Department of Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism, **33-** Department of Microbiology  
60 and Molecular Genetics; University of Pittsburgh, Pennsylvania.  
61 **34-** Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, SP, Brazil;  
62 Obesity and Comorbidities Research Center (OCRC), Campinas, SP, Brazil; Experimental Medicine  
63 Research Cluster (EMRC), Campinas, SP, Brazil; Instituto Nacional de Obesidade e Diabetes, Campinas,  
64 SP, Brazil.  
65 **35-** Center for Inhalation Toxicology (iTOX), School of Medicine, West Virginia University, Morgantown,  
66 USA.  
67 **36-** Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA.

68  
69

70 \* - Authors equally contributed to this work

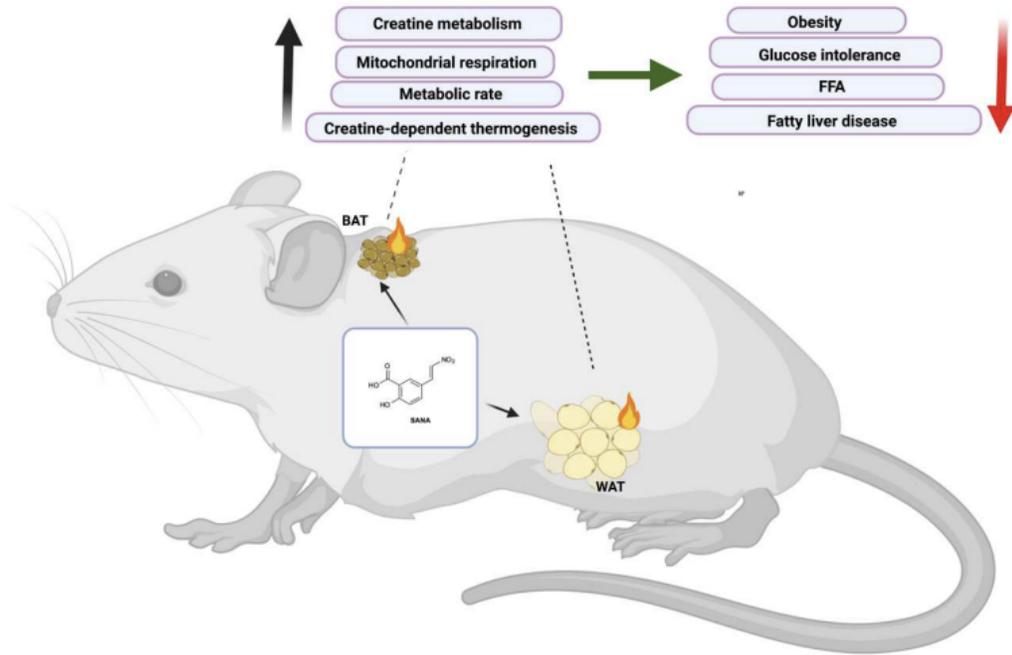
71 #- Corresponding authors:

72 Eduardo N. Chini: chini.eduardo@mayo.edu

73 Carlos Escande: escande@pasteur.edu.uy

74  
75  
76  
77  
78  
79

80 Graphical abstract



81

82

83

84

85 **Abstract**

86

87 Obesity-related type II diabetes (diabesity) has increased global morbidity and mortality  
88 dramatically. Previously, the ancient drug salicylate demonstrated promise for the treatment of  
89 type II diabetes, but its clinical use was precluded due to high dose requirements. In this study,  
90 we present a nitroalkene derivative of salicylate, 5-(2-nitroethenyl)salicylic acid (SANA), a  
91 molecule with unprecedented beneficial effects in diet-induced obesity (DIO). SANA reduces DIO,  
92 liver steatosis and insulin resistance at doses up to 40 times lower than salicylate. Mechanistically,  
93 SANA stimulated mitochondrial respiration and increased creatine-dependent energy expenditure  
94 in adipose tissue. Indeed, depletion of creatine resulted in the loss of SANA action. Moreover, we  
95 found that SANA binds to creatine kinases CKMT1/2, and downregulation CKMT1 interferes with  
96 the effect of SANA *in vivo*. Together, these data demonstrate that SANA is a first-in-class activator  
97 of creatine-dependent energy expenditure and thermogenesis in adipose tissue and emerges as  
98 a candidate for the treatment of diabesity.

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109 **Keywords**

110 Adipose tissue; obesity; creatine; thermogenesis; energy expenditure; salicylate derivative

111 **Introduction**

112

113 Obesity and its comorbidities, including type II diabetes and cardiovascular disease<sup>1</sup> are  
114 pandemic and thus a prime driver of healthcare burden worldwide. Whereas obesity is  
115 preventable via adoption of healthy nutrition and lifestyle, once the obese phenotype has been  
116 established it is difficult to reverse by behavioral changes. Therefore, there is a pressing need for  
117 developing novel pharmacologic strategies for prevention and treatment of obesity.

118

119 Salicylate, an ancient drug, and precursor of aspirin was used for more than a century to diminish  
120 inflammation and relieve pain. Salicylate (and aspirin) inhibits NFkB signaling and inflammation<sup>2</sup>.  
121 When administered at elevated doses (2-5 g/kg/day), it activates AMPK and improves metabolic  
122 dysfunction in obese mice, including modest effects in weight gain<sup>3-6</sup>. This salutary action  
123 combined with its safety profile, incentivized clinical trials to treat type II diabetes and  
124 cardiovascular disease. While these trials revealed improvement in basal glycemia, glycosylated  
125 hemoglobin and CRP levels, they were discontinued due to the excessive dose required (up to 4  
126 g/day) and the modest beneficial outcomes<sup>7-9</sup>. Nevertheless, the widespread use of salicylate,  
127 especially in the last century in the form of aspirin which is consumed daily by half of the adult  
128 population in the USA<sup>10</sup>, provides a safety underpinning for the development of novel, affordable,  
129 safe, and more effective salicylate-derived drugs.

130

131 Like salicylate, nitro fatty-acids have demonstrated pleiotropic salutary beneficial properties<sup>11-14</sup>,  
132 including beneficial metabolic effects during obesity<sup>13-15</sup>. Recently, we showed that the nitroalkene  
133 group can be moved to molecular scaffolds with known pharmacological effects that are  
134 structurally different from fatty acids. Re-localization of the nitroalkene group to these molecules  
135 allowed us to establish three concepts. First, the beneficial signaling properties of the nitroalkene  
136 group were preserved in the new molecules. Second, the accepting scaffold could play a role in

6

137 improving the pharmacological properties of the nitroalkene group; and third, in some cases there  
138 are emergent properties in the new molecules that could not be predicted before, probably due to  
139 the combined pharmacological effect of the nitroalkene group and the scaffold. These findings led  
140 us to show that novel nitroalkene-containing molecules were efficient in pre-clinical models of  
141 different diseases, such as ALS<sup>16</sup>, atherosclerosis<sup>17</sup>, and glucose intolerance during obesity<sup>18</sup>.  
142 Based on these concepts and taking into consideration the well-known actions of salicylate on  
143 inflammation and metabolism regulation<sup>6-9,19</sup> we designed a nitroalkene derivative of salicylate, 5-  
144 (2-nitroethenyl)salicylic acid (SANA) and assessed its metabolic effects in murine DIO. Our data  
145 demonstrate that SANA promotes weight loss and protects against DIO, insulin resistance,  
146 hypertriglyceridemia, and liver steatosis. Notably, these effects are markedly greater than those  
147 obtained with salicylate, using effective doses up to forty times lower. Mechanistically, we found  
148 that SANA stimulates creatine metabolism and non-shivering thermogenesis in adipose tissue,  
149 increasing energy expenditure. Untargeted proteomics identified CKMT1/2 as molecular targets  
150 of SANA. *Ckmt1* KO mice demonstrated impaired thermoregulation after SANA treatment, that  
151 was rescued by thermoneutral housing. SANA is a first-in-class activator of creatine-dependent  
152 energy expenditure and non-shivering thermogenesis in adipose tissue, providing evidence that  
153 stimulation of this pathway may be suitable for the treatment of obesity and its metabolic  
154 complications.

155

156

157

158

159

160 **Results**

161

162 **The synthetic salicylate derivative SANA (5-(2-nitroethenyl)salicylic acid) prevents diet-**  
163 **induced obesity.**

164 The salicylate-based nitroalkene, 5-(2-nitroethenyl)salicylic acid (SANA), was obtained by a one-  
165 step synthetic route with ~93% yield (**Fig. 1A**). SANA showed similar biochemical (i.e., Michael  
166 addition reactions with low molecular weight thiol-containing compounds, **Fig. 1A**) and signaling  
167 properties to other nitroalkene compounds (**Supplementary Fig. 1**). Interestingly, SANA  
168 demonstrated protection from diet-induced obesity (DIO) (**Fig. 1B-F**), despite not affecting total  
169 food consumption (**Fig. 1G**). Importantly, SANA showed a maximum effect on obesity at doses  
170 where salicylate was ineffective (**Fig. 1C-F**). HPLC and MS analysis from plasma showed that the  
171 main metabolite was the saturated form of the molecule 5-(2-nitroethyl)salicylic acid (M1)  
172 (**Supplementary Fig. 1**). Treatment of mice with 5-(2-nitroethyl)salicylic acid had no effect on DIO  
173 and glucose management, confirming the need of the reactive nitroalkene group for the metabolic  
174 effect of SANA (**Supplementary Fig. 1**). Interestingly, treatment of mice with (E)-4-(2-nitrovinyl)  
175 benzoic acid (BANA), a nitroalkene benzoic acid derivative (that only lacks the hydroxyl group of  
176 the benzoic ring) and has well-documented protective actions in ALS disease models<sup>16</sup> had no  
177 effect on DIO and glucose homeostasis (**Supplementary Figure 1**), suggesting that that the  
178 nitroalkene group is necessary but not sufficient, and highlighting the role of the combination of  
179 the scaffold plus the nitroalkene group in the pharmacological effect of SANA. Protection against  
180 DIO by SANA was due to decreased fat accumulation in all adipose depots analyzed (**Fig. 1H-J**),  
181 paralleled by an increase in the percent of lean mass in the SANA-treated mice (**Fig. 1K**).

182

183 **SANA protects mice from DIO-associated glucose intolerance and fatty liver disease.**

184 While assessing the metabolic consequences of DIO, we found that livers from HFD mice treated  
185 with SANA had normal macroscopic appearance, indistinguishable from lean, age-matched

186 control mice (**Fig. 2A**). Histologic analysis of livers confirmed these findings, revealing that mice  
187 treated with SANA showed no signs of liver steatosis (**Fig. 2B**). Examination of livers revealed  
188 SANA treatment abrogated DIO-mediated elevation in total liver weight induced by HFD (**Fig. 2C**).  
189 Analysis of liver transaminases in plasma showed complete protection from obesity-related liver  
190 damage (**Fig. 2D**). Assessment of glucose management after DIO revealed that SANA protected  
191 mice from elevated blood glucose levels (**Fig. 2E**). Furthermore, SANA improved impaired  
192 glucose tolerance (GTT) and made it indistinguishable from lean age-matched controls and  
193 significantly better than obese mice treated with salicylate (HFD+SAL) (**Fig. 2F-G**). Obese mice  
194 treated with SANA showed improved insulin, free fatty acid (FFA) and leptin levels (**Fig. 2H-J**).  
195 AMPK activation by salicylate and SANA occurred at similar doses both *in vitro* and *in vivo*  
196 (**Supplementary Fig. 2**), indicating that enhanced AMPK activation by SANA is unlikely to  
197 account for most of its effects, thus suggesting other mechanisms might be operative.  
198 Biodistribution analysis performed by <sup>11</sup>C-SANA followed by PET-MRI scan revealed detectable  
199 SANA in inguinal white adipose tissue (**Supplementary Fig. 2**). Importantly, the optimized  
200 formulation of SANA via complete solubilization and pH-dependent stabilization afforded capacity  
201 to achieve tissue concentrations like oral powder administration. Doses as low as 10-20  
202 mg/kg/day provided concomitant protective effects on weight gain, fasting blood glucose levels  
203 and glucose tolerance (**Fig. 2K-O**, 10 mg/kg/day, gavage, and **Supplementary Fig. 2**, 20  
204 mg/kg/day, SC).

205

206 **SANA is effective in treating obesity, glucose intolerance and liver steatosis.**

207 Addressing DIO and metabolic complications once they are established is more representative of  
208 the current clinical need in humans. As such, SANA was administered after obesity was  
209 established (5 weeks of HFD). SANA-treated mice lost weight (**Fig. 3A-C**), demonstrated  
210 diminished basal glycemia (**Fig. 3D**), improved glucose tolerance (**Fig. 3E**), and showed no signs  
211 of hepatic steatosis (**Fig. 3F-H**). Importantly, SANA (200 mg/kg/day) not only promoted weight

212 loss, but also showed increased effectiveness compared to salicylate (200 mg/kg/day) and  
213 metformin (300 mg/kg/day) in glycemic control during the 3-week period studied (**Fig. 3I-K**). No  
214 signs of toxicity were found during the treatments. Water consumption, stools and urine  
215 production were not affected by SANA (**Supplementary Fig.3**). Analysis of renal histology and  
216 function (creatinine clearance) showed no signs of kidney damage (**Supplementary Fig. 3**).  
217 Indeed, continuous administration of SANA for up to twenty-five weeks resulted in not a single  
218 mortality case in mice (n=15 per experimental group), highlighting not only the efficacy but also  
219 the safety of the compound at the tested doses.

220

221 **Proteomic analysis from inguinal white adipose tissue (iWAT) and mitochondria shows a**  
222 **signature of creatine metabolism and non-shivering thermogenesis in response to SANA.**

223 The phenotype triggered by SANA pointed to increased energy expenditure in adipose tissue as  
224 a putative mechanism of action. Based on the recent emergence of novel thermogenic pathways,  
225 we used unbiased proteomic analysis in iWAT as a discovery approach. Label-free quantitative  
226 proteomic analysis in iWAT of mice revealed a consistent shift in the pattern of protein expression  
227 between obese mice and obese mice treated with SANA (**Fig. 4A**). Proteins uniquely detected in  
228 HFD or HFD+SANA, as well as those differentially abundant between conditions were pinpointed  
229 (**Fig. 4B and C; Supplementary Tables I and II**). Combined, 109 proteins were increased in  
230 HFD+SANA iWAT tissue. KEGG pathway enrichment analysis showed that SANA stimulated  
231 catabolism, oxidative phosphorylation, and thermogenesis (**Fig. 4D; Supplementary Table III**).  
232 Isolated adipocytes from mice treated with SANA demonstrated increased mitochondrial  
233 respiration (**Fig. 4E-F**), consistent with the signature from tissue proteomic data. SANA had no  
234 direct effect on respiration in isolated brain or brown adipose tissue mitochondria *in vitro*  
235 (**Supplementary Fig. 4-5**) or in non-adipose cells in culture (**Supplementary Fig. 4**). Next, we  
236 extended the proteomic analysis to isolated mitochondria from iWAT. Heatmap and differential  
237 analyses from mitochondrial proteomes showed a dramatic change in the protein expression

238 profile among treatments (**Fig. 4G-I; Supplementary Tables IV and V**). In this case, 380 proteins  
239 were identified as statistically overrepresented in HFD+SANA (**Fig. 4H-I**). Pathway enrichment  
240 analysis showed that thermogenic, metabolic and TCA cycle, arginine-, glycine- and proline-  
241 related metabolic pathways were up-regulated by SANA (**Fig. 4J; Supplementary Table VI**).  
242 These results resembled those previously described<sup>20</sup> after cold-induced thermogenesis in mice  
243 and pointed to creatine-dependent thermogenesis. Interestingly, among the proteins detected  
244 only after SANA treatment, GATM (Glycine amidinotransferase), the rate-limiting step in creatine  
245 synthesis (**Fig. 4H**), and the creatine kinase CKM were present (**Fig. 4B**). Consistent with the  
246 metabolic signature of creatine-dependent thermogenesis described previously<sup>20</sup> and the up-  
247 regulation of GATM (**Fig. 4H**), we found a significant increase in creatine and P-creatine levels in  
248 iWAT from SANA-treated mice (**Fig. 4K-L**).

249

250 **SANA stimulates thermogenesis in the absence of UCP1 activation, an effect that is**  
251 **abolished when creatine metabolism is impaired *in vivo*.**

252 In line with the proteomic signature, thermal images showed that SANA-treated mice had  
253 increased surface temperature, not only in their backs, but also in the interscapular space,  
254 corresponding to brown adipose tissue (BAT, **Fig. 5A**). Tissue microscopic analysis in iWAT  
255 showed an appearance consistent with a beigeing phenotype triggered by SANA (**Fig. 5B**).  
256 Indeed, SANA stimulated <sup>18</sup>F-FDG uptake *in vivo* in iWAT (**Supplementary Fig. 5**). Gene  
257 expression profiles in iWAT, showed that SANA stimulated the expression of *Ckmt1* as well as  
258 *Ckm* (**Fig. 5C**). Other genes involved in creatine metabolism, transport and synthesis including  
259 *Ant1*, *Gatm*, *Oat*, *Prodh* and *CrT* were up-regulated by SANA (**Fig. 5C**). *Ucp1* was down-regulated  
260 in mice treated with SANA when measured by mRNA (**Fig. 5C**), but no significant changes were  
261 observed by western blot (**Fig. 5D**). The thermogenesis-related genes *Cidea*, *Prdm16* and *Pgc1a*  
262 were also up-regulated by SANA (**Fig. 5C**). Importantly, treatment of differentiated human white  
263 adipocytes with SANA stimulated the expression of regulators of creatine metabolism, including

264 CKMT1 and CKMT2 (**Fig. 5E, left**), as well as mitochondrial respiration (**Fig. 5E, right**). SANA  
265 also stimulated the expression of genes involved in creatine metabolism and thermogenesis in  
266 brown adipose tissue (BAT). Different from iWAT, the creatine kinases up-regulated by SANA in  
267 BAT were *Ckm* and *Ckmt2*. Other thermogenesis-related genes, like *Cidea*, *Pgc1a*, *Gatm* and  
268 *Prodh* were up-regulated in BAT, whereas *Ucp1* was not altered (**Fig. 5F**). These changes in gene  
269 expression profile in BAT were reflected by increased creatine (**Fig. 5G**) and creatine kinase  
270 activity in isolated mitochondria (**Fig. 5H**). Measurements of respiration in isolated mitochondria  
271 showed that SANA increased state II respiration (**Fig. 5I**). However, BAT mitochondrial respiration  
272 inhibited by GDP (**Fig. 5J**) and stimulated after titration with oleate (**Fig. 5K**), attributed to UCP1  
273 activity<sup>21</sup>, was not altered by SANA, supporting that increased state II respiration was not  
274 dependent on UCP1 regulation. Direct addition of SANA to BAT isolated mitochondria also had  
275 no effect on GDP-dependent respiration (**Supplementary Fig.5**). To further support the  
276 thermogenic potential of SANA, we performed cold challenge experiments. Mice treated with  
277 SANA (20 mg/kg SC, for 5 days) exposed to cold showed improved thermogenic response  
278 compared to controls (**Fig. 5L**), which was reflected in significantly increased creatine levels in  
279 iWAT (**Fig. 5M**) and up-regulation of creatine kinases and thermogenic markers (**Supplementary**  
280 **Fig.5**). To confirm that the improved response to cold was dependent on creatine, mice were  
281 treated with the creatine depleting drug  $\beta$ -guanidinopropionic acid ( $\beta$ -GPA)<sup>22</sup>, which can only be  
282 used acutely as chronic exposure can induce weight loss<sup>20,22</sup>. Mice were treated with SANA (20  
283 mg/kg/day, SC) or SANA+ $\beta$ -GPA daily (0.4 mg/kg/day, IP) for 5 days. No changes in body weight  
284 or food consumption were detected among treatments (**Supplementary Fig. 5**). Treatment with  
285  $\beta$ -GPA abolished the effect of SANA on thermogenic response, confirming that creatine is  
286 necessary for the effect of SANA on thermogenesis (**Fig. 5N**). Muscle activity was also assessed  
287 during cold exposure. Electromyographic analysis showed that shivering thermogenesis was not  
288 affected by SANA (**Fig. 5O**). Since creatine is a major muscle metabolite, we tested the potential  
289 for SANA to affect muscle function. Aerobic muscle capacity was performed and revealed that

290 SANA did not impact muscle physiology (**Supplementary Fig. 5**). Creatine kinase expression  
291 and mitochondrial function in skeletal muscle and cells was not affected by SANA, although there  
292 was a significant increase in muscle creatine levels (**Supplementary Fig. 5**). Furthermore,  
293 treatment with SANA did not generate any observable deleterious effects on cardiac function and  
294 had no effect on heart mitochondrial function (**Supplementary Fig. 5**).

295

296 **SANA stimulates energy expenditure and protects against obesity under thermoneutral**  
297 **conditions.**

298 One caveat of envisioning thermogenesis as a suitable approach to treat obesity in humans is  
299 that they spend most of their time under thermoneutral conditions. Interestingly, disruption of  
300 creatine metabolism in adipose tissue decreases energy expenditure and promotes obesity in  
301 thermoneutrality<sup>23,24</sup>. Administration of SANA under thermoneutral conditions (**Fig. 6A**) also  
302 protected against DIO (**Fig. 6B**), with no effect on accumulated food intake (**Fig. 6C**). SANA was  
303 also effective in preventing diet-induced hyperglycemia (**Fig. 6D**) and glucose intolerance (**Fig.**  
304 **6E**), further supporting that SANA may be a suitable treatment for obesity under thermoneutral  
305 conditions. To clearly determine that increased energy expenditure due to thermogenesis is a  
306 driving force for the protection against obesity but not a side effect of differences in body weight,  
307 we followed a protocol of acute HFD feeding (**Fig. 6F**) as previously described<sup>24</sup>. During this short  
308 treatment there was no difference in weight gain among groups (**Fig. 6G**). However, thermal  
309 imaging showed that SANA promoted heat dissipation (**Fig. H-I**). Consistently, mice treated with  
310 SANA during acute HFD feeding showed a slight but consistent increase in energy expenditure  
311 (EE) (**Fig. 6J-K**) that became statistically significant when the difference between basal (before  
312 HFD) and HFD-stimulated EE was calculated (**Fig. 6L**). These results are consistent with previous  
313 reports showing that the HFD is necessary for activation of creatine metabolism and energy  
314 expenditure in adipose tissue<sup>24</sup>. Indeed, treatment of mice with SANA fed with normal chow  
315 showed no changes in EE (**Supplementary Fig. 6**). To further confirm our results, we

316 administered the  $\beta$ 3-adrenergic agonist CL316,243 after 3 days of acute HFD feeding. Single  
317 treatment with CL316,243 stimulated a transient increase in EE, which was significantly increased  
318 in SANA-treated mice, irrespective of body weight, as shown by ANCOVA analysis (**Fig. 6M-N**).  
319 Additionally, after acute HFD feeding at 28°C, the mice were exposed to cold and surface  
320 temperature was assessed. Mice treated with SANA showed increased heat dissipation  
321 measured by thermal imaging (**Fig. 6O-P**).

322

323 **Unbiased search for SANA-binding proteins followed by *in vivo* confirmation identified**  
324 **CKMT1/2 as putative targets of SANA.**

325 Finally, we identified putative targets of SANA by unbiased pull-down of SANA-binding proteins  
326 followed by MS protein identification (**Fig. 7A**). We designed and synthesized a biotin-bound  
327 SANA (bSANA), maintaining its reactive nitroalkene function (**Fig. 7B**) and seek for SANA binding  
328 proteins in BAT. MS analysis showed that bSANA bound to ~300 proteins. Interestingly, CKMT  
329 was among the top proteins bound to bSANA (**Fig. 7C and Supplementary Table VII**). The high  
330 level of similarity between CKMT1 and 2 did not allow for complete discrimination by MS  
331 (**Supplementary Table VII**). Interestingly, *Ckmt1* and *Ckmt2* are up regulated by SANA in iWAT  
332 and BAT, respectively (**Fig. 5**) and during cold challenge in BAT (**Supplementary Fig. 7**).  
333 Importantly, both *Ckmt1* and *Ckmt2* are up-regulated (together with *Ckb*) upon forskolin treatment  
334 in differentiated human brown adipocytes *in vitro*, and both kinases (*Ckmt1* and *Ckmt2*) are up-  
335 regulated during cold exposure *in vivo* (**Supplementary Fig. 7**). Finally, we tested the effect of  
336 SANA on *Ckmt1* KO mice during short-term HFD. To our surprise, we found that when mice were  
337 kept at room temperature (RT), *Ckmt1* KO mice showed ~50% of mortality rate after SANA  
338 treatment. No mortality occurred in WT mice (**Fig. 7D**). The effect on mortality was rescued when  
339 *Ckmt1* KO mice were acclimated at thermoneutrality during the treatment with SANA, showing  
340 that SANA is functionally interacting with CKMT1 and affecting thermoregulation *in vivo*.

341 Additionally, the glucose lowering effect of SANA at thermoneutrality was lost in *Ckmt1* KO mice  
342 (**Fig. 7E**), further supporting the role of CKMT1 in SANA-driven effect.

343

344

345 **Discussion**

346

347 Obesity and its metabolic complications are a challenging problem for pharmaceutical  
348 interventions. The multifactorial causes of obesity, and the need for long-term interventions with  
349 associated side effects highlight the necessity for constant pharmacological innovation. The  
350 irruption of the GLP-1 mimetics provides hope for effective and safe treatments for obesity<sup>25</sup>.  
351 However, the massive use of GLP-1 agonists is under pharmacological surveillance, and  
352 evidence about long term safety, efficacy and compliance are still being collected. In that sense,  
353 developing alternative and even complementary approaches is of need. The use of novel hybrid  
354 drugs based on well-designed modifications of safe and inexpensive compounds may provide a  
355 suitable way to provide massive, safe, and affordable therapies for this pandemic disease.

356

357 The current study addressed the effects of a derivative of the ancient and long-time used drug  
358 salicylate, 5-(2-nitroethenyl) salicylic acid, on the prevention and treatment of DIO and its related  
359 metabolic abnormalities. The data demonstrate that: 1) SANA is effective for weight loss and  
360 weight gain prevention, 2) the primary metabolic abnormalities associated with obesity are  
361 improved by SANA, 3) the beneficial effects of SANA are substantially greater than those obtained  
362 with salicylate 4) the effects of SANA are mediated by stimulation of adipose tissue mitochondrial  
363 respiration, 5) SANA protects against DIO at thermoneutral conditions, situation closely related to  
364 normal human environmental conditions, and 6) a primary target of SANA is creatine metabolism  
365 in adipose tissue and non-shivering thermogenesis, through a direct binding and regulation of  
366 CKMT1/2.

367 Several reports have shown the salutary effects of salicylate in DIO<sup>3-5,26</sup> as well as novel important  
368 cell signaling properties<sup>6,19</sup>, promoting clinical trials aimed at using salicylate to treat chronic  
369 metabolic diseases. However, when studied in humans, the positive metabolic effects were

370 somewhat disappointing, leading to a loss of impetus for investigating their potential clinical use.  
371 A further issue was the high doses required, resulting in the development of side effects<sup>7-9</sup>.  
372 Remarkably, SANA is effective at doses that are up to 40x lower than salicylate. Together, these  
373 data suggest that clinical trials with SANA have the potential for more beneficial metabolic  
374 outcomes at substantially lower doses and with reduced side effects.

375

376 Activation of non-shivering thermogenesis, a homeostatic mechanism present in all mammals, is  
377 an attractive approach for treating obesity<sup>27</sup>, with several reports showing that adipose tissue-  
378 dependent thermogenesis is stimulated in humans after cold exposures<sup>28,29</sup>. Salicylate promotes  
379 thermogenic activity in murine BAT by UCP1-dependent and UCP1 independent mechanisms<sup>3-</sup>  
380 <sup>5,30</sup>. Salicylate also stimulates shivering thermogenesis in murine skeletal muscle<sup>5</sup>. Our analysis  
381 of adipose tissue indicated that the salutary effects of SANA are also associated with stimulation  
382 of non-shivering thermogenesis. Importantly, the effects are mediated through an increase in  
383 creatine-related energy expenditure, reminiscent of creatine-dependent thermogenesis<sup>31,32</sup>. In  
384 fact, SANA stimulates thermogenesis independently of detectable UCP1 activation (See Fig. 5)  
385 and does not directly uncouple of mitochondria as was proposed for salicylate<sup>4</sup>. SANA activated  
386 several key regulatory genes that have been identified as requisite to boost creatine metabolism  
387 in adipose tissue, including different creatine kinases and key enzymes for creatine synthesis.  
388 Disruption of creatine metabolism *in vivo* completely abolished the pro-thermogenic effect of the  
389 drug. SANA binds to the mitochondrial creatine kinases CKMT1/2. Further, our results show that  
390 SANA-induced thermogenesis is dependent on this interaction, since CKMT1 KO mice had  
391 compromised thermoregulatory capacity when treated with the compound (**Fig. 7**). Furthermore,  
392 when maintained at thermoneutrality, CKMT1 KO mice showed no response to SANA in glucose  
393 management (**Fig. 7**). Some of us recently proposed that CKMT1 is dispensable for mitochondrial  
394 function in white adipose cells, and CKMT1 KO mice have no alterations in metabolic parameters  
395 in normal or HFD feeding<sup>33</sup>. The fact that *Ckmt1* KO mice have diminished thermoregulatory

396 capacity when treated with SANA, suggests that CKMT1 plays a role in thermoregulation and that  
397 *Ckmt1* KO mice might develop compensatory mechanisms to cope with this deficiency. It also  
398 suggests that treatment with SANA somehow commits mice to creatine-dependent metabolism  
399 for thermoregulation, in detriment of other thermogenic pathways, compromising the flexibility of  
400 the thermogenic response. In fact, depletion of creatine *in vivo* not only abolished the effect of  
401 SANA on thermoregulation, but in some cases seemed to worsen it (**Fig. 5N**). Experimental  
402 evidence suggests the existence of a dynamic crosstalk between UCP1 and creatine-dependent  
403 thermogenic pathways where they seem to go in opposite directions<sup>20</sup>. It is plausible then, that  
404 hyperactivation of creatine metabolism in adipose tissue by SANA will impede the activation of  
405 UCP1 in case of need. This is an important issue to address and will deserve future investigation.  
406 Originally, CKMT1 was proposed to drive creatine phosphorylation in beige adipose tissue<sup>20</sup>.  
407 Recent findings from the same researchers proposed that CKB controls creatine-dependent  
408 thermogenesis in BAT<sup>34</sup>. However, the role of CKB in mitochondrial creatine metabolism<sup>35</sup>, and  
409 how creatine-dependent thermogenic cycle works has been questioned<sup>36,37</sup>. In human adipose  
410 cells CKB is exclusively located in the cytosol<sup>35</sup>, suggesting that the regulation of this pathway is  
411 complex and needs further investigation. On the other hand, several reports suggest that CKMT2  
412 is an important player in adipose tissue thermogenesis, i.e.: downregulation of *Ckmt2* in adipose  
413 cells decreases phosphocreatine levels<sup>35</sup>; silencing of  $\beta$ 3-adrenergic receptors in beige/brown  
414 adipose cells decreases both *Ckmt1* and *Ckmt2* expression<sup>38</sup>. Also, bile acids increase  
415 mitochondrial function in white adipocytes, stimulating a thermogenic program that is partially  
416 dependent on CKMT2 expression<sup>39</sup>. There is also evidence suggesting that downregulation of  
417 *Ckmt2* in skeletal muscle in hibernating bears is linked to metabolic reprogramming involving an  
418 increase in glycolysis<sup>40</sup>.

419 We found that in iWAT, SANA stimulated both *Ckmt1* and *Ckm* during DIO. However, in BAT,  
420 *Ckmt2* was the main kinase up regulated by SANA. While there is no evidence supporting that  
421 *Ckm* participates in creatine-dependent thermogenesis, the differential response among

422 treatments and tissues suggests that there may be some level of redundancy among contributory  
423 kinases, as well as differential responses between acute and chronic thermogenic activity. In fact,  
424 RNAseq analysis of human adipocyte cells<sup>41</sup> show that activation by forskolin promotes an  
425 increase in expression of more than one creatine kinase, which is also seen *in vivo* by cold  
426 exposure (**Supplementary Fig. 7**). Interestingly, an alternative model for creatine-dependent  
427 thermogenesis was recently proposed, mirroring its role in skeletal muscle, as a fast energy  
428 provider for Ca<sup>2+</sup> reuptake into the endoplasmic reticulum<sup>36</sup>. Under this proposal, two kinases,  
429 one mitochondrial and one cytosolic are necessary, and is compatible with our results with SANA,  
430 where *Ckm*, is systematically up-regulated. Interestingly, cold exposure promotes the increase of  
431 mitochondrial and cytosolic creatine kinases both in iWAT and BAT (**Supplementary Fig. 7**). A  
432 thermogenic model involving two kinases would also explain why both CKMT1 and CKB were  
433 sequentially proposed as regulators of creatine-dependent thermogenesis<sup>20,34</sup>. However,  
434 shedding light into this issue goes beyond the scope of this work and will certainly be part of future  
435 research. Furthermore, if SANA completely recapitulates the creatine-dependent thermogenesis  
436 pathway that is activated during cold exposure needs further investigation. In fact, when we  
437 studied cold response in BAT and iWAT in untreated mice, we also found that *Ckb* is up-regulated  
438 (**Supplementary Fig. 7**), despite this creatine kinase is not affected by SANA. It is plausible then,  
439 that the pharmacological pathway activated by the drug phenocopies the physiological  
440 thermogenic, cold-elicited creatine-dependent thermogenesis, but through activation of different  
441 kinases.

442 In summary, the current study presents compelling evidence that a nitroalkene-salicylate (SANA)  
443 is a potent drug for the treatment of diet-induced obesity, with a primary mechanism of action  
444 being the activation of creatine-dependent energy expenditure and thermogenesis in adipose  
445 tissue. Importantly, this activation also occurs at thermoneutrality, a condition that reflects  
446 everyday human life. This report provides the first evidence that boosting creatine metabolism in  
447 adipose tissue is an effective pathway to prevent and treat DIO. These observations reinvigorate

448 the possibility that chemical derivatives of salicylates may be suitable drugs for the treatment of  
449 obesity and associated metabolic abnormalities. Confident on this possibility, we are now  
450 conducting a FIH clinical trial with SANA (medical name for the trial is MVD1: "A Phase 1,  
451 Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, First in Human Study of the Safety, Tolerability,  
452 Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of single and multiple doses of MVD1 in healthy adult  
453 volunteers").

454

#### 455 **Conclusions**

456

457 Non-shivering thermogenesis is a homeostatic response present in mice and humans that can be  
458 subject of pharmacological stimulation. Boosting of creatine metabolism and thermogenesis in  
459 adipose tissue reveals a novel therapeutic opportunity for the treatment of metabolic diseases,  
460 including obesity, NAFLD, metabolic syndrome and type II diabetes. SANA is a potent activator  
461 of this pathway, revealing significant potential for clinical application. The feasibility of SANA as a  
462 drug for human consumption will depend on its safety and efficacy in patients. However, decades  
463 of accumulated data on the pharmacological properties and salutary actions of salicylate  
464 combined with preclinical data on SANA actions in mice lay the fertile foundation for further clinical  
465 development.

466

#### 467 **Author contributions**

468

469 Conceptualization, C.E., C.B. and G.V.L.; Methodology, C.E., C.B., G.V.L., E.N.C., E.E.K., A.K.  
470 and W.P.; Validation, C.E.; Formal Analysis, A.Leyva., R.Durán, K.C. and C.E.; Investigation,  
471 K.C., A.Leyva., J.R.D., S.R., L.C., M.I., L.S., C.V., G.G., L.Z., M.B., R.M.H., R.K., L.M.,  
472 C.Espasandin, R.Dapueto, T.R.P., A.Lopez., K.L.T., G.A., E.D., E.M., S.E.L, G.C.S.B., L.O.L.S.,  
473 M.S.C., J.C.P., V.V., A.A., P.C., M.H.V., S.J., A.K., A.C., J.D., Y.W. T.A.W. and R.L; Resources,

474 P.B., J.M.V., J.M.H., R.R., G.M., C.Q., P.M.M.M.V., G.P.H., R.L., E.E.K., R.Durán., M.A.M., and  
475 E.N.C.; Data Curation, K.C., A.Leyva, R.Durán. and T.A.W.; Writing – Original Draft, C.E., C.B.  
476 and G.V.L.; Writing – Review & Editing, C.E., C.B., G.V.L., E.N.C., E.E.K, R.O.D. K.C. , G.P.H and  
477 M.A.M; Visualization, C.E., K.C., A.Leyva., J.R.D. and S.R.; Supervision, C.E.; Project  
478 Administration, C.E., C.B., G.V.L. and K.C.; Funding Acquisition, C.E., C.B., G.V.L., E.N.C.,  
479 R.Duran., E.E.K., C.Q. and G.M.

480

#### 481 **Acknowledgements**

482

483 Supported by grants by ANII, CSIC, PEDECIBA and FOCEM (COF 03/11). JMH would like to  
484 thank the support of The National Heart, Lung, and Blood institute (NHLBI, R01 HL-128485, R01  
485 HL-168290) and the Community Foundation for the Ohio Valley Whipkey Trust. EEK was  
486 supported by National Institutes of Health (NIH) R01 DK124510-01 and R01 HL153532 and  
487 American Heart Association 19TPA34850089. RR was supported by Universidad de la República  
488 (Espacio Interdisciplinario) and CSIC. MAM was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa  
489 do Estado de São Paulo (2021/08354-2). RL was supported by National Institutes of Health  
490 (R35GM119528). CE and RD would like to thank Laura Reyes and CUDIM for technical  
491 assistance. The authors would like to thank the Animal Facility (UBAL) at the Institut Pasteur  
492 Montevideo and Amanda Barker Stewart, Animal Models, and Imaging Facility, WVU, for  
493 technical assistance; Mega Labs S.A. and Marcos Giusti for providing metformin. AL, LC, and MB  
494 were supported by scholarships from ANII (POS\_NAC\_2015\_1\_109491,  
495 POS\_NAC\_2016\_1\_129896 and POS\_NAC\_2015\_1\_109950, respectively). MB, GA, and CV  
496 were supported by CAP (Udelar). GG was supported by PROINBIO.

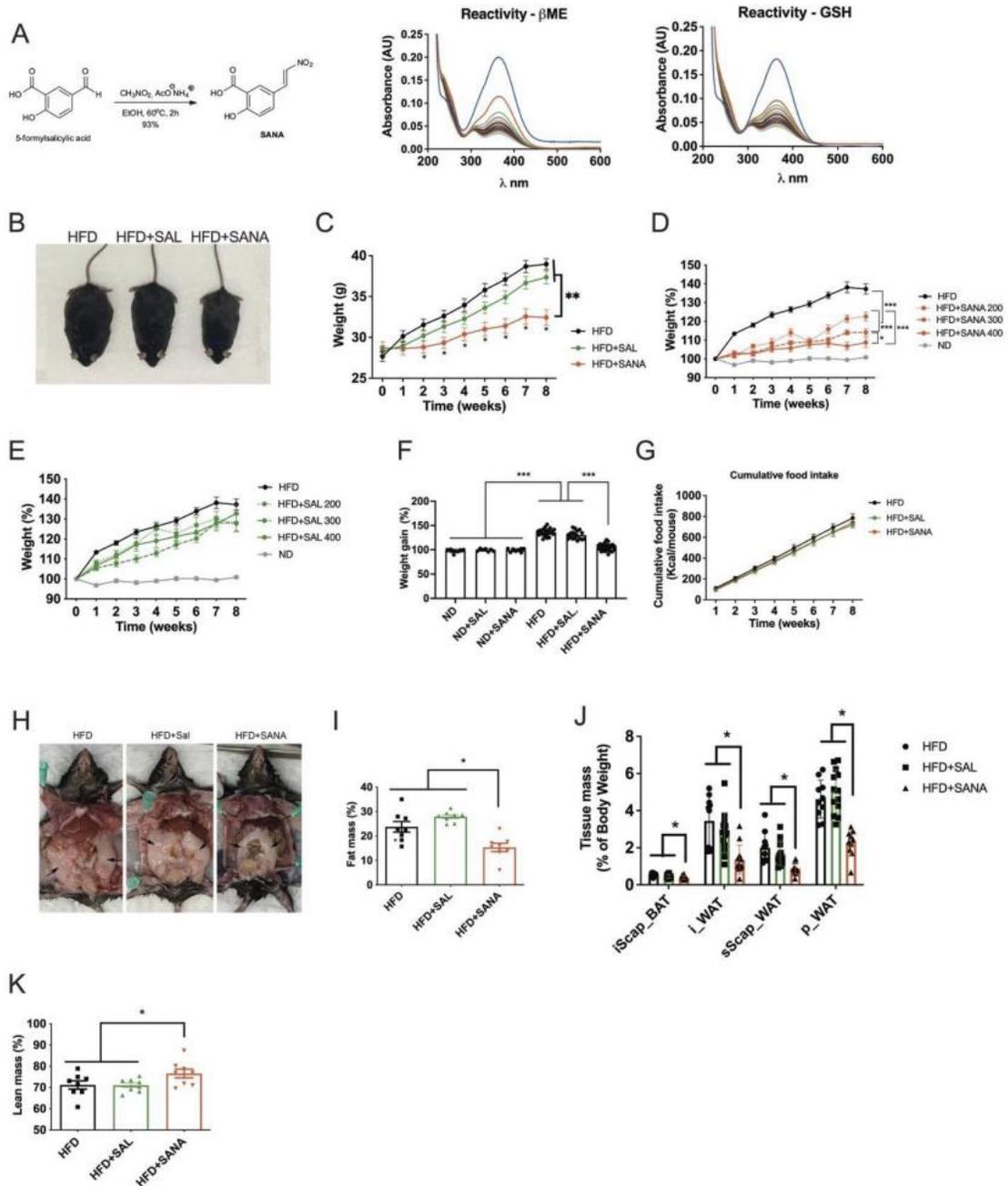
497

#### 498 **Conflict of interest**

499 GVL, CB, and CE hold shares in EOLO USA Inc. ENC acts as a scientific advisor for EOLO USA  
500 Inc. KC, MB, LS and MI are employed by EOLO USA Inc. SANA is currently under Phase I clinical  
501 trial under the name of MVD1, sponsored by EOLO USA Inc. ([ACTRN12622001519741](#))  
502  
503  
504  
505  
506

507

Figures and figure legends

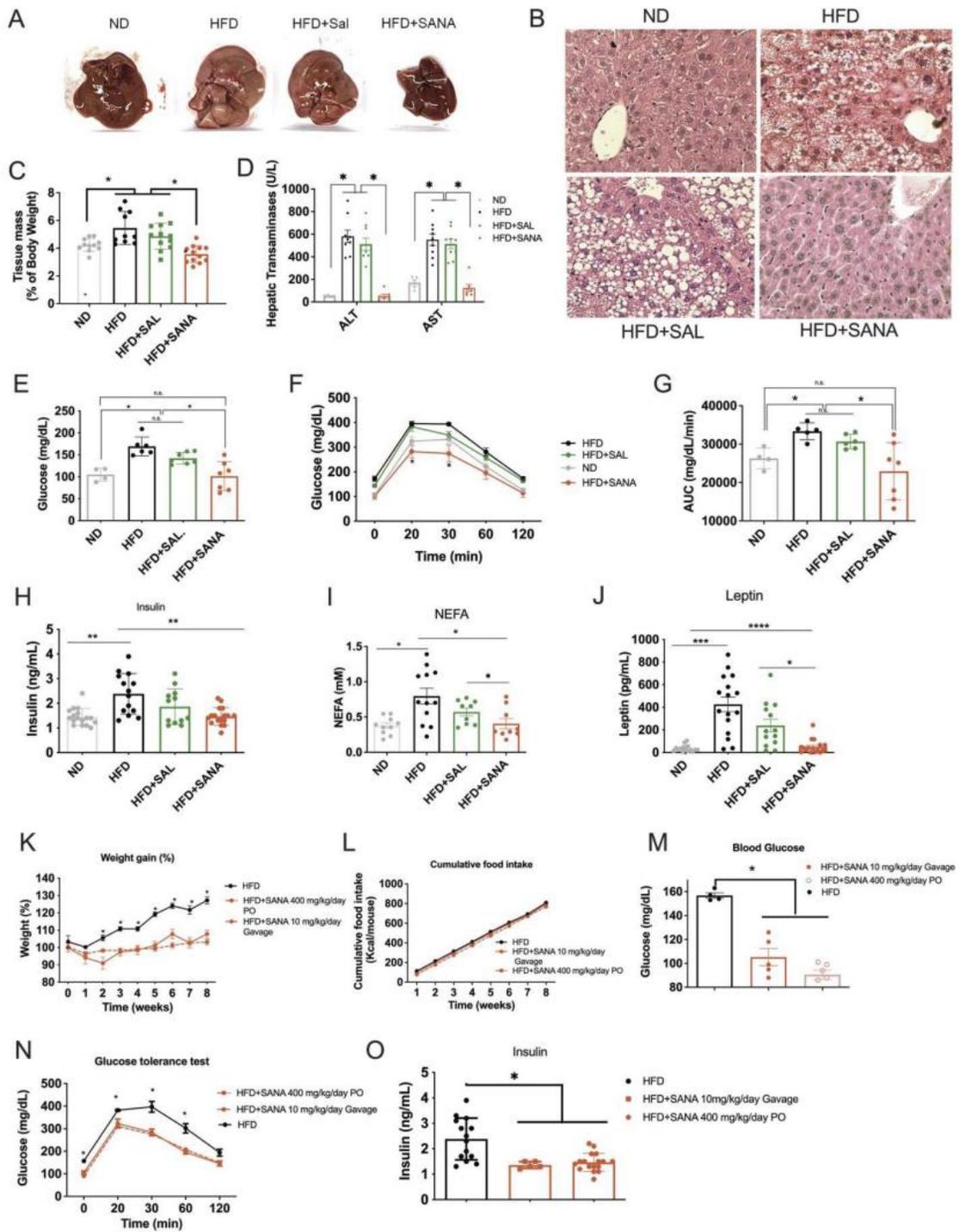


508

509 **Figure 1. SANA protects against diet-induced obesity.** A) SANA synthesis route (left) and  
 510 characterization of its electrophilic properties (right). SANA (10  $\mu\text{M}$ ) was incubated with  $\beta$ -

23

511 Mercaptoethanol (BME, 100  $\mu$ M) or reduced glutathione (GSH, 100  $\mu$ M). Spectra of the reaction  
512 were obtained in the 200-600 nm range every 60 s. **B)** Representative picture of mice fed with  
513 high-fat diet (HFD) or HFD+SANA (or salicylate, SAL) at 400 mg/kg/day (PO) **C)** Weight gain of  
514 the mice shown in B). **D-E)** Weight gain expressed as percent of initial weight in mice in normal  
515 diet (ND) or fed with HFD alone or supplemented with different doses of SANA (in **D)** or SAL (in  
516 **E)**). Compounds were administered PO at 200, 300 and 400 mg/kg/day. **F)** Percent of weight gain  
517 in mice fed with ND alone and ND+SANA (or SAL) at 400 mg/kg/day after 4 weeks of treatment  
518 or HFD+SANA (or SAL) at 400 mg/kg/day after 8 weeks. **G)** Cumulative food intake in mice  
519 treated as described in B). **H)** Representative picture of mice treated as described in B). Arrows  
520 point to perigonadal fat depots. **I)** Total fat mass was measured by EchoMRI and **J)** Quantitation  
521 of different fat depots of mice treated as described in B). Brown adipose tissue (iscap\_BAT),  
522 inguinal subcutaneous (i\_WAT), subscapular subcutaneous (sScap\_WAT) and perigonadal  
523 (p\_WAT) white adipose. **K)** Total lean mass was measured by EchoMRI in the same conditions  
524 described in B).  
525

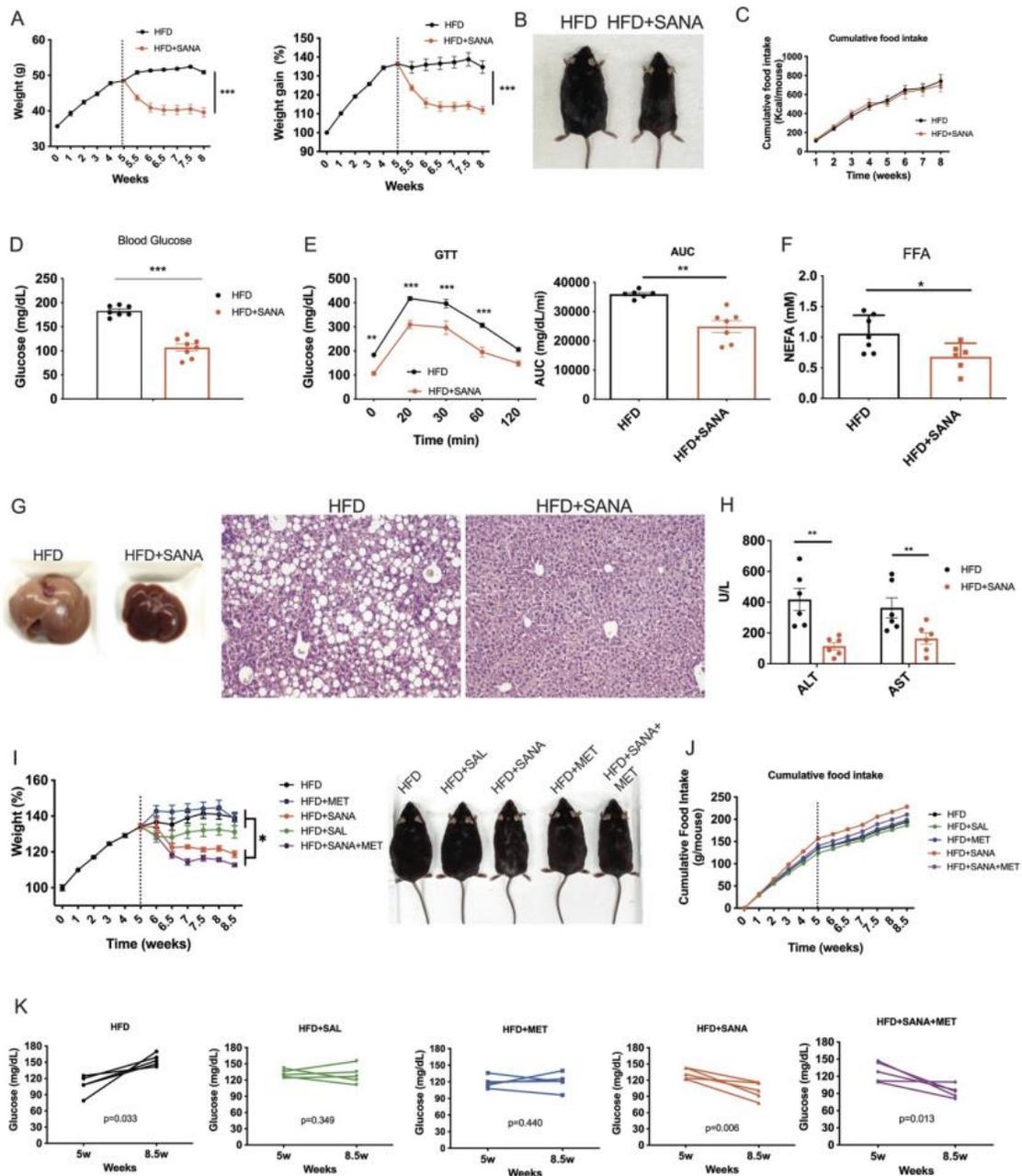


526

25

125

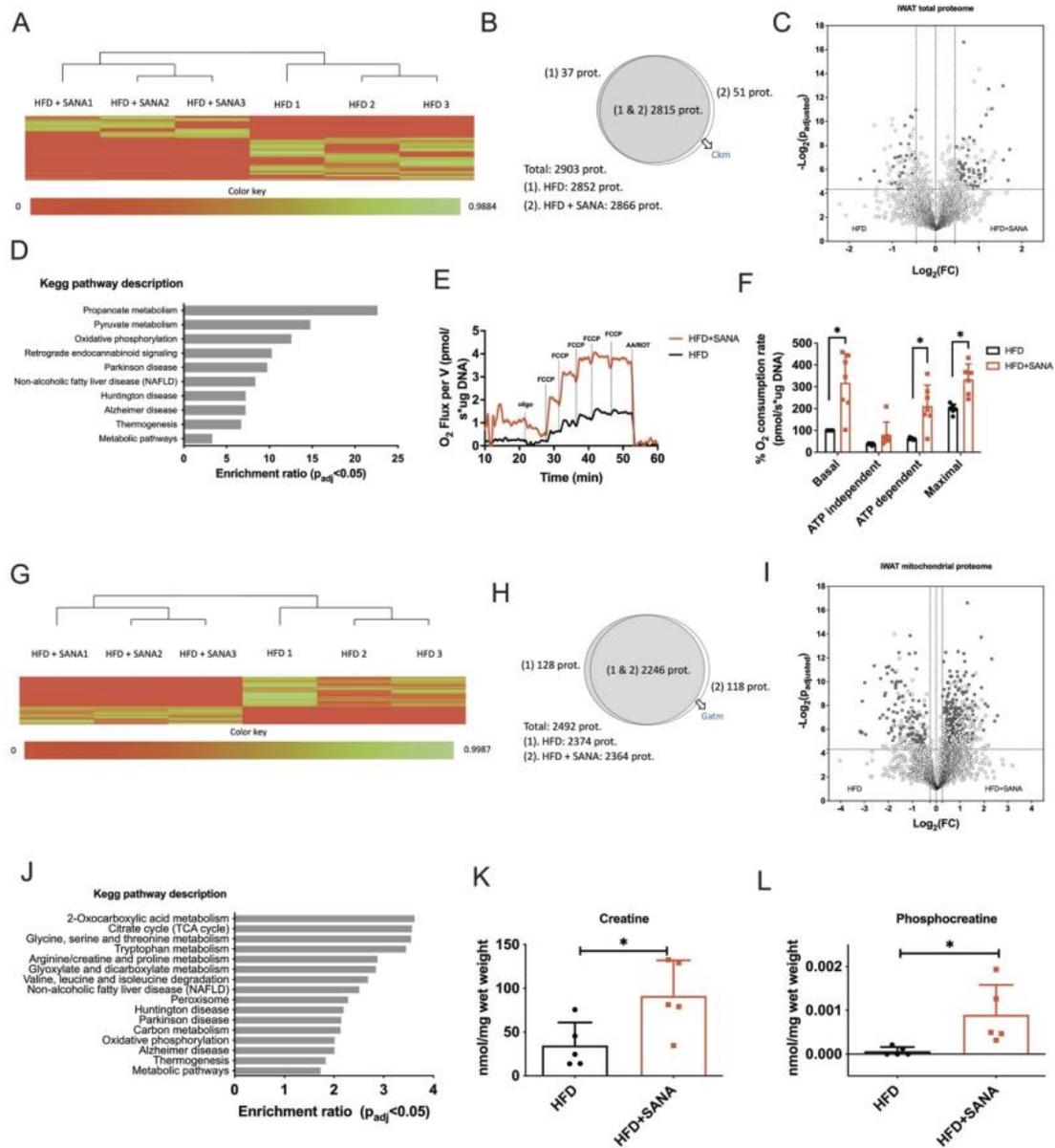
527 **Figure 2. SANA protects against glucose intolerance and liver steatosis in response to**  
528 **DIO. A-C)** Liver macroscopic appearance (A), H&E liver staining (B) and liver weight (C) in mice  
529 fed with ND, HFD, HFD+SANA or SAL at 400 mg/kg/day (PO). **D)** Liver transaminases in  
530 plasma/serum and **E-G)** Fasting glucose, glucose tolerance test (GTT) and GTT area under the  
531 curve (AUC) in mice treated as described in C). **H-J)** Quantitation of insulin (H), NEFA (non-  
532 esterified fatty acids) (I) and Leptin (J), in plasma/serum from mice treated as described in C). **K-**  
533 **O)** SANA was delivered orally in solution (by gavage) at 10 mg/kg/day and compared with the  
534 dose of 400 mg/kg/day PO. **K)** Weight gain. **L)** Cumulative food intake, **M)** Fasting glucose levels  
535 at week 8. **N)** GTT at week 8. **O)** Insulin plasma levels at week 8.  
536



537

538 **Figure 3. Treatment of obese mice with SANA promotes weight loss and amelioration of**  
 539 **glucose intolerance and liver damage.** Obese mice were treated with SANA at 200 mg/kg/day  
 540 PO. **A)** Weight gain and percent of initial weight. **B)** Representative picture and **C)** Cumulative

541 food intake. **D)** Fasting glucose levels measured at week 8. **E)** GTT at week 8. **F)** Free-fatty acids  
542 levels in plasma at week 8. **G)** Liver macroscopic appearance and H&E liver staining and **H)** Liver  
543 transaminases in plasma/serum from mice at week 8. **I)** Percent of initial weight and  
544 representative picture of obese mice treated with SANA or SAL (200 mg/kg/day PO), in  
545 combination or not with metformin (MET 300 mg/kg/day, gavage). **J)** Cumulative food intake and  
546 **K)** evolution of fasting glucose.  
547

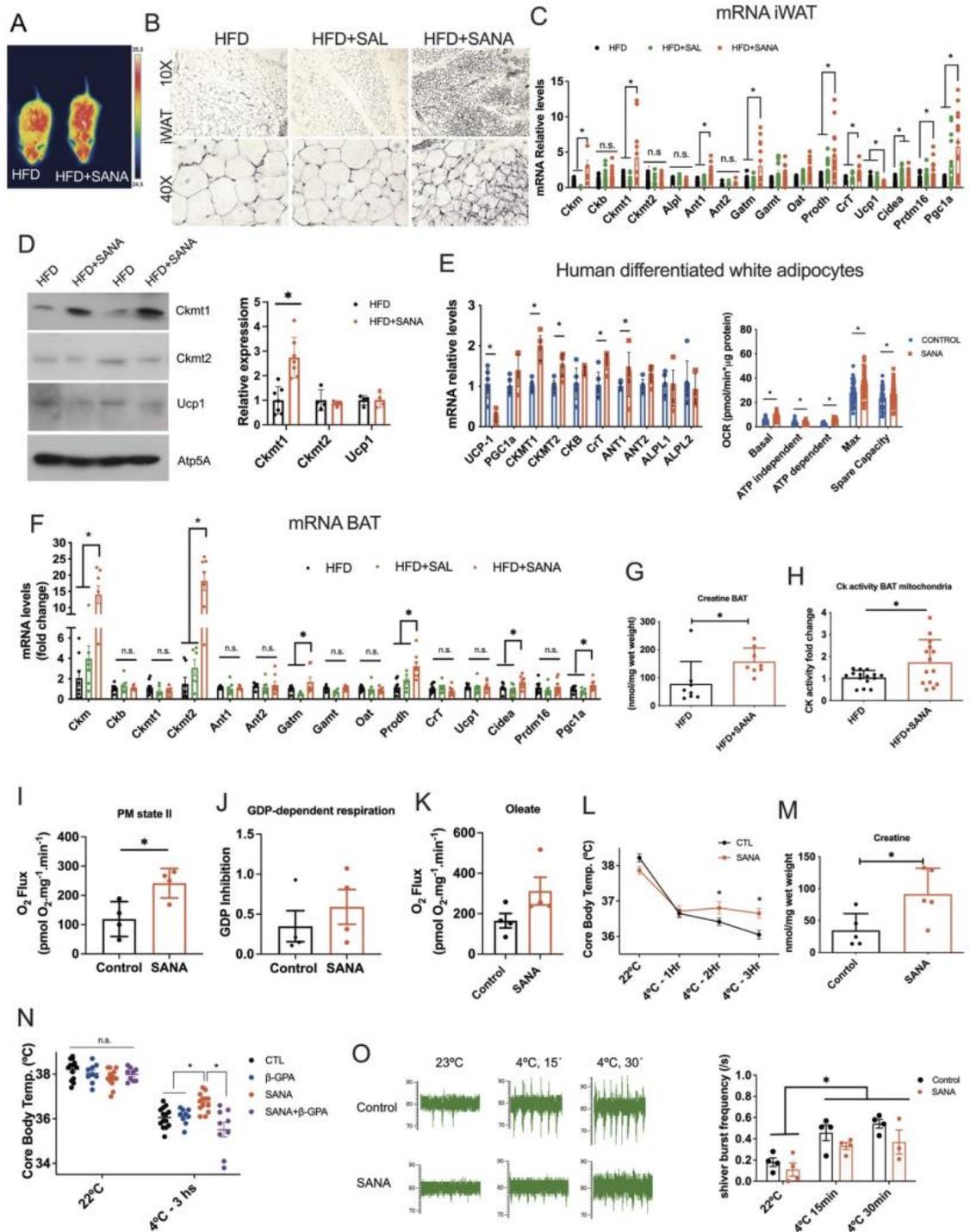


548

549 **Figure 4. Proteomic analysis of whole tissue and isolated mitochondria from iWAT to**  
 550 **SANA. A-D)** Whole iWAT proteomic analysis from obese mice fed with HFD or HFD+SANA (400  
 551 mg/kg/day, PO). **A)** Heatmap generated showing an individual protein per row and biological  
 552 replicates of each condition in columns. **B)** Venn diagram indicating the proteins exclusively  
 553 detected in each condition ( $\text{p}$ -value < 0.05). Ckm: Creatine kinase M-type. **C)** Volcano plot

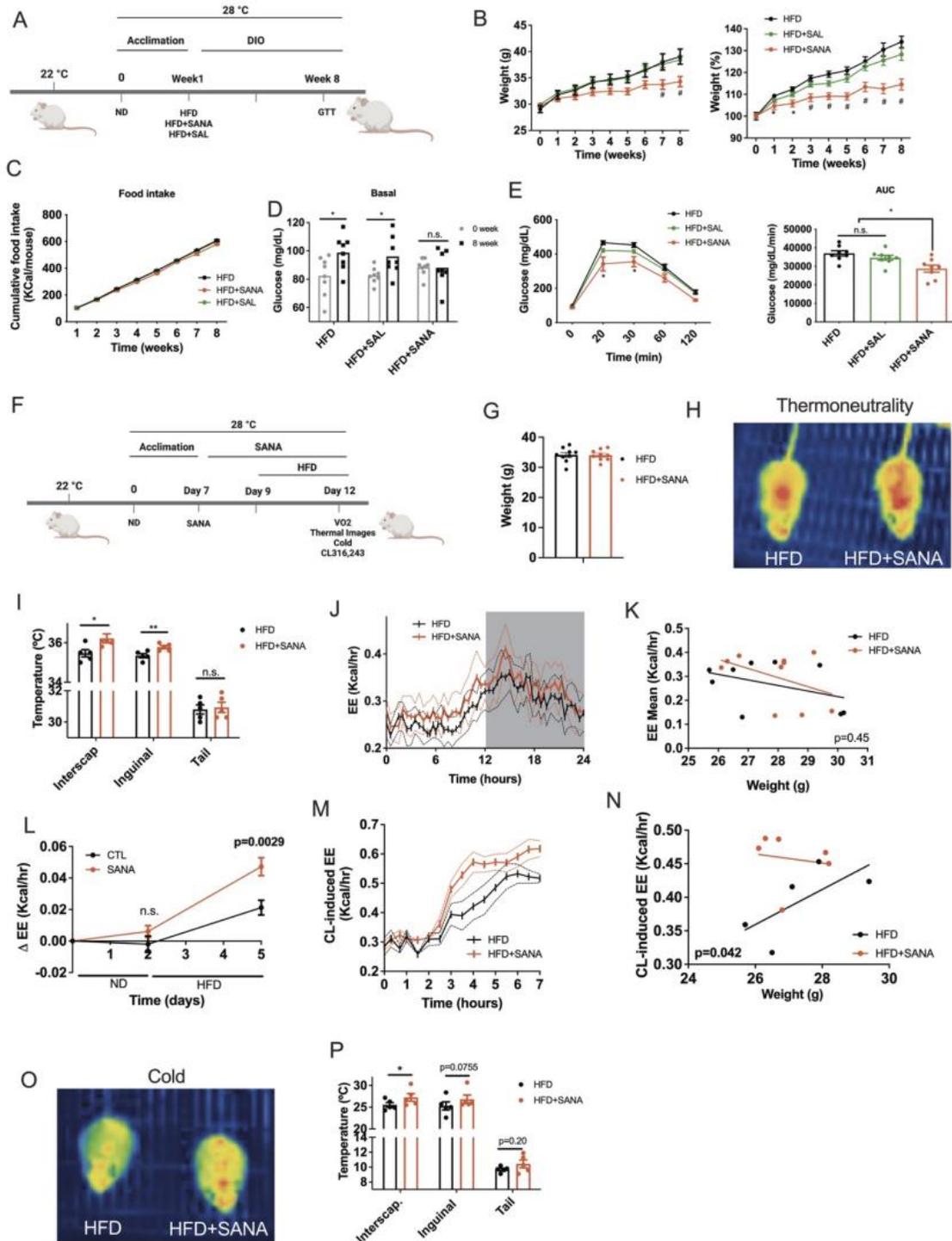
29

554 showing proteins found in both conditions with statistically differential abundance (BH q-value <  
555 0.05). Each dot represents a protein detected in at least 4 biological replicates from the total of 6  
556 in both conditions. The darkest dots correspond to statistically differential proteins. **D)**  
557 WebGestalt's pathway over-representation analysis of proteins overexpressed in HFD+SANA vs  
558 HFD. **E)** Cellular respiration and **F)** oxygen consumption in white adipocytes isolated from mice  
559 treated as described in A-D). **G-J)** Proteomic analysis of isolated mitochondria from iWAT of mice  
560 treated as described in A-D). Gatm: Glycine amidinotransferase, mitochondrial. **K)** Total creatine  
561 and **L)** phosphocreatine levels in iWAT from mice treated as described in A-D), measured by MS.  
562

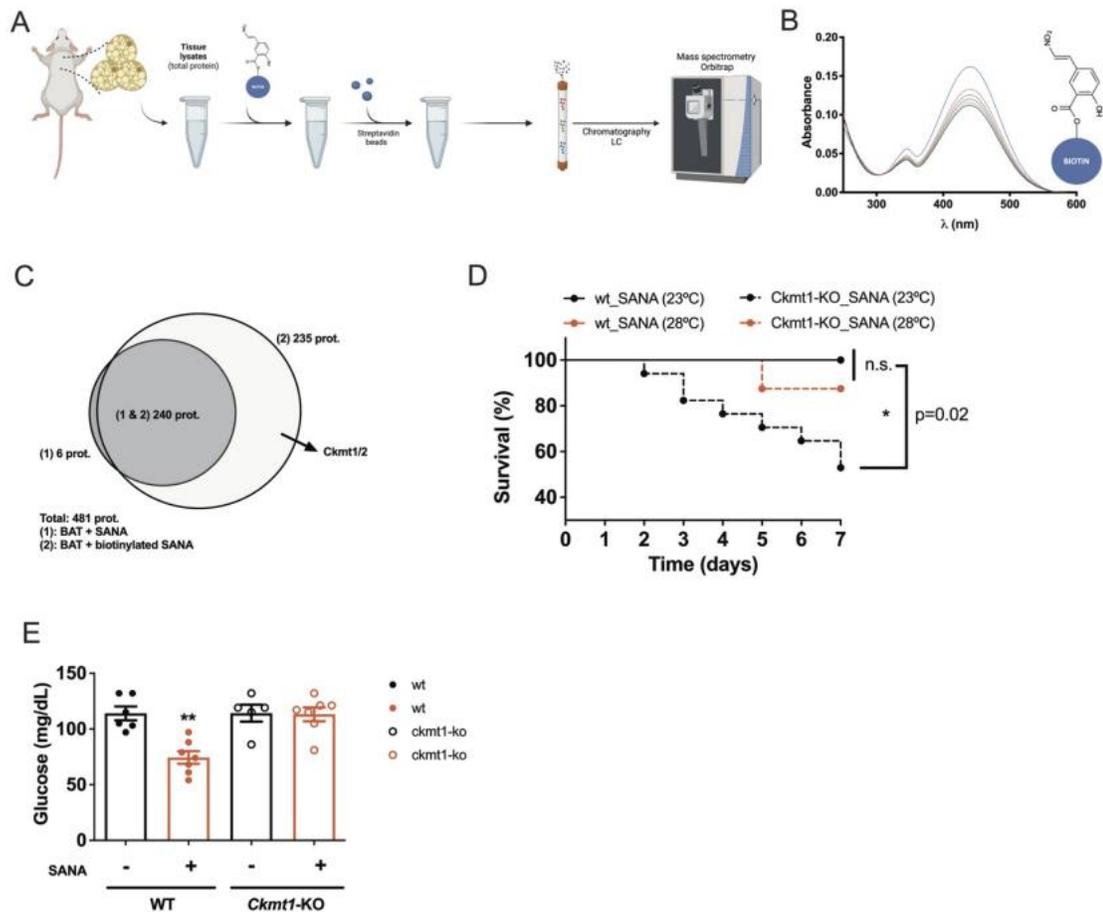


563

564 **Figure 5. SANA stimulates thermogenesis in the absence of UCP1 activation, an effect**  
565 **that is abolished when creatine metabolism is impaired *in vivo*. A)** Thermal image of mice  
566 fed with HFD or HFD+SANA (400 mg/kg/day, PO). **B-D)** Analysis of inguinal white adipose tissue  
567 **B)** Representative histological (H&E) image of iWAT. **C)** Expression of thermogenesis markers  
568 by qPCR in iWAT from mice treated as described in A. **D)** WB analysis of CKMT1, CKMT2, UCP1  
569 in iWAT after SANA treatment as described in A. **E)** Human differentiated white adipose cells  
570 (TERT-hWA) were incubated with SANA (100  $\mu$ M) for 24 hours. Left, expression of thermogenic  
571 markers measured by qPCR. Right, mitochondrial respiration. **F-K)** Analysis of brown adipose  
572 tissue (BAT). **F)** Expression of thermogenesis markers by qPCR in BAT, including scaffold as a  
573 further control; **G)** total creatine levels in BAT measured by MS and **H)** creatine kinase activity in  
574 BAT isolated mitochondria, from mice treated as described in A. **I)** State II respiration in isolated  
575 mitochondria from BAT measured with pyruvate+malate (PM). **J)** Inhibited respiration of isolated  
576 mitochondria from BAT by GDP **K)** FFA-dependent respiration of isolated mitochondria from BAT  
577 after UCP1 inhibition with GDP. **L)** Cold challenge from mice treated with SANA (20 mg/kg/day,  
578 SC) **M)** Creatine quantification in iWAT from mice treated as described in L) after 6 hours of cold  
579 exposure. **N)** Effect of the creatine antagonist  $\beta$ -GPA on cold response in mice treated with SANA.  
580 **O)** Electromyogram during cold exposure.  
581



583 **Figure 6. SANA stimulates energy expenditure and protects against obesity under**  
584 **thermoneutral conditions. A)** Schematic representation of long-term treatment under  
585 thermoneutral conditions. Mice were fed with HFD or HFD+SANA (or SAL) at 20 mg/kg/day, SC.  
586 **B)** Weight gain and percent of initial weight. **C)** Cumulative food intake **D)** Fasting glycemia at  
587 weeks 0 and 8. **E)** GTT at week 8 **F)** Schematic representation of acute HFD and SANA treatment  
588 under thermoneutral conditions. **G)** Body weight and **H)** Representative thermal image of HFD  
589 and HFD+SANA treated mice at the end of the acute treatment. **I)** Surface temperature  
590 quantitation from thermal images. **J)** EE measurements over a 24-hour period at the end of the  
591 acute treatment. **K)** Regression plot of EE shown in J. **L)** Change in individual EE during HFD  
592 treatment at 28°C. **M)** EE measurement of CL316,243-treated mice injected at the end of the  
593 acute treatment. **N)** Regression plot of EE shown in M). **O-P)** Thermoneutral-to-cold challenge  
594 switch of mice at the end of the acute treatment. **O)** Representative thermal image after 1 hour  
595 incubation at 4°C. **P)** Surface temperature quantitation from thermal images.  
596



597

598 **Figure 7. Identification of SANA-binding proteins followed by *in vivo* confirmation**

599 **identified Ckmt1/2 as putative targets of SANA. A)** Workflow scheme describing the screening

600 strategy for the identification of SANA-binding proteins. **B)** Electrophilic properties of biotinylated

601 SANA (bSANA). bSANA (10  $\mu$ M) was incubated with  $\beta$ -mercaptoethanol (BME, 100  $\mu$ M). Spectra

602 of the reaction were obtained in the 200–600 nm range every 60s. **C)** Venn diagram showing

603 proteins that were identified bound to SANA (control) or bSANA. **D)** Survival curve of WT and

604 *Ckmt1* KO mice treated with SANA (20 mg/kg/day, SC) for 1 week at RT or thermoneutrality. **E)**

605 Fasting glucose in WT and *Ckmt1* KO mice at thermoneutrality after HFD feeding and treatment

606 with SANA (20 mg/kg/day, SC) or vehicle for 1 week.

607

611

612 **Methods**

613 **Animals**

614 C57BL/6J mice and zebrafish used in this study were maintained at the Institut Pasteur de  
615 Montevideo Animal facility (UBAL). The experimental protocol was approved by the Institutional  
616 Animal Care and Use Committee of the Institut Pasteur de Montevideo (CEUA, Protocol numbers  
617 003-19 and 006-19). Studies were performed according to the methods approved in the protocol.  
618 All the experiments were performed on adult male mice (10-12 weeks of age) and were conducted  
619 at either 22°C or 28°C (thermoneutrality) with free access to food and water. Unless specified,  
620 mice were housed at 22°C in groups of five. For thermoneutrality experiments, mice were housed  
621 individually at 28°C for one week before starting the experiment.

622 For the CLAMS studies, C57BL/6J mice were purchased from the Jackson Laboratory, and the  
623 experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees of West Virginia  
624 University

625 Ckmt1 null (KO) and wild-type (WT) mice on a C57BL/6N background were maintained at the  
626 University of Guelph as previously described<sup>33</sup>. All experiments were approved by the Animal  
627 Care Committee at the University of Guelph and met the guidelines of the Canadian Council on  
628 Animal Care.

629 **Drugs delivery**

630 SANA (or salicylate) was administered orally (PO) by mixing with the food. For oral gavage  
631 (SANA, salicylate, and metformin) or subcutaneous (SC) (SANA, M1: 5-(2-nitroethyl)salicylic acid)  
632 administration, drugs were prepared in a 100 mM phosphate buffer, pH 6.5/ PEG 400 (50/50; v/v).  
633 In all cases the vehicle was used as control.

634 **High-fat diet feeding**

635 Male C57BL/6J mice housed at 22°C or 28°C were fed a high-fat diet (42% fat and 0.25%  
636 cholesterol, AIN93G, LabDiet, USA), starting at 12 weeks of age and for a duration of 8-20 weeks.

637 **Acute high-fat diet feeding**

638 Individually-housed C57BL/6J male mice were acclimated for one week at 28°C and fed with  
639 normal chow. At that point, SANA (20 mg/kg/day, SC) administration was started and repeated  
640 for 5 days. On the second day of administration, the normal chow diet was changed to a high-fat  
641 diet for the subsequent three days. In all cases the vehicle was used as control.

642 **Cumulative food intake**

643 Intake was measured individually once per week for a 24 h period and expressed as total calories  
644 per mouse, independent of body weight.

645 **Cold challenge experiments**

646 C57BL/6J male mice previously acclimated at 22°C were treated or not (control) with SANA (or  
647 SAL, 20 mg/kg/day, SC), in combination or not with beta-guanidinopropionic acid ( $\beta$ -GPA, 0.4  
648 g/kg in PBS pH 7.5, IP) for 5 days and fed with normal chow. At that point, mice were housed  
649 individually at 4°C from one to six hours, with free access to food and water. Body temperature  
650 was measured before and during the challenge (once every hour) with a mouse rectal probe  
651 (ThermoWorks).

652 **Thermal imaging**

653 Thermal images were collected from non-anesthetized, awake mice with a FLIR E6 thermal  
654 imaging camera. Regions of interest from thermal images were selected and quantified using the  
655 FLIR Tools software.

656 **Blood glucose measurements**

657 Mice were kept in fasting for 16 h before fasting glucose measurement and glucose tolerance  
658 tests (GTT). For GTT mice were injected (IP) with 1.5 g/kg body weight of glucose solution.  
659 Plasma glucose concentrations were measured from blood obtained from the tail using a hand-  
660 held glucometer (Accu-Chek, Roche).

661 **Insulin, leptin, FFA and liver transaminases measurements**

662 Quantitation of insulin (Mouse INSULIN ELISA Kit, Thermo Sc.); non-esterified fatty acids (NEFA,  
663 NEFA-HR Assay, Waco); leptin (Mouse leptin ELISA Kit, Abcam) and hepatic transaminases  
664 (Liver & Kidney Profile, MNCHIP) were performed in plasma/serum following the supplier's  
665 instructions.

666 **Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS)**

667 Mice were maintained in the CLAMS (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) for 13 days  
668 at 28 °C. They were acclimated for 7 days and fed with normal chow. At that point, SANA  
669 administration (20 mg/kg/day, SC) was started and repeated for 6 days. On the second day of  
670 administration, the normal chow diet was changed to a high-fat diet for the subsequent four days.  
671 On the last day mice were injected with CL 316, 243 (1 mg/kg, IP in saline solution). In all cases  
672 the vehicle was used as control. Oxygen consumption (VO<sub>2</sub>), carbon dioxide production (VCO<sub>2</sub>),  
673 and activity of individual mice were monitored over the total period. VO<sub>2</sub> and VCO<sub>2</sub> values were  
674 used to calculate respiratory exchange ratio (RER), and VO<sub>2</sub> and RER values were used to  
675 determine energy expenditure (kcal/h).

676 **Body composition**

677 Lean mass and fat mass of individual mice were measured by quantitative NMR using an  
678 EchoMRI analyzer (Houston, TX, USA).

679 **Chemistry**

680 Chemicals were purchased at the highest purity available.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were  
681 recorded on a Bruker DPX-400 instrument, with DMSO- $d_6$  as solvent and tetramethylsilane as  
682 the internal reference. Electron impact (EI) and electrospray (ES+) mass spectra were obtained  
683 at 70 eV on a Shimadzu GC-MS QP 1100 EX or on a Hewlett Packard 1100 MSD spectrometer,  
684 respectively. HRMS was obtained in a Q Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Scientific,  
685 USA) by direct injection using 30% acetonitrile as solvent and an Ion Max API source with a HESI-  
686 II probe. The mass spectrometer was operated in a negative mode, ion spray voltage was set at  
687 3.5 kV and capillary temperature at 250°C. TLC was carried out on Alugram® Sil G/UV254 on  
688 polyester plates. All solvents were of anhydrous quality purchased from Aldrich Chemical Co. and  
689 used as received.

690 5-(2-nitroethenyl)salicylic acid (SANA) synthesis: To a solution of 5-formylsalicylic acid (19.2 g,  
691 116 mmol) in ethanol (176 mL), nitromethane (24 mL, 443 mmol) and ammonium acetate (22.3  
692 g, 144 mmol) were added. The reaction mixture was heated at 60°C for 2 h, an orange precipitate  
693 was observed. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and was acidified  
694 with concentrated HCl (~30 mL). The orange solid gives a yellow solid and it was filtered under  
695 vacuum. The solid is thoroughly washed with water to remove the ammonium chloride formed  
696 and recrystallized from water:ethanol (1:1) to give yellow crystals. mp. 230-232°C. Yield: 93%.

697  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ = 8.26 (d,  $J$ =2.2 Hz, 1H), 8.21 (d,  $J$  14.8 Hz, 1H), 8.18 (d,  $J$  14.8  
698 Hz, 1H), 8.04 (dd,  $J$  8.7 2.2 Hz, 1H), 7.06 (d,  $J$  8.7 Hz, 1H).

699  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ = 171.6, 164.5, 139.2, 136.9, 136.2, 134.1, 122.0, 118.8,

700 114.6. MS (EI, 70eV):  $m/z$  (%) 209( $\text{M}^+$ , 65), 191(100), 162(23), 144(45), 122(20).

701 HRMS:  $m/z$  [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$  calculated for  $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_5$ : 208.0251, found: 208.0247  $\pm$  0.0002.

702

703 **iWAT mitochondria enrichment**

704 For each biological replicate, subcutaneous inguinal white adipose tissues from 2-3 animals  
705 (according to body weight) were dissected, pooled, and washed in ice-cold homogenization buffer  
706 (HB) (250 mM sucrose, 10 mM HEPES, 0.1 mM EGTA, pH 7.2). Homogenization buffer was  
707 supplemented with 2% BSA during the isolation of fat mitochondria and the procedure was  
708 conducted at 4°C. Tissues were minced on ice and homogenized in HB (5 ml/g) using a motorized  
709 Potter-Elvehjem teflon pestle. Homogenates were filtered through clean gauze to remove fat  
710 particles and centrifuged at 1000 g for 5 min to pellet nuclei and cell debris. The supernatant was  
711 transferred to a clean tube and centrifuged at 10000 g for 15 min to pellet crude mitochondria.  
712 The mitochondrial pellet was washed three times with 2 mL of HB (without BSA) by centrifugation  
713 at 10000 g for 10 min and stored at -80 °C until used.

714 **Proteomics analysis**

715 **Sample preparation for LC-MS/MS analysis**

716 For proteomics analyses, three biological replicates were used per condition. Protein  
717 quantification was performed by densitometry analysis of whole iWAT or iWAT enriched  
718 mitochondrial samples separated on 12,5% SDS-PAGE gels and using a low molecular weight  
719 protein calibration kit (Amersham, GE Healthcare). For mass spectrometry analysis, equal  
720 amounts of each protein sample were separated only up to 1 cm into the resolving gel, fixed and  
721 stained with Coomassie blue R-250. In-gel protein digestion and peptide extraction were  
722 performed as previously described <sup>42</sup> with minimal variations. Briefly, the 1 cm bands were  
723 excised, and cysteine residues were reduced and alkylated by sequential incubation with 10 mM  
724 dithiothreitol (DTT) and 55 mM iodoacetamide (IAA). Tryptic digestion was performed in-gel by  
725 overnight incubation at 37°C with sequencing grade trypsin (Promega) in a protease:protein ratio

41

726 of 1:50 (w/w). Tryptic peptides were extracted from the gel by adding 60% ACN / 0.1%  
727 trifluoroacetic acid (TFA) in two steps of 1h incubation at 30°C. Samples were dried under vacuum  
728 and peptides were desalted using ZipTips C18 (Merck Millipore). Eluted peptides were vacuum  
729 dried and dissolved with 0.1% formic acid (FA).

#### 730 **LC-MS/MS analysis**

731 LC-MS/MS analysis was performed with an UltiMate 3000 nanoHPLC system (Thermo Fisher  
732 Scientific) coupled to a Q Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA).  
733 Samples were loaded onto a precolumn (Acclaim PepMap™ 100, C18, 75 µm X 2 cm, 3 µm  
734 particle size) and separated with an Easy-Spray analytical column (PepMap™ RSLC, C18, 75 µm  
735 X 50 cm, 2 µm particle size) at 40°C using a two-solvent system: (A) 0.1% FA in water, (B) 0.1%  
736 FA in acetonitrile (ACN). Separation was achieved through an elution gradient as follows: 1% to  
737 35% B over 150 min and 35% to 99% B over 20 min, at a flow rate of 200 nL/min. The mass  
738 spectrometer was operated in a positive mode using a top-12 data-dependent method. Ion spray  
739 voltage was set at 2.5 kV and capillary temperature at 250°C. The survey scans were acquired in  
740 a range of 200-2000 m/z with a resolution of 70000 at 200 m/z, an AGC target value of 1E6 and  
741 a maximum ion injection time of 100 ms. Precursor fragmentation occurred in an HCD cell with a  
742 resolution of 17500 at 200 m/z, an AGC target value of 1E4 and a maximum ion injection time of  
743 50 ms. Normalized collision energy was used in steps of NCE 25, 30 and 35. Dynamic exclusion  
744 time was set to 30 s. Each sample was injected twice.

#### 745 **Mass spectrometry data analysis**

746 PatternLab for Proteomics 4.0 software (PatternLab) <sup>43</sup> was used to perform peptide spectrum  
747 matching and label free quantitative analysis. For data search, a target reverse database was  
748 generated using PatternLab, including *Mus musculus* proteome (downloaded from UniProt,  
749 26/08/2020) and the most common contaminants in proteomics experiments. For peptide

750 identification m/z precursor tolerance was initially set at 40 ppm and methionine oxidation and  
751 cysteine carbamidomethylation were defined as variable and fixed modifications respectively. A  
752 maximum of 2 missed cleavages and 2 variable modifications per peptide were allowed. Search  
753 results were filtered by the PatternLab Search Engine Processor (SEPro) algorithm with a  
754 maximum FDR value  $\leq 1\%$  at protein level and 10 ppm tolerance for precursor ions. PatternLab's  
755 Venn diagram statistical module was used to determine proteins uniquely detected in each  
756 biological condition using a probability value less than 0.05<sup>43</sup>. PatternLab's TFold module was  
757 used to relatively quantify proteins present in both biological conditions by a spectrum count-  
758 based label-free quantification method. Proteins present in at least 4 biological replicates from  
759 the total of 6 were considered for TFold analysis. This module uses the Benjamini-Hochberg's  
760 theoretical estimator to deal with multiple T-tests and it maximizes the number of identifications  
761 satisfying a fold change cutoff that varies with the p-values (BH  $q < 0.05$ ); while restricting false  
762 differential proteins mainly due to low abundance<sup>44</sup>. The list of statistically overrepresented  
763 proteins in the condition HFD+SANA, obtained from Venn diagram and TFold Patternlab's  
764 modules, was subjected to pathway enrichment analysis. The *Mus musculus* total proteome or  
765 the mitochondrial proteome obtained in our experiment were used as background proteomes for  
766 the overrepresentation analysis of the total or mitochondrial protein sets respectively, using the  
767 functional enrichment analysis web tool WebGestalt<sup>45</sup>. The mass spectrometry proteomics data  
768 have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE<sup>46</sup> partner repository  
769 with the dataset identifier PXD030485 (for reviewer access: Username:  
770 reviewer\_pxd030485@ebi.ac.uk, Password: tNnBLEHe).

771

#### 772 **Metabolite analysis by LC-MS/MS and NMR**

773 Subcutaneous adipose tissue samples (100 mg) were homogenized and extracted with an  
774 ice-cold mixture of equal volumes of water, methanol, and chloroform (1.0 mL). The aqueous  
775 phases were separated and dried in a SpeedVac, and the resulting tissue extracts were

43

776 reconstituted in 600  $\mu$ L of phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.02% NaN<sub>3</sub> and 20% D<sub>2</sub>O and  
777 transferred to 5 mm NMR tubes (NE-HL5-7, New Era Enterprises Inc., Vineland, NJ, USA). All  
778 NMR experiments were performed on a Bruker AVANCE III 500 NMR spectrometer equipped  
779 with a room temperature z-gradient TXI probe and operating at <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C frequencies of 500.13  
780 and 125.76 MHz, respectively. Water-suppressed <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded using a  
781 1D-NOESY pulse sequence with presaturation at 25 °C. A spectral width of 10 KHz, a data size  
782 of 32 K, and a total of 128 scans with a relaxation delay of 4 s between scans were employed to  
783 record each experiment. All free induction decays were zero-filled to 64 K points and apodized  
784 with a 0.3 Hz exponential window function prior to Fourier transformation. Spectra were  
785 referenced to the  $\alpha$ -glucose anomeric proton resonance at 5.22 ppm present in all samples.  
786 Metabolites were identified by comparison to spectra from public databases, assisted with data  
787 obtained from standard gradient-enhanced HSQC spectra when necessary. Metabolite  
788 concentrations in the NMR sample were estimated using the PULCON method as implemented  
789 in the spectrometer (54) and normalized to wet tissue mass to yield concentrations in nmol/mg of  
790 tissue.

791

792 For LC-MS/MS analysis, dried tissue extracts were reconstituted in 200  $\mu$ L of 5 mmol/L  
793 ammonium acetate in 95% water, 5% acetonitrile, and 0.5% acetic acid was passed through a  
794 0.45- $\mu$ m polyvinylidene fluoride filter. The extracts were analyzed by a Shimadzu LC Nexera X2  
795 UHPLC coupled with a QTRAP 5500 LC-MS/MS (liquid chromatography/ mass spectrometry-  
796 mass spectrometry; AB Sciex). An ACQUITY UPLC BEH Amide analytic column (2.1 $\times$ 50 mm, 1.7  
797  $\mu$ m, Waters) was used for chromatographic separation. The extracted MRM peaks were  
798 integrated using MultiQuant 3.0.2 software (AB Sciex).

799

800

801

802 **Identification of SANA-binding proteins**

803 To search for SANA targets, 100 mg of mouse brown adipose tissue were lysed in 500 µL of  
804 NETN buffer (20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40) using a bullet blender.  
805 Homogenates were centrifuged at 10000 g for 10 min, 4°C, and the supernatant's protein  
806 concentrations were measured by Bradford assay (PanReac AppliChem) using a BSA (Capricorn  
807 Scientific) standard. Four replicates of 200 µL of brown adipose tissue lysate containing 100 µg  
808 of total protein each, were incubated with 100 µM SANA or biotinylated-SANA at 25 °C for 30 min  
809 in agitation. A Strep-Tactin® Sepharose® resin (IBA Lifesciences) suspension in NETN buffer  
810 (50:50 v/v; 30 µL total volume) was added to each sample. The mixture was incubated in rotation  
811 for 1 h at 4°C and centrifuged at 1000 g for 1 min. The supernatant was discarded, and the resin  
812 was washed 4 times with 500 µL of NETN. The resin was resuspended in 60 µL of reducing SDS-  
813 PAGE sample buffer (62.5 mM Tris-Cl, 2% SDS, 10% v/v glycerol, 10% 2-mercaptoethanol,  
814 0.01% bromophenol blue, pH 6.8) and heated at 95°C for 5 min. A fraction of 20 µL from each  
815 sample was loaded in a 1D SDS-PAGE and trypsin digested in-gel as described in "Sample  
816 preparation for LC-MS/MS analysis".

817 The mass spectrometry analysis was performed as described in "LC-MS/MS analysis" except for  
818 the elution gradient: 1% to 35% B over 60 min and 35% to 99% B over 15 min; the spray voltage  
819 was set at 2.3 kV.

820 The mass spectrometry data analysis was performed with PatternLab 5.0 software<sup>47</sup> using the  
821 same search parameters described for total and mitochondrial proteomes. The target reverse  
822 database was generated from a *Mus musculus* proteome (downloaded from UniProt, 08/04/2022)  
823 and the most common contaminants in proteomics experiments. PatternLab's Venn diagram  
824 statistical module was used to determine proteins uniquely detected in each biological condition  
825 using a probability value less than 0.05, a minimum 2 replicates per condition to be considered,

826 and the Lenient stringency mode <sup>47</sup>. PatternLab's TFold module was used to relatively quantify  
827 proteins present in both biological conditions by a spectrum count-based label-free quantification  
828 method. Proteins present in at least 6 biological replicates from the total of 8 were considered for  
829 TFold analysis <sup>44</sup>. Proteins with a BH  $q < 0.05$  and a fold change greater than 1.5 were considered  
830 as significantly overrepresented in a biological condition. The list of statistically overrepresented  
831 proteins in the condition BAT + biotinylated SANA, obtained from Venn diagram and TFold  
832 Patternlab's modules is listed in supplementary table VII. The mass spectrometry proteomics data  
833 have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE <sup>46</sup> partner repository  
834 with the dataset identifier PXD040949 (for reviewer access: Username:  
835 reviewer\_pxd040949@ebi.ac.uk, Password: DKT6NzQ9).

### 836 **Electromyography (EMG)**

837 Muscle electrical activity (EMG) was recorded in 4 C57Bl/6J adult male mice. A radiofrequency  
838 transmitter (EA-F20, Data Sciences International DSI, St. Paul, MN) with 2 wire leads was  
839 implanted subcutaneously under anesthesia with isoflurane (2.5% at 0.5 lpm O<sub>2</sub>) (protocol  
840 number: 70153-000673-18). The electrodes were sutured to the back muscles near the neck and  
841 the skin was closed with metal clips. Mice were allowed to recover for at least 72 h. Then, EMGs  
842 of the conscious restrained mice were recorded at a sampling frequency of 1000 Hz for 30 min in  
843 the morning (10–11 am) at 23°C and 4°C before (control) and after 5 day-treatment with SANA  
844 (20 mg/kg/day). Off-line analysis was performed to count shivering bursts in 5 minute-periods (30  
845 windows, 10 s each). A burst was counted if its duration was at least 200 ms <sup>48</sup>.

### 846 **Cell culture, differentiation, and treatments**

847 TERT-hWA cells <sup>49</sup> were cultured in Advanced DMEM/F12 (Life Technologies) supplemented with  
848 10% FBS, L-glutamine (2 mM) (Life Technologies), penicillin (62.5 µg/ml), streptomycin (100  
849 µg/ml) and basic fibroblast growth factor (bFGF) (2.5 ng/mL) (Life Technologies). TERT-hWAT

850 preadipocytes were maintained as a subconfluent monolayer culture. Two days post-confluence  
851 (day 0), cells were induced to differentiate in Advanced DMEM/F12 supplemented with 2% FBS,  
852 L-glutamine (2 mM), penicillin (62.5 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), insulin (5 µg/ml),  
853 dexamethasone (1 µM) (Sigma- Aldrich), IBMX (0.5 mM) (Thermo Scientific), rosiglitazone (1 µM)  
854 (Sigma-Aldrich), human cortisol (1 µM) (Sigma-Aldrich) and T3 (1 nM) (Sigma- Aldrich). On day  
855 3, the medium was refreshed with the same medium used at day 0. On day 6 and 9 of  
856 differentiation, IBMX, dexamethasone, insulin, rosiglitazone, and cortisol were omitted from the  
857 medium. At day 12, the adipocytes were considered mature.

#### 858 **Isolation of IWAT adipocytes**

859 Mice were fed with HFD and treated with SANA 100 mg/kg/day for 8 weeks. After that, mice were  
860 killed by cervical dislocation. Inguinal fat depots were dissected and weighed. Collagenase  
861 digestion solution (collagenase type II, GIBCO 1 mg/ml in Hank's Balanced Salt Solution  
862 containing 2% BSA) was added in 3:1 collagenase fat tissue ratio, and tissue was finely minced  
863 and incubated for 1 hour at 37°C in a shaking incubator. Then adipocyte suspension was  
864 centrifuged at 30g, 3 minutes at RT. Floating mature adipocytes were washed twice with STE-  
865 buffer containing 2% BSA (250 mM sucrose, 5 mM Tris, 2 mM EGTA, pH = 7.4 at 4°C). Finally,  
866 adipocytes were suspended in MIR05 respiration buffer (0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 60  
867 mM MOPS, 20 mM taurine, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 110 mM sucrose, 1 g/L BSA FA-  
868 free, pH 7.1.) with 2% free fatty acid BSA.

#### 869 **Respirometry of adipocytes and cells**

870 Oxygen consumption of cultured differentiated adipocytes and iWAT adipocytes were measured  
871 with high-resolution respirometer (Oxygraph-2k, OROBOROS INSTRUMENTS; Innsbruck,  
872 Austria) and Seahorse. Respiration measurements of C2C12 and SH-SY5Y cells were recorded  
873 in serum free DMEM media with additions of oligomycin (1 µg/mL), titration with carbonyl cyanide

874 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, 0.5  $\mu$ M steps) and antimycin A (0.5  $\mu$ M) and  
875 rotenone (0.5  $\mu$ M) for non-mitochondrial respiration. Adipocyte suspension was pipetted into 2.2  
876 mL mitochondrial respiration medium (MIR05). For oxygen consumption measurements of intact  
877 adipocytes, pyruvate (5 mM) was injected, and basal cellular respiration was recorded (Schottl et  
878 al., 2015). Proton leak respiration was assessed by addition of oligomycin (2.3  $\mu$ g/mL). Titration  
879 of carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, 0.5  $\mu$ M steps) was performed  
880 for measuring maximal cellular respiration rates. Non mitochondrial oxygen consumption was  
881 determined in the presence of antimycin A (0.5  $\mu$ M) and rotenone (0.5  $\mu$ M). Adipocyte respiration  
882 measurements were normalized by the  $\mu$ g/mL of DNA. Basal respiration was determined before  
883 the addition of inhibitors and the uncoupler. Oligomycin-resistant and oligomycin-sensitive  
884 respiration rates were the ATP-independent (leak) and ATP-dependent respiration rates,  
885 respectively. Maximum respiration rate was obtained after titration with FCCP, and the Spare  
886 respiratory capacity was the difference between the Maximum and Basal respiration <sup>50</sup>.

887 Mito-Stress Test assays were performed using the Seahorse XFe96 Bioanalyzer and Seahorse  
888 96-well XF cell culture microplates (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). TERT-hWAT cells  
889 were plated and differentiated in seahorse plates. After differentiation cells were treated with or  
890 without SANA (100  $\mu$ M) for 24 hs and after treatment cell culture media was exchanged for Mito-  
891 Stress assay media containing glucose (10 mM), glutamine (2 mM) and pyruvate (1 mM). This  
892 process was completed through an initial 100  $\mu$ L assay media wash followed by suspension of  
893 175  $\mu$ L to each well. Real-time oxygen consumption and extracellular acidification rates (OCR  
894 and ECAR, respectively) were measured under basal conditions followed by sequential injections  
895 of forskolin (10  $\mu$ M), oligomycin (2  $\mu$ M), FCCP (1  $\mu$ M), rotenone/antimycin A (1  $\mu$ M).

896 **Brown adipose tissue mitochondria isolation**

897 Brown adipose tissue (BAT) was dissected from the subscapular region, placed in tube containing  
898 ice cold isolation buffer (225 mM Mannitol, 75 mM Sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Hepes and 0,1%  
899 BSA fatty acid free – pH 7.4), and minced with a scissor. It was then disrupted in an ice-cold  
900 glass/Teflon Dounce homogenizer with the isolation buffer, filtered to remove the excess of fatty  
901 and transferred to a centrifuge tube. It was centrifuged at 1753 XG for 3 min at 4°C, the  
902 supernatant was discarded, and the pellet resuspended with the isolation buffer and transferred  
903 to a new centrifuge tube. It was centrifuged at 15777 XG for 10 min at 4°C, the supernatant was  
904 discarded, and the pellet resuspended with the isolation buffer and 15% of Percoll solution. It was  
905 centrifuged in a Percoll (Invitrogen) gradient (15%/23%/40%) at 12000 XG for 5 min at 4°C,  
906 acceleration 8 and deceleration 6. The layer formed between 23% and 40 % Percoll was collected,  
907 resuspended in the isolation buffer, and centrifuged at 12000 rpm for 10 min at 4°C with  
908 acceleration 8 and deceleration 6. The supernatant was discarded, and the pellet resuspended  
909 in 200 µL of respiration buffer MIR05 without BSA (MIR 05: 0,5Mm EGTA, 3mM MgCL2, 60 mM  
910 MES, 10mM KH2PO4, 10Mm HEPES, 110 mM sucrose – pH7.4).

#### 911 **UCP1 activity of brown adipose tissue isolated mitochondria**

912 Mice were treated for 15 consecutive days with SC injections of SANA (20 mg/kg/day) and vehicle.  
913 Brown adipose tissue mitochondria were isolated as before. (Oroboros O2K was used to perform  
914 a high resolution respirometry by the addition of 1 mM pyruvate, 1 mM malate, 1 mM ADP, 1  
915 mg/mL BSA fatty acid free, 3 mM GDP and titration of 30, 60 and 90 µm oleate. The result was  
916 normalized by the protein concentration in the chamber. UCP1 activity is measured as sensitive  
917 respiration to GDP, an UCP1 inhibitor.

#### 918 **Analysis of the electrophilic properties of SANA and biotinylated SANA (bSANA)**

919 SANA (10 µM) or bSANA (10 µM) were dissolved in phosphate buffer 20 mM, pH 7.4 and  
920 incubated with β-mercaptoethanol (BME) or glutathione (GSH) 100 µM. The reaction was

921 monitored by UV–Vis spectrophotometry through continuous absorbance readings (200–600 nm)  
922 every min during the first 10 min of the reaction using a Varian Cary 50 bio UV–VIS  
923 spectrophotometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

924

#### 925 **Creatine kinase activity**

926 Forward and reverse creatine kinase activity was measured as described previously<sup>51</sup>. The  
927 forward reaction (production of phosphocreatine) was determined by oxidation of NADH to NAD<sup>+</sup>  
928 at 340 nm, coupled to pyruvate kinase and lactate dehydrogenase. The assay buffer contained 5  
929 mM ATP, 50 mM creatine, 130 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM PEP, 15 U/mL LDH, 7 U/mL PK  
930 and 15 mM Tris pH 8.8. For the reverse reaction (production of ATP), the activity was determined  
931 by NADH formation, coupled to hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. The assay  
932 buffer included 1.5 mM ADP, 2 mM AMP, 50 mM DiAPP, 5 mM glucose, 130 mM KCl, 1 mM  
933 MgCl<sub>2</sub>, 0.7 mM NADP<sup>+</sup>, 9 mM phosphocreatine, 0.5 U/mL glucose-6- phosphate dehydrogenase,  
934 1.3 U/mL hexokinase, and 10 mM Tris pH 7.4. The production of NADH was measured  
935 fluorometrically at an excitation wavelength of 340 nm and an emission wavelength of 460 nm.  
936 The rate was taken from the linear portion of the curve.

937

#### 938 **Statistical analysis**

939 Two ways ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test or Ordinary one-way ANOVA  
940 followed by Bonferroni post hoc or unpaired Student's t-test or linear regression and ANCOVA for  
941 in vivo metabolic analyses were used to calculate P values. In all cases \* indicates p<0.05, \*\*  
942 indicates p<0.01, \*\*\* indicates p<0.001 and \*\*\*\* p<0.0001. In all cases, a minimum of five mice  
943 were used in each experimental condition. All data is presented as mean ± SEM. Calculations  
944 were done using GraphPad Prism.

945 **References**

- 946 1. Flegal, K.M., Graubard, B.I., Williamson, D.F. & Gail, M.H. Cause-specific excess deaths  
947 associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* **298**, 2028-2037 (2007).  
948 2. Jack, D.B. One hundred years of aspirin. *Lancet* **350**, 437-439 (1997).  
949 3. van Dam, A.D., *et al.* Salsalate activates brown adipose tissue in mice. *Diabetes* **64**,  
950 1544-1554 (2015).  
951 4. Smith, B.K., *et al.* Salsalate (Salicylate) Uncouples Mitochondria, Improves Glucose  
952 Homeostasis, and Reduces Liver Lipids Independent of AMPK-beta1. *Diabetes* **65**,  
953 3352-3361 (2016).  
954 5. Nie, L., *et al.* Salsalate Activates Skeletal Muscle Thermogenesis and Protects Mice  
955 from High-Fat Diet Induced Metabolic Dysfunction. *EBioMedicine* **23**, 136-145 (2017).  
956 6. Hawley, S.A., *et al.* The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein  
957 kinase. *Science* **336**, 918-922 (2012).  
958 7. Goldfine, A.B., *et al.* The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2  
959 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med* **152**, 346-357 (2010).  
960 8. Goldfine, A.B., *et al.* Salicylate (salsalate) in patients with type 2 diabetes: a randomized  
961 trial. *Ann Intern Med* **159**, 1-12 (2013).  
962 9. Salastekar, N., *et al.* Salsalate improves glycaemia in overweight persons with diabetes  
963 risk factors of stable statin-treated cardiovascular disease: A 30-month randomized  
964 placebo-controlled trial. *Diabetes Obes Metab* **19**, 1458-1462 (2017).  
965 10. Williams, C.D., *et al.* Aspirin use among adults in the U.S.: results of a national survey.  
966 *Am J Prev Med* **48**, 501-508 (2015).  
967 11. Villacorta, L., Gao, Z., Schopfer, F.J., Freeman, B.A. & Chen, Y.E. Nitro-fatty acids in  
968 cardiovascular regulation and diseases: characteristics and molecular mechanisms.  
969 *Front Biosci (Landmark Ed)* **21**, 873-889 (2016).  
970 12. Batthyany, C., *et al.* Reversible post-translational modification of proteins by nitrated  
971 fatty acids in vivo. *J Biol Chem* **281**, 20450-20463 (2006).  
972 13. Kelley, E.E., *et al.* Fatty acid nitroalkenes ameliorate glucose intolerance and pulmonary  
973 hypertension in high-fat diet-induced obesity. *Cardiovasc Res* **101**, 352-363 (2014).  
974 14. Rom, O., *et al.* Nitro-fatty acids protect against steatosis and fibrosis during development  
975 of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *EBioMedicine* **41**, 62-72 (2019).  
976 15. Khoo, N.K.H., *et al.* Electrophilic nitro-oleic acid reverses obesity-induced hepatic  
977 steatosis. *Redox Biol* **22**, 101132 (2019).  
978 16. Ibarburu, S., *et al.* A Nitroalkene Benzoic Acid Derivative Targets Reactive Microglia and  
979 Prolongs Survival in an Inherited Model of ALS via NF-kappaB Inhibition.  
980 *Neurotherapeutics* **18**, 309-325 (2021).  
981 17. Rodriguez-Duarte, J., *et al.* A novel nitroalkene-alpha-tocopherol analogue inhibits  
982 inflammation and ameliorates atherosclerosis in Apo E knockout mice. *Br J Pharmacol*  
983 **176**, 757-772 (2019).  
984 18. Dapuetto, R., *et al.* A novel nitroalkene vitamin E analogue inhibits the NLRP3  
985 inflammasome and protects against inflammation and glucose intolerance triggered by  
986 obesity. *Redox Biol* **39**, 101833 (2021).  
987 19. Kopp, E. & Ghosh, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*  
988 **265**, 956-959 (1994).  
989 20. Kazak, L., *et al.* A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and  
990 thermogenesis in beige fat. *Cell* **163**, 643-655 (2015).  
991 21. De Meis, L., Ketzler, L.A., Camacho-Pereira, J. & Galina, A. Brown adipose tissue  
992 mitochondria: modulation by GDP and fatty acids depends on the respiratory substrates.  
993 *Biosci Rep* **32**, 53-59 (2012).

- 994 22. Oudman, I., Clark, J.F. & Brewster, L.M. The effect of the creatine analogue beta-  
995 guanidinopropionic acid on energy metabolism: a systematic review. *PLoS One* **8**,  
996 e52879 (2013).
- 997 23. Kazak, L., *et al.* Genetic Depletion of Adipocyte Creatine Metabolism Inhibits Diet-  
998 Induced Thermogenesis and Drives Obesity. *Cell Metab* **26**, 660-671 e663 (2017).
- 999 24. Kazak, L., *et al.* Ablation of adipocyte creatine transport impairs thermogenesis and  
1000 causes diet-induced obesity. *Nat Metab* **1**, 360-370 (2019).
- 1001 25. Rubino, D.M., *et al.* Effect of Weekly Subcutaneous Semaglutide vs Daily Liraglutide on  
1002 Body Weight in Adults With Overweight or Obesity Without Diabetes: The STEP 8  
1003 Randomized Clinical Trial. *JAMA* **327**, 138-150 (2022).
- 1004 26. Yuan, M., *et al.* Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates  
1005 or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* **293**, 1673-1677 (2001).
- 1006 27. Hussain, M.F., Roesler, A. & Kazak, L. Regulation of adipocyte thermogenesis:  
1007 mechanisms controlling obesity. *FEBS J* **287**, 3370-3385 (2020).
- 1008 28. Cypess, A.M., *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult  
1009 humans. *N Engl J Med* **360**, 1509-1517 (2009).
- 1010 29. Hanssen, M.J., *et al.* Short-term Cold Acclimation Recruits Brown Adipose Tissue in  
1011 Obese Humans. *Diabetes* **65**, 1179-1189 (2016).
- 1012 30. Meex, R.C., Phielix, E., Moonen-Kornips, E., Schrauwen, P. & Hesselink, M.K.  
1013 Stimulation of human whole-body energy expenditure by salsalate is fueled by higher  
1014 lipid oxidation under fasting conditions and by higher oxidative glucose disposal under  
1015 insulin-stimulated conditions. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 1415-1423 (2011).
- 1016 31. Roesler, A. & Kazak, L. UCP1-independent thermogenesis. *Biochem J* **477**, 709-725  
1017 (2020).
- 1018 32. Kazak, L. & Spiegelman, B.M. Mechanism of futile creatine cycling in thermogenesis.  
1019 *Am J Physiol Endocrinol Metab* **319**, E947-E949 (2020).
- 1020 33. Politis-Barber, V., *et al.* Ckmt1 is Dispensable for Mitochondrial Bioenergetics Within  
1021 White/Beige Adipose Tissue. *Function* **3**(2022).
- 1022 34. Rahbani, J.F., *et al.* Creatine kinase B controls futile creatine cycling in thermogenic fat.  
1023 *Nature* **590**, 480-485 (2021).
- 1024 35. Maqdasy, S., *et al.* Impaired phosphocreatine metabolism in white adipocytes promotes  
1025 inflammation. *Nat Metab* **4**, 190-202 (2022).
- 1026 36. Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., Kay, L. & Schlattner, U. Role of creatine and  
1027 creatine kinase in UCP1-independent adipocyte thermogenesis. *Am J Physiol*  
1028 *Endocrinol Metab* **319**, E944-E946 (2020).
- 1029 37. Nicholls, D.G. & Brand, M.D. A critical assessment of the role of creatine in brown  
1030 adipose tissue thermogenesis. *Nat Metab* **5**, 21-28 (2023).
- 1031 38. Cero, C., *et al.* beta3-Adrenergic receptors regulate human brown/beige adipocyte  
1032 lipolysis and thermogenesis. *JCI Insight* **6**(2021).
- 1033 39. Wu, Q., *et al.* Intestinal hypoxia-inducible factor 2alpha regulates lactate levels to shape  
1034 the gut microbiome and alter thermogenesis. *Cell Metab* **33**, 1988-2003 e1987 (2021).
- 1035 40. Chazarin, B., *et al.* Metabolic reprogramming involving glycolysis in the hibernating  
1036 brown bear skeletal muscle. *Front Zool* **16**, 12 (2019).
- 1037 41. Min, S.Y., *et al.* Diverse repertoire of human adipocyte subtypes develops from  
1038 transcriptionally distinct mesenchymal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**,  
1039 17970-17979 (2019).
- 1040 42. Rivera, B., *et al.* Quantitative proteomic dataset from oro- and naso-pharyngeal swabs  
1041 used for COVID-19 diagnosis: Detection of viral proteins and host's biological processes  
1042 altered by the infection. *Data Brief* **32**, 106121 (2020).
- 1043 43. Carvalho, P.C., *et al.* Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for  
1044 proteomics 4.0. *Nat Protoc* **11**, 102-117 (2016).

- 1045 44. Carvalho, P.C., Yates, J.R., 3rd & Barbosa, V.C. Improving the TFCold test for differential  
1046 shotgun proteomics. *Bioinformatics* **28**, 1652-1654 (2012).
- 1047 45. Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E.J., Shi, Z. & Zhang, B. WebGestalt 2019: gene set  
1048 analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res* **47**, W199-W205 (2019).
- 1049 46. Perez-Riverol, Y., *et al.* The PRIDE database and related tools and resources in 2019:  
1050 improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res* **47**, D442-D450 (2019).
- 1051 47. Santos, M.D.M., *et al.* Simple, efficient and thorough shotgun proteomic analysis with  
1052 PatternLab V. *Nat Protoc* **17**, 1553-1578 (2022).
- 1053 48. Kazak, L., *et al.* Genetic Depletion of Adipocyte Creatine Metabolism Inhibits Diet-  
1054 Induced Thermogenesis and Drives Obesity. *Cell Metab* **26**, 693 (2017).
- 1055 49. Markussen, L.K., *et al.* Characterization of immortalized human brown and white pre-  
1056 adipocyte cell models from a single donor. *PLoS One* **12**, e0185624 (2017).
- 1057 50. Brand, M.D. & Nicholls, D.G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*  
1058 **435**, 297-312 (2011).
- 1059 51. Lin, G., Liu, Y. & MacLeod, K.M. Regulation of muscle creatine kinase by  
1060 phosphorylation in normal and diabetic hearts. *Cell Mol Life Sci* **66**, 135-144 (2009).
- 1061

## Supplementary Files

This is a list of supplementary files associated with this preprint. Click to download.

- [SupplementaryTableI.xlsx](#)
- [SupplementaryTableII.xlsx](#)
- [SupplementaryTableIII.xlsx](#)
- [SupplementaryTableIV.xlsx](#)
- [SupplementaryTableV.xlsx](#)
- [SupplementaryTableVI.xlsx](#)
- [SupplementaryTableVII.xlsx](#)
- [SupplementaryTableVIIIreagentsandresources.xlsx](#)
- [SupplementaryInformation.pdf](#)

### 3.6. Discusión

Las enfermedades metabólicas crónicas, como la obesidad y la diabetes tipo II, constituyen uno de los mayores retos para los sistemas de salud actuales. Estas enfermedades suelen estar asociadas a un estado inflamatorio sistémico estéril y de bajo grado. Nuestro grupo ha venido trabajado en el desarrollo de nitroalquenos derivados de diferentes sillares estructurales con propiedades antiinflamatorias beneficiosas en diversos modelos preclínicos de enfermedades. En una nueva generación de compuestos, se buscó aprovechar las propiedades antiinflamatorias y metabólicas del fármaco ancestral salicilato mediante el diseño de su derivado nitroalqueno ácido 5-(2-nitroetilénico)salicílico (SANA). La evaluación del SANA en un modelo murino de obesidad inducida por dieta (DIO) develó un desempeño insospechado del fármaco frente a los parámetros metabólicos medidos. Estos efectos se obtuvieron a dosis notablemente menores que las usadas anteriormente con salicilato en modelos animales y ensayos clínicos. Dichos resultados no se justifican únicamente por la adición del grupo nitroalquenilo, dado que fueron exclusivos del SANA frente a otros nitroalquenos sintetizados por nuestro equipo de trabajo. Tampoco responden a una activación diferencial de AMPK con respecto al salicilato. De forma relevante, se encontró que el SANA estimulaba un estado de gasto energético asociado a termogénesis, sin embargo, este hallazgo no estuvo acompañado de un aumento en la expresión o actividad de UCP1. En ese contexto, un abordaje no dirigido usando las capacidades analíticas de la proteómica cuantitativa resultó una estrategia eficaz para la elucidación de las vías moleculares involucradas.

La decisión de diseñar la síntesis del SANA a partir del salicilato aprovecha dos elementos fundamentales de este compuesto: primero su uso masivo, sobre todo en su forma acetilada (aspirina), lo cual es un reflejo de su comprobada seguridad en el uso clínico; en segundo lugar, sus efectos metabólicos bien documentados <sup>17,118,132–135,122–128,131</sup>. La síntesis del compuesto de interés se llevó a cabo mediante una reacción de un solo paso, durante un tiempo de 2 h y en condiciones de temperatura moderada (60 °C). La obtención del SANA con un rendimiento mayor al 90%, indica que la reacción no sólo es eficiente en términos de tiempo y condiciones operativas, sino que también es altamente productiva, lo que subraya su viabilidad para aplicaciones a gran escala. El análisis mediante espectrometría de masa de alta resolución mostró la relación masa/carga y fragmentación esperada, confirmando inequívocamente la identidad del producto deseado.

Partiendo del conocimiento de que los nitroalquenos ejercen sus efectos principalmente a través de sus propiedades electrofílicas<sup>71,72,192</sup>, una evaluación clave en el proceso de desarrollo del SANA como potencial fármaco fue comprobar que tuviera la capacidad de reaccionar como electrófilo. Esto se comprobó mediante la reacción con dos nucleófilos de baja masa molecular, BME y GSH, con los cuales el SANA fue capaz de formar los productos de adición de Michael esperados. Con ambos nucleófilos se obtuvo un perfil de absorbancia similar durante la reacción, con una disminución de la absorción por la pérdida de la conjugación del grupo nitroalquenilo al anillo aromático del esqueleto salicilato. Este comportamiento es característico de la reacción de nitroalquenos tanto de ácidos grasos<sup>192</sup> como para otros basados en compuestos aromáticos diseñados anteriormente por nuestro grupo de trabajo<sup>113,114,116</sup>. En ambos casos la cinética de reacción fue coherente con la formación de aductos de forma reversible, algo que en el contexto biológico tiene gran relevancia. Teniendo en cuenta la amplia variedad de tioles presentes en la célula y los fluidos, es probable que los nitroalquenos se encuentren mayormente como parte de un conjunto dinámico que alterna entre formas libres y unidas, lo cual impacta en su transporte, almacenamiento y capacidades de reacción. Adicionalmente, es importante remarcar que la capacidad de un nitroalqueno de reaccionar en especial con tioles de proteínas se verá afectada por el entorno del residuo nucleofílico<sup>192</sup>.

Dado que el objetivo buscado con la síntesis del SANA fue generar un compuesto con efectos metabólicos, se recurrió a un modelo animal de DIO ampliamente utilizado en el estudio de patologías relacionadas a la obesidad y la diabetes<sup>193</sup>, en el que se alimenta a los animales con HFD. De hecho, muchos de los estudios que respaldan los efectos metabólicos del salicilato<sup>127,128,131,132</sup> y de varios nitroalquenos<sup>106,108,112,113</sup> se basan en el desempeño de las moléculas en este modelo. El abordaje integral de los efectos metabólicos del SANA, incluyendo los controles con dieta estándar y el sillar estructural salicilato, se muestra en los resultados del manuscrito adjunto a este capítulo. Sin embargo, para la búsqueda de mecanismos de acción del SANA llevada a cabo en esta tesis, los resultados del desempeño metabólico y los análisis proteómicos sucesivos se acotaron a la comparación de animales tratados con HFD tratados o no con SANA.

Efectivamente, el SANA logró prevenir el aumento de peso inducido por la HFD en un 30% aproximadamente al cabo de 8 semanas, no sólo respecto al control sin fármaco, sino también al control tratado con salicilato. Un comportamiento similar se observó con las principales anomalías

metabólicas asociadas con la obesidad, como la resistencia a la insulina y el daño hepático. La incapacidad del metabolito saturado del SANA (M1) frente a la DIO y el control de la glucosa, reforzó la ganancia de función lograda al incorporar el grupo nitroalqueno en el diseño del SANA.

En el contexto de la salud humana, con mayor frecuencia se requieren intervenciones terapéuticas una vez que la obesidad y sus complicaciones metabólicas están establecidas. Por lo tanto, el SANA también se evaluó en un modelo de reversión, en el cual la administración del fármaco se llevó a cabo después de un período de alimentación con HFD, durante el cual los ratones desarrollaron obesidad. El SANA mostró un desempeño similar en ambos modelos experimentales. Además, no alteró la ingesta de alimentos ni provocó signos de toxicidad. Con lo cual se evidencia su eficacia y seguridad en las condiciones experimentales usadas.

En conjunto, el fenotipo desencadenado por el SANA fue sugerente de un aumento en el gasto energético en el tejido adiposo como un posible mecanismo de acción. Para profundizar en esa hipótesis se realizó un análisis proteómico no dirigido en iWAT, teniendo en cuenta que además de ser un depósito de tejido adiposo abundante, también tiene la capacidad de contribuir con el gasto energético a través de su participación en la respuesta termogénica <sup>170,194,195</sup>.

Los análisis de LC-MS/MS a partir de extractos totales de iWAT permitieron obtener perfiles proteómicos comparables entre las condiciones HFD y HFD+SANA, pudiéndose identificar alrededor de 3000 grupos de proteínas entre todas las condiciones biológicas, con valores similares en cuanto a cantidad de espectros, péptidos y proteínas entre réplicas y condiciones biológicas. Este nivel de identificación de proteínas es comparable con el obtenido en un estudio reciente en el que se aborda el análisis integrado del proteoma y el fosfoproteoma de los tejidos adiposos marrón interescapular y blanco subcutáneo en ratones alimentados con HFD <sup>196</sup>. Si bien Wang et al. identifican alrededor de un 50% más de grupos de proteínas (de las cuales 3863 fueron cuantificables en al menos el 60% de las muestras), es importante notar que los animales llegaron a un peso cercano a los 25 g en las 4 semanas de alimentación con HFD (60% de grasa). Lo cual es considerablemente menor que los aproximadamente 38 g ganados al cabo de 8 semanas en nuestro modelo (Figura 13). Sería esperable que en nuestro caso la relación proteína/grasa en los extractos de iWAT fuera menor, potencialmente impactando en la capacidad total de

identificación de proteínas. Otros dos análisis, realizados en células madre derivadas de tejido adiposo humano <sup>197</sup> y adipocitos subcutáneos abdominales y viscerales aislados de biopsias durante la cirugía bariátrica en mujeres con obesidad severa <sup>198</sup>, obtuvieron 3420 y 3686 proteínas respectivamente. Como en nuestro trabajo, en las referencias mencionadas, el fraccionamiento de los péptidos tripticos se basó solamente en una dimensión cromatográfica (nano HPLC), utilizando condiciones de separación y espectrómetros de masa con desempeños comparables.

En iWAT, el SANA produjo la sobrerrepresentación de 109 proteínas. La asignación de dichas proteínas a procesos biológicos apuntó al enriquecimiento principalmente del metabolismo del propanoato (propionato) y piruvato y de la fosforilación oxidativa. Además, en concordancia con las marcas fenotípicas que apuntaban al aumento del gasto energético, se identificó a la termogénesis como una de las vías enriquecidas significativamente.

El propionato, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena impar, la degradación oxidativa de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) valina e isoleucina y los esqueletos carbonados de metionina, treonina, timina y colesterol generan propionil-CoA <sup>199,200</sup>. Aunque se utiliza para funciones específicas y diversas, gran parte del propionato producido por la mayoría de los organismos es catabolizado <sup>199</sup>. Mediado por la propionil-CoA carboxilasa (PCC), el propionil-CoA es carboxilado para formar metilmalonil-CoA, que posteriormente se convierte a succinil-CoA, un intermediario del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). De esa forma el propionil-CoA participa en proceso de reposición anaplerótica en la mitocondria <sup>200</sup>. Precisamente, la subunidad beta de la PCC fue una de las proteínas del metabolismo del propanoato aumentadas por el SANA. Formando parte del mismo proceso biológico, la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa subunidad beta mitocondrial también resultó incrementada a causa del SANA. Esta proteína forma parte del complejo mitocondrial alfa-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKD). El complejo BCKD cataliza la descarboxilación oxidativa en varios pasos de los alfa-cetoácidos derivados de los BCAA valina, leucina e isoleucina, produciendo CO<sub>2</sub> y acil-CoA que posteriormente se utilizan para producir energía <sup>201</sup>. Los BCAA son aminoácidos esenciales necesarios para los procesos anabólicos, pero también se importan a la mitocondria para las reacciones catabólicas <sup>202</sup>. Las concentraciones plasmáticas de BCAA son frecuentemente elevadas en la obesidad y la diabetes de tipo 2. Se ha demostrado que los niveles de BCAA en la obesidad se correlacionan con la resistencia a la insulina y son un predictor sensible de la diabetes en el futuro <sup>203</sup>. Interesantemente,

se ha visto que, tras la exposición al frío, el BAT utiliza activamente los BCAA en las mitocondrias para la termogénesis y promueve el aclaramiento sistémico de BCAA en ratones y humanos. A su vez, un defecto específico del BAT en el catabolismo de los BCAA atenúa el aclaramiento sistémico de los BCAA, la oxidación de combustibles en el BAT y la termogénesis, lo que conduce a la obesidad inducida por la dieta y a la intolerancia a la glucosa <sup>204</sup>. Los resultados de otro trabajo sugieren que la oxidación mitocondrial de BCAA aumenta la termogénesis en la grasa parda y la grasa beige a través de mecanismos dependientes e independientes de UCP1, respectivamente <sup>202</sup>.

El tratamiento con SANA también produjo la sobrerrepresentación de otra proteína con un rol importante dentro del metabolismo del piruvato, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCK) citosólica. Esta enzima cataliza la descarboxilación reversible y la fosforilación del oxaloacetato (OAA) y actúa como enzima limitante de la gluconeogénesis. Es capaz de regular los procesos que controlan los niveles de intermediarios metabólicos en el TCA (cataplerosis y anaplerosis). A niveles bajos de glucosa, cataliza la conversión cataplerótica de oxaloacetato en fosfoenolpiruvato (PEP), el paso que limita la velocidad en la ruta metabólica que produce glucosa a partir de lactato y otros precursores derivados del TCA. A niveles altos de glucosa, cataliza la conversión anaplerótica de fosfoenolpiruvato en OAA. Durante la exposición al frío, la captación de lípidos y la lipogénesis reponen las reservas de grasa que se han oxidado. El control de la lipogénesis durante la exposición al frío es complejo y está regulado en parte por el metabolismo del piruvato. El piruvato se puede destinar a la oxidación completa convirtiéndolo en acetil-CoA mediante la acción enzimática del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC) <sup>205</sup>.

En adipocitos marrones/beige el aumento de la fosforilación oxidativa a través de vías catabólicas forma un gradiente de protones efectivo entre la matriz y el espacio intermembrana para la síntesis de ATP. Sin embargo, el gradiente de protones no está acoplado a la síntesis de ATP, y el proceso de fuga de protones es una parte significativa de la tasa metabólica en reposo, lo que sugiere que las proteínas de desacoplamiento mitocondrial son objetivos potenciales para la obesidad <sup>206</sup>. En vista de ello, la interpretación del análisis de los procesos biológicos incrementados por el SANA apuntó a un estado fundamentalmente catabólico de iWAT ligado a la termogénesis.

En este contexto, fue evidente la necesidad de estudiar el impacto del fármaco en el proteoma mitocondrial de iWAT. En este caso 2500 proteínas fueron identificadas en los extractos

mitocondriales de iWAT de ratones alimentados con HFD tratados o no con SANA. Si bien la estrategia de enriquecimiento de mitocondrias usada en este trabajo genera un extracto mitocondrial considerado “crudo”, alrededor del 30% de las casi 1600 proteínas anotadas como mitocondriales en el proteoma de ratón fueron identificadas en las muestras generadas. Independientemente de los niveles de expresión máximos a alcanzables por cada una de estas proteínas, lo cual en gran medida define su límite de detección, es esperable que sólo una fracción de estas se esté expresando en un contexto biológico dado. Sumado a esto se encuentra el hecho de que la localización celular de muchas proteínas, entre ellas las proteínas mitocondriales, continúa siendo un tema abierto a pesar de múltiples avances experimentales y predictivos<sup>207 208</sup>. Una evaluación del enriquecimiento de proteínas mitocondriales con respecto al extracto total de iWAT mostró que tanto en los ratones HFD como HFD+SANA, los marcadores mitocondriales TOMM40, COX4I1 y MDH2 resultaron enriquecidos en al menos el doble (Figura 20). En un contexto termogénico, como el observado en el iWAT total, sería esperable un aumento del contenido mitocondrial, dado que la biogénesis de este organelo está estimulada durante la termogénesis<sup>170</sup>. A partir de la evaluación por espectrometría de masa de los marcadores mitocondriales TOMM40, COX4I1 y MDH2, no se observó un aumento inducido por SANA. Sin embargo, teniendo en cuenta que se trata de una purificación mitocondrial y la normalización del contenido proteico se realiza por masa de proteína, es comprensible que ocurra un fenómeno de emparejamiento de la mayoría de las proteínas mitocondriales. Para poder concluir con respecto a esta comparación sería necesario utilizar un método que no involucre enriquecimiento, como por ejemplo la cuantificación de ADN mitocondrial.

En el caso del proteoma mitocondrial de iWAT, la comparación de los perfiles proteómicos sugirió un impacto mayor del SANA sobre la mitocondria, basado en la sobrerrepresentación de 262 proteínas. El análisis de procesos biológicos reforzó el enriquecimiento en el TCA, esta vez junto al metabolismo de varios aminoácidos, incluido el de los BCAA valina, leucina e isoleucina. Otra de las vías más enriquecidas resultó ser el metabolismo de la arginina y la prolina, una vía que además está conectada con el metabolismo de la creatina. De hecho, ha sido postulada como parte de una vía termogénica (NST) dependiente de creatina<sup>177</sup> alternativa a la de UCP1. En nuestro trabajo, el enriquecimiento del metabolismo de arginina/creatina y prolina coincidió con el aumento de GATM, la enzima limitante en la biosíntesis de la creatina, en el proteoma

mitocondrial de iWAT de los ratones HFD+SANA y con la identificación de una creatina quinasa (CKM) como una de las proteínas exclusivas de mayor abundancia en el proteoma total de iWAT de los ratones tratados con el fármaco (Figura 17A). En un estudio posterior a la descripción de la vía termogénica dependiente de creatina, se investigó la importancia fisiológica del metabolismo de la creatina en el tejido adiposo <sup>209</sup>. Para eso, GATM fue eliminada selectivamente del tejido adiposo de ratones utilizando una recombinasa Cre dirigida por el promotor de la adiponectina. Los ratones Adipo-Gatm KO mostraron ser propensos a la obesidad inducida por dieta, presentaron disfunción metabólica, alteración de la tolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia en ayunas. En conjunto los resultados en dicho trabajo proporcionan evidencia genética *in vivo* del papel de la GATM del tejido adiposo y el metabolismo de la creatina en el gasto energético y la defensa contra la obesidad inducida por la dieta. Es importante resaltar que los productos derivados de la actividad GATM (creatina, fosfocreatina y sarcosina) se redujeron significativamente en el BAT de los animales KO, lo cual pone de manifiesto el rol activo de la biosíntesis de creatina en los niveles locales de creatina en el tejido adiposo. La suplementación con creatina en la dieta pudo rescatar la termogénesis adrenérgica deteriorada de los ratones Adipo-Gatm KO <sup>209</sup>.

En nuestro modelo de DIO, se constató el aumento de los niveles de expresión de marcadores de termogénesis concomitantemente con varios genes reguladores que han sido identificados como necesarios para potenciar el metabolismo de la creatina en el tejido adiposo, incluidas diferentes creatina quinasas y enzimas esenciales para la síntesis de creatina. El aumento en iWAT de creatina y otros metabolitos relacionados a causa del SANA (Figura 24), junto con una serie de experimentos *in vivo* (Figura 27), permitió confirmar la participación de esta vía alternativa de NST en el efecto protermogénico del fármaco. Esencialmente, dicho efecto fue abolido completamente al reducir los niveles celulares de creatina mediante la inhibición de su transporte con  $\beta$ -GPA. Este resultado es consistente la atenuación en el metabolismo oxidativo de los tejidos adiposos termogénicos *in vivo* observados por Kazak y colaboradores <sup>177</sup> mediante la reducción de los niveles de creatina con  $\beta$ -GPA. Nuestros resultados y los de Kazak y colaboradores mencionados antes <sup>177,209</sup> demuestran que tanto la síntesis como el transporte de creatina son necesarios para sostener la termogénesis dependiente de este metabolito en el tejido adiposo, fundamentalmente en iWAT.

Uno de los mecanismos propuestos para los efectos metabólicos del salicilato se basa en su capacidad de estimular el gasto energético por desacoplamiento directo de la mitocondria <sup>128</sup>. En dicho estudio, mediante la estimulación de la respiración con palmitoil-CoA y posterior inhibición de UCP1 con GDP en mitocondrias aisladas de BAT, se concluyó que el salicilato (salicilato) aumenta el consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>) mitocondrial en BAT independientemente de UCP1. El tratamiento con salicilato tampoco alteró la termogénesis mediada por UCP1 en respuesta a la estimulación adrenérgica  $\beta_3$  *in vivo* <sup>128</sup>, aunque anteriormente se reportó que el salicilato activa directamente el BAT a través de un mecanismo que involucra a UCP1 por medio de la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) <sup>131</sup>. Sin embargo, el SANA no desacopló la membrana como se propuso para el salicilato <sup>128</sup> (ver Figura 5I-K del manuscrito adjunto a este capítulo). Tampoco incrementó los niveles de expresión de UCP1, por el contrario, produjo una disminución en los niveles de ARNm de Ucp1 en iWAT. Estos resultados refuerzan la idea de la estimulación por SANA de una vía termogénica independiente de UCP1 y están alineados con la observación de un mecanismo compensatorio entre la vía clásica de termogénesis basada en UCP1 y la dependiente de creatina <sup>177</sup>.

En el mismo sentido que los marcadores del metabolismo de creatina y del ciclo fútil de fosforilación/desfosforilación de este metabolito, el grupo de Bruce M. Spiegelman <sup>177</sup> encontraron a la fosfoetanolamina/fosfocolina fosfatasa (Phospho1) significativamente incrementada a nivel de ARNm en tejido adiposo de ratones deficientes de UCP1, por lo que examinaron su posible participación en el ciclo de sustrato impulsado por la creatina. El estudio del rol en la bioenergética de adipocitos blancos y marrones mostró un marcado efecto de PHOSPHO1 en la respiración basal, regulada en gran medida por la demanda de ATP, involucrando a esta fosfatasa con el consumo de oxígeno acoplado a ATP. Esto podría sugerir que PHOSPHO1 regula el ciclo del sustrato liberando el fosfato de alta energía de la fosfocreatina (PCr). Sin embargo, la actividad fosfatasa de PHOSPHO1 con PCr fue marginal en las condiciones probadas en el trabajo, evidenciando que el rol de la proteína podría ser posterior a la desfosforilación de PCr, por ejemplo, en una serie de pasos de transferencia del grupo fosfato.

PHOSPHO1 tiene un rol importante en la generación de fosfato inorgánico para la mineralización ósea <sup>210</sup> y tiene una alta actividad hacia fosfoetanolamina y fosfocolina <sup>182</sup>. Varios trabajos recientes sitúan a esta fosfatasa en un rol regulador en el metabolismo energético <sup>179-181</sup>, aunque

algunos resultados son controversiales, sobre todo con respecto al efecto de la depleción de PHOSPHO1 sobre la activación de la vía termogénica dependiente de UCPI.

El SANA aumentó a Phospho1 junto con enzimas del metabolismo de 1C (CHDH, ALDH7A1 y BHMT) por las cuales se obtiene metionina a partir de colina<sup>183</sup>, sugiriendo una conexión entre la termogénesis dependiente de creatina y el metabolismo de 1C en iWAT. Sin embargo, la biosíntesis de la creatina y el reciclaje de la metionina no son procesos típicamente asociados al tejido adiposo<sup>211</sup> y varias de las enzimas que participan en estos procesos han sido reportadas con localizaciones celulares diferentes a la mitocondria. Un ejemplo de esto es BHMT, una proteína abundante en el hígado pero poco abundante o nula en el tejido adiposo<sup>212,213</sup> y que además está reportada como citosólica<sup>214</sup>. No obstante, BHMT es uno de los marcadores moleculares que encontramos aumentados tanto en la fracción mitocondrial de tejido adiposo de animales tratados con SANA como en el tejido adiposo marrón de ratones expuestos al frío. Otros trabajos además del nuestro han detectado a BHMT en extractos mitocondriales purificados por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa o Percoll<sup>177,215</sup> y en el tejido adiposo<sup>177,216</sup>. Por otro lado, varios reportes relacionan a BHMT con un efecto obesogénico y dibetogénico<sup>212,213,216</sup>, lo cual es contradictorio con el fenotipo observado en los ratones tratados con SANA. Aunque dos de estos trabajos coinciden en el aumento del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) en plasma e hígado<sup>212,213</sup>, un hormona capaz de inducir amarronamiento del tejido adiposo<sup>217</sup>, tienen diferencias en cuanto a la activación de termogénesis como parte del mecanismo propuesto para los efectos producidos por la deficiencia de BHMT. Por su parte Liu y colaboradores<sup>216</sup> encontraron que la expansión adiposa inducida por BHMT fue mediada por la estimulación de la vía p38 MAPK/Smad, de forma directa sobre el tejido adiposo. Es evidente que el rol de BHMT en el metabolismo energético es complejo y amerita estudios adicionales. Si efectivamente BHMT está relacionado con la vía alternativa de termogénesis dependiente de creatina, los resultados paradójicos entre los efectos fenotípicos inducidos por el SANA y por la ablación de BHMT podrían en alguna medida deberse a la regulación del mecanismo compensatorio entre diferentes vías termogénicas, que aún no se comprende totalmente.

Los resultados de nuestro análisis proteómico en extractos mitocondriales de hígado de ratones expuestos al frío mostraron un aumento significativo de BHMT, junto con otras dos proteínas importantes en el metabolismo de 1C (MAT1A y CTH). Al igual que en iWAT (HFD+SANA),

BHMT fue identificada en el extracto mitocondrial de hígado. MAT1A, la enzima que cataliza la formación de S-adenosilmetionina a partir de metionina y ATP, tampoco está anotada como una proteína localizada en la mitocondria <sup>218</sup>, a pesar de haber sido detectada en la matriz mitocondrial de hígado mediante microscopía electrónica <sup>184</sup>. Un aspecto importante a tener en cuenta respecto a la determinación de la localización celular es el tipo celular utilizado. Particularmente, BHMT y MAT1A no fueron identificadas en un estudio exhaustivo del proteoma mitocondrial humano <sup>176</sup>; sin embargo, estas proteínas se expresan entre 20 y 30 veces más en hepatocitos humanos que la línea celular de hígado analizada (Huh7) <sup>219</sup>.

Los análisis de enriquecimiento en procesos biológicos (Figura 32) de las proteínas inducidas a 4 °C en el proteoma de hígado mostraron un impacto en el metabolismo del colesterol, la metionina y de aminoácidos alfa en general. Es conocido que la síntesis de creatina es una vía cuantitativamente importante en el metabolismo de los aminoácidos e impone una carga apreciable sobre el metabolismo de la metionina y de la arginina <sup>211</sup>. Aunque no parece suponer una carga importante para el metabolismo de la glicina en adultos, ya que este aminoácido se sintetiza fácilmente <sup>211</sup>, se ha planteado que la capacidad de síntesis de glicina en humanos podría ser limitada. Lo cual respalda sugerencias previas en la literatura que indican que la glicina es un aminoácido semi-esencial y que debería ser consumida como un suplemento nutricional para garantizar un metabolismo saludable <sup>220</sup>. Un trabajo reciente muestra que la biosíntesis del grupo hemo es el principal contribuyente a los niveles intracelulares de hemo en los adipocitos marrones y que su inhibición provoca disfunción mitocondrial y reducción de UCP1 <sup>221</sup>. La síntesis del hemo comienza con la condensación de glicina y succinil-CoA, catalizada por la enzima ácido aminolevulínico sintasa (ALAS). En el trabajo de Duerre y colaboradores, la delección de *Alas1* condujo a una reducción significativa del hemo intracelular y a una regulación a la baja de UCP1 y la fosforilación oxidativa. La evaluación proteómica global del impacto de la delección de *Alas1* en los adipocitos marrones, mostró que aproximadamente el 30% de las proteínas significativamente reducidas en las células *Alas1* KO se localizan en la mitocondria, incluyendo UCP1 y varios componentes de la cadena de transporte de electrones. Por el contrario, CKB, reportada como controladora del ciclo fútil de la creatina en la grasa termogénica <sup>221</sup>, aumentó en células *Alas1* KO y en el tejido adiposo marrón de ratones deficientes de *Alas1* específicamente en ese tejido. En el trabajo se propone que la regulación negativa de UCP1 está relacionada con la

acumulación de los precursores de la síntesis de hemo (provenientes del catabolismo de BCAA) a causa del bloqueo de Alas1<sup>221</sup>. Sin embargo, se podría pensar que en condiciones fisiológicas (Alas1 WT) un bloqueo similar podría provenir del agotamiento de glicina. Una pregunta muy interesante que surge al respecto es si la competencia (en un contexto altamente catabólico como la termogénesis) por la glicina u otros metabolitos entre la biosíntesis del grupo hemo y a la síntesis de creatina puede ser parte de la regulación compensatoria entre las vías termogénicas dependientes de UCP1 y de la creatina.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo fue la búsqueda de blancos moleculares del SANA. Dadas sus propiedades electrofílicas, la principal hipótesis sobre su interacción con posibles blancos se basó en la modificación covalente de proteínas mediante adición de Michael. De acuerdo con eso, se constató su capacidad de reaccionar con nucleófilos y la capacidad de modificar covalentemente a la proteína modelo catalasa de *Bos taurus* en residuos de cisteína. Un análogo biotinilado del SANA (bSANA), diseñado y sintetizado por nuestro grupo para capturar las proteínas de unión a SANA utilizando una resina con alta afinidad por la biotina, tuvo un desempeño similar al del SANA en cuanto a electrofilicidad y modificación covalente de la catalasa. La identificación de proteínas significativamente sobrerrepresentadas en el pull-down a partir de lisados de BAT incubado con bSANA, generó una lista de aproximadamente 300 proteínas de unión a SANA. Un estudio a gran escala usando química clic, reportó una lista de aproximadamente 100 proteínas como el núcleo de proteínas de unión a ácido salicílico en una línea celular humana<sup>222</sup>. Entre las proteínas de unión a SANA se destacan las creatina quinasas mitocondriales CKMT1/2 que forman parte del metabolismo de creatina. El análisis por LC-MS/MS de CKMT2 murina recombinante señaló a la Cys<sub>238</sub> como blanco preferencial del SANA *in vitro*. Las cisteínas 317 y 397 también se encontraron modificadas en menor medida y no se identificó ningún residuo de histidina unido a SANA.

Originalmente, se propuso que CKMT1 impulsaba la fosforilación de la creatina en el tejido adiposo beige<sup>177</sup>. Hallazgos recientes de los mismos investigadores propusieron que CKB controla la termogénesis dependiente de creatina en el BAT<sup>32</sup>. Sin embargo, el papel de CKB y cómo funciona el ciclo termogénico dependiente de creatina ha sido cuestionado<sup>223,224</sup>. Por otro lado, varios informes sugieren que CKMT2 es un jugador importante en la termogénesis del tejido adiposo, por ejemplo: la reducción de la expresión de Ckmt2 en células adiposas disminuye los

niveles de fosfocreatina <sup>225</sup>; el silenciamiento de los receptores  $\beta$ 3-adrenérgicos en células adiposas beige/marrones disminuye la expresión tanto de Ckmt1 como de Ckmt2 <sup>226</sup>. Además, los ácidos biliares aumentan la función mitocondrial en los adipocitos blancos, estimulando un programa termogénico que depende parcialmente de la expresión de CKMT2 <sup>227</sup>. En iWAT, el SANA estimuló tanto Ckmt1 como Ckm durante la DIO. Sin embargo, en BAT, Ckmt2 fue la principal quinasa regulada al alza por SANA. Aunque no hay evidencia que respalde que Ckm participe en la termogénesis dependiente de creatina, la respuesta diferencial entre tratamientos y tejidos sugiere que puede haber cierto nivel de redundancia entre las quinasas contribuyentes.

En resumen, el estudio actual presenta evidencia convincente de que el SANA, un derivado nitroalqueno del salicilato, es un fármaco potente para el tratamiento de la obesidad inducida por la dieta, con un mecanismo de acción principal que es la activación del gasto energético y la termogénesis dependiente de creatina en el tejido adiposo. Este informe proporciona la primera evidencia de que potenciar el metabolismo de la creatina en el tejido adiposo es una vía eficaz para prevenir y tratar la DIO. Estas observaciones reavivan la posibilidad de que los derivados químicos de los salicilatos puedan ser medicamentos adecuados para el tratamiento de la obesidad y las anomalías metabólicas asociadas.

### **3.7. Materiales y métodos**

#### **3.7.1. Reactivos**

A menos que se especifique un proveedor diferente, todos los reactivos y productos químicos se adquirieron de Sigma.

#### **3.7.2. Animales**

Todos los ratones utilizados en este estudio se mantuvieron en el bioterio convencional de la Unidad de Animales transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo. Los protocolos experimentales 003-19 y 006-19 fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso Animal (CEUA) del Institut Pasteur de Montevideo. Los estudios se realizaron de acuerdo con los métodos aprobados en los protocolos y siguiendo todas las directrices y normativas legales. Se utilizaron ratones macho C57BL6/J. A menos que se especifique otra condición, los animales tenían entre 10 y 12 semanas de edad y recibieron dieta estándar. Todos los animales recibieron agua ad libitum.

#### **3.7.3. Síntesis del ácido 5-(2-nitroetenil)salicílico (SANA)**

A una disolución de ácido 5-formilsalicílico (19,2 g, 116 mmol) en etanol (176 mL), se añadieron nitrometano (24 mL, 443 mmol) y acetato de amonio (22,3 g, 144 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 2 h, observándose un precipitado naranja. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se acidificó con HCl concentrado ( $\approx$ 30 mL), obteniéndose un sólido amarillo. El sólido se filtró al vacío, se lavó exhaustivamente con agua para eliminar el cloruro de amonio formado y se recristalizó en agua:etanol (1:1) para dar cristales amarillos. Punto de fusión 230 - 232 °C. Rendimiento: 93%.

#### **3.7.4. Análisis por espectrometría de masa de alta resolución (HRMS) del SANA**

El análisis HRMS (del inglés: high resolution mass spectrometry) del SANA se obtuvo en un espectrómetro de masa Q Exactive Plus (Thermo Scientific, EE. UU.) mediante inyección directa del compuesto a una concentración de 10 pmol en acetonitrilo (ACN) 30% (J.T. Baker, Avantor, EE. UU.) y un flujo de 10  $\mu$ L/min. Se utilizó una fuente Ion Max API con una sonda HESI-II. El

espectrómetro de masa fue operado en modo negativo, el voltaje de espray iónico se fijó en 3,5 kV y la temperatura del capilar a 250 °C.

### **3.7.5. Modelo de obesidad inducida por dieta (DIO)**

Los ratones fueron alimentados con HFD (42% de grasa y 0,25% de colesterol, AIN93G, LabDiet, EE. UU.) comenzando a las 12 semanas de edad y durante un período de 8 y 20 semanas (prevención y reversión de la obesidad, respectivamente). El SANA se administró por vía oral mezclándolo con la dieta en una dosis de 400 mg/kg/día. El peso, el porcentaje del peso inicial y la ingesta de cada animal fue registrado una vez por semana. Para el cálculo de la ingesta acumulativa, el consumo de comida se midió durante un período de 24 horas y se expresó como calorías totales por ratón, independientemente del peso corporal. Al finalizar el período de experimentación los animales fueron anestesiados y se extrajo sangre mediante punción cardíaca (que posteriormente se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos a 4 ° C para obtener el plasma) y tejido adiposo subcutáneo. Las muestras se conservaron utilizando nitrógeno líquido (y posteriormente a -80 °C) o se aislaron mitocondrias a partir de tejido adiposo fresco.

### **3.7.6. Medición de glucosa en plasma**

Los ratones se mantuvieron en ayuno durante 16 h antes de la medición de la glucosa basal. Las concentraciones de glucosa en plasma se midieron a partir de sangre obtenida de la cola usando un glucómetro portátil (Accu-Chek, Roche).

### **3.7.7. Medición de insulina y ácidos grasos no esterificados (NEFA)**

La cuantificación de insulina (Mouse INSULIN ELISA Kit, Thermo Sc.) y de ácidos grasos no esterificados (NEFA-HR, Waco) en plasma se realizó según las instrucciones de los proveedores de ambas pruebas comerciales.

### **3.7.8. Enriquecimiento de mitocondrias iWAT**

Para cada réplica biológica, los tejidos adiposos blancos inguinales subcutáneos de 2 o 3 animales (según el peso corporal) se diseccionaron, juntaron y lavaron en solución tampón de homogeneización (STH) (sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 0,1 mM, pH 7.2) mantenido

en hielo. El procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. Los tejidos se disgregaron con tijera y se homogeneizaron en STH (5 ml/g) frío usando un mortero de teflón Potter-Elvehjem motorizado. Los homogenados se filtraron a través de una gasa limpia para eliminar las partículas de grasa y se centrifugaron a 1000 g durante 5 min para sedimentar los núcleos y los restos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó a 10000 g durante 15 min para sedimentar las mitocondrias crudas. El sedimento mitocondrial se lavó tres veces con 2 mL de STH (sin BSA) mediante centrifugación a 10000 g durante 10 min y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

### **3.7.9. Extracción de proteínas**

El tejido adiposo total y los sedimentos mitocondriales se homogeneizaron en una solución tampón RIPA (Tris 25 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, NP40 1%, desoxicolato de sodio 1%, dodecilsulfato de sodio (SDS) 0.1%) que contenía fluoruro de sodio 5 mM, nicotinamida 5 mM, tricostatina A 1 uM,  $\beta$ -glicerofosfato 50 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete™ EDTA-free, Roche) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La homogeneización de la muestra se realizó en frío utilizando un homogeneizador Bullet Blender® (Next Advance) o mediante ultrasonificación, respectivamente. Los homogeneizados se centrifugaron a 10000 g durante 10 min, 4 °C, y las concentraciones de proteína de los sobrenadantes se midieron mediante el ensayo de Bradford (PanReac AppliChem) usando un estándar de BSA.

### **3.7.10. Análisis proteómico de extractos totales y mitocondriales de tejido adiposo blanco subcutáneo**

#### **3.7.9.1. Preparación de muestras para análisis LC-MS/MS**

Para los análisis proteómicos se utilizaron tres réplicas biológicas por condición. Los extractos proteicos obtenidos de tejido adiposo blanco subcutáneo, o de mitocondrias enriquecidas a partir del mismo, se desnaturalizaron con solución tampón reductor (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10% v/v, 2-mercaptoetanol 2,5%, azul de bromofenol 0,01%) a 95 °C por 5 min. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) a 30 mA en un gel al 12,5%. Posteriormente se fijaron al gel con etanol 50%/ácido acético 12% en agua, se tiñeron con azul de Coomassie R-250 y se cuantificaron por densitometría

utilizando un kit de calibración de proteínas de bajo peso molecular (Amersham™, GE Healthcare, EE. UU.). Para el análisis por espectrometría de masa, se corrieron cantidades iguales de cada muestra hasta 1 cm en el gel separador de SDS-PAGE, se fijaron y se tiñeron como se mencionó anteriormente.

La digestión de proteínas en gel y la extracción de péptidos se realizaron como se describió anteriormente<sup>228</sup> con mínimas variaciones. Se cortaron las bandas de 1 cm teñidas con azul de Coomassie de los geles 1-D SDS-PAGE y se destiñeron a 30 °C utilizando ACN 50% (J.T. Baker, Avantor, EE. UU.) en bicarbonato de amonio (AMBIC) 100 mM, pH 8.0. La reducción de los puentes disulfuro de proteínas se realizó con ditioneitol (DTT) 10 mM durante 1 h a 56 °C con agitación. Los residuos de cisteína se alquilaron con yodoacetamida (IAA) 55 mM durante 45 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Las bandas de gel se deshidrataron con ACN y se rehidrataron en una solución AMBIC 50 mM con tripsina de grado de secuenciación (Promega, Fitchburg, WI, EE.UU.) en una relación proteasa:proteína de 1:50 (m:m). La digestión en gel se llevó a cabo durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos tripticos se extrajeron del gel mediante la adición de ACN 60%/ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% en dos etapas de 1 h de incubación a 30 °C. Las muestras se secaron al vacío en un concentrador CentriVap (Labcono, Kansas City, MO, EE.UU.) y los péptidos se desalaron utilizando ZipTips C18 (Merck Millipore, Tullagreen, Carrigwohill, Co. Cork, IRL). Los péptidos eluidos se disolvieron con ácido fórmico (FA) 0,1% en agua de calidad LC/MS (LiChrosolv®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

### 3.7.9.2. Análisis LC-MS/MS

El análisis LC-MS/MS se realizó utilizando un sistema de nanoHPLC UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masa Q Exactive Plus con una fuente Easy-Spray (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Las muestras se cargaron en una precolumna (Acclaim PepMap™ 100, C18, 75 µm X 2 cm, tamaño de partícula de 3 µm, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) y se separaron con una columna analítica Easy-Spray (PepMap™ RSLC, C18, 75 µm X 50 cm, tamaño de partícula de 2 µm, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) a 40 °C usando un sistema de dos disolventes: (A) FA 0.1% en agua y (B) FA 0.1% en ACN (LiChrosolv®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La columna se equilibró a 1% de B seguido de una elución en gradiente realizada de la siguiente manera: 1% a 50% de B durante 180 min, 50% a 99% de B

durante 15 min, 99% de B durante 10 min y 1% de A durante 9 min, a un flujo constante de 200 nL/min. El espectrómetro de masa operó en modo positivo. El voltaje de spray iónico se fijó en 1,7 kV; la temperatura del capilar a 250 °C y el nivel de RF de la lente S a 50. Para la adquisición se usó un método dependiente de datos "top-12". Los espectros MS se adquirieron en un rango de 200-2000 m/z con una resolución de 70000 a 200 m/z, un valor objetivo de AGC (del inglés: automatic gain control) de 1E6 y un tiempo máximo de inyección iónica de 100 ms. La fragmentación de los precursores se produjo en una celda HCD (del inglés: higher-energy C-trap dissociation) con energía de colisión normalizada en un modo escalonado (NCE 25, 30 y 35). Los espectros MS/MS se adquirieron con una resolución de 17500 a 200 m/z, un valor objetivo de AGC de 1E4 y un tiempo máximo de inyección iónica de 50 ms. Se excluyeron los iones precursores con estados de carga sin asignar y con carga 1+ o mayor a 4+. Se estableció un tiempo de exclusión dinámica de 30 s.

### 3.7.9.3. Análisis de datos de espectrometría de masa

El software PatternLab for Proteomics 4.0 (PatternLab) <sup>229</sup> se utilizó para realizar el emparejamiento péptido-espectro (PSM, del inglés: peptide-spectrum match) y el análisis cuantitativo libre de marcaje. La base de datos para la búsqueda se generó con el PatternLab usando el proteoma de *Mus musculus* descargado de UniProt (15/06/2020, 55471 secuencias) y los contaminantes más comunes en experimentos de proteómica. Además, se incluyeron los inversos de todas las secuencias como señuelos para el cálculo del FDR. Para la identificación de los péptidos la tolerancia de m/z del precursor se estableció inicialmente en 40 ppm y la oxidación de metionina y la carbamidometilación de cisteína se definieron como modificaciones variable y fija, respectivamente. Se permitió un máximo de 2 cortes salteados y 2 modificaciones variables por péptido. Los resultados de la búsqueda fueron filtrados por el algoritmo Search Engine Processor (SEPro) de PatternLab con un valor de FDR  $\leq$  1% a nivel de proteína y una tolerancia de 10 ppm para los iones precursores. El módulo estadístico de diagrama de Venn de PatternLab se utilizó para determinar las proteínas detectadas de forma única en cada condición biológica utilizando un valor de  $p < 0.05$  <sup>230</sup>. El módulo TFold de PatternLab se utilizó para cuantificar relativamente las proteínas presentes en ambas condiciones biológicas mediante un método de cuantificación libre de marcaje basado en el conteo de espectros. Las proteínas presentes en al menos 4 réplicas biológicas de las 6 totales se consideraron para el análisis TFold. Este módulo utiliza el estimador

teórico de Benjamini-Hochberg para manejar múltiples pruebas de t y maximiza el número de identificaciones que satisfacen un límite de tasa de cambio variable de acuerdo con los valores p ajustado ( $q_{BH} < 0.05$ ). Además, es capaz de restringir proteínas diferenciales falsas principalmente debido a su baja abundancia<sup>231</sup>. Las listas de proteínas sobrerrepresentadas estadísticamente en la condición HFD+SANA, obtenidas con los módulos diagrama de Venn y TFold de Patternlab, fueron sometidas a análisis de enriquecimiento de procesos biológicos. El proteoma total de *Mus musculus* o el proteoma mitocondrial obtenido en nuestro experimento se utilizaron como proteomas de referencia para el análisis de sobrerrepresentación de los conjuntos de proteínas totales o mitocondriales, respectivamente; utilizando la herramienta web de análisis de enriquecimiento funcional WebGestalt<sup>175</sup>. Los datos de proteómica por espectrometría de masa se depositaron en el repositorio ProteomeXchange Consortium, PRIDE<sup>232</sup> con el identificador PXD030485 (para acceso de revisor: nombre de usuario: reviewer\_pxd030485@ebi.ac.uk, contraseña: tNnBLEHe).

### **3.7.11. Determinación de la abundancia de proteínas mitocondriales por espectrometría de masa**

El valor del factor de abundancia espectral normalizado (NSAF) fue obtenido de la información cuantitativa analizada con el software PatternLab. El cálculo se basa en la división de los recuentos espectrales (SC) asignados a cada proteína por su longitud (L) en número de residuos y posteriormente dividiéndolo por la suma de los SC/L del total de las proteínas identificadas en una mezcla compleja. El NSAF de los marcadores de localización celular TOMM40, COX4I1, MDH2 y GAPDH se comparó entre las condiciones HFD y HFD+SANA del proteoma mitocondrial de iWAT y con respecto a los extractos totales del mismo tejido.

### **3.7.12. Análisis por western blot (WB) en mitocondrias aisladas de iWAT**

La lisis de los tejidos (50–100 mg), el enriquecimiento de mitocondrias y la cuantificación de las proteínas se realizaron como se indica más arriba en los acápites 3.7.8 y 3.7.9. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y posteriormente transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en solución tampón TBS-T (Tris 5 mM pH 8.0, NaCl 15 mM, Tween 20 0.2%) e incubadas toda la noche a

4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-CKMT1 (Invitrogen, PA6-108347), anti-CKMT2 (Invitrogen, PA6-118822), anti-UCP1 (Invitrogen, PA24894) y anti-ATP5A (Abcam, ab14748). Por último, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios conjugados a la peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés: horseradish peroxidase) (Merck, A0545, A9044 y Abcam, ab6747) y las bandas fueron detectadas usando quimioluminiscencia. La densitometría de las bandas fue realizada usando el software Image J v1.51h.

### 3.7.13. Aislamiento de ARN y Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa Cuantitativa en Tiempo Real (qPCR)

El ARN total se aisló de células o tejidos utilizando TRIzol (Invitrogen) y el kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción de 1 µg de ARN se realizó utilizando la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen) y 20 ng del ADNc resultante se analizaron mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa cuantitativa en tiempo real (qPCR) usando el kit KAPA SYBR Fast Universal (Kapa Biosystems). Los niveles de expresión relativos de ARNm se calcularon utilizando el método de  $C_T$  comparativo<sup>233,234</sup> y normalizado contra la expresión del ARNm de  $\beta$ -actina. Todos los cebadores fueron sintetizados por Integrated DNA Technology (IDT); la lista completa se puede encontrar en la Tabla 9.

Tabla 9. Lista de cebadores murinos utilizados en los análisis de expresión génica mediante qPCR.

Referencia del gen	Nombre del gen	Cebador directo (5'to 3')	Cebador inverso (5'to 3')
Actb	Actb	AGCCATGTACGTAGCCATCC	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA
Ckm	Ckm	TTCTGTITGACAAGCCCGT	CTCGTTCACCCACACAAGGA
Ckb	Ckb	TGATGAGCACAAGACCGACC	CAGACAGGTCGCCATCTAGG
Ckmt1	Ckmt1	TGAGGAGACCTATGAGGTATTTGC	TCATCAAAGTAGCCAGAACGGA
Ckmt2	Ckmt2	GCATGGTGGCTGGTGATGAG	AAACTGCCCCTGAGTAATCTTG
Alpl	Alpl/Tnap	GCACCTGCCTTACCAACTCT	GTGGAGACGCCATAACCATC
Ant1	Slc25a4	CTCTGTCCAGGGCATCATCA	TTCCTCCAGCAGTCAAGTGTC
Ant2	Slc25a5	TCAACATGACAGATGCCGCT	CACGCAGTCTATGATGCCCT
Gatm	Gatm	GACCTGGTCTTGTGCTCTCC	GGGATGACTGGTGTGGAGG
Gamt	Gamt	GCAGCCACATAAGGTTGTTC	CTCTTCAGACAGCGGGTACG

Oat	Oat	CCATTGCGGCTCTTGAGGTTT	AGGCACACCTTCCAAGCATC
Prodh	Prodh	ATGCTATGTACCACAGGTGCC	CAGCAGGATGCAGGCCTATC
Crt	Slc6a8	TGCATATCTCCAAGGTGGCAG	CTACAAACTGGCTGTCCAGA
Ucp1	Ucp1	CTGCCAGGACAGTACCCAAG	TCAGCTGTTCAAAGCACACA
Cidea	Cidea	ATCACAACCTGGCCTGGTTACG	TACTACCCGGTGTCCATTTCT
Prdm16	Prdm16	CAGCACGGTGAAGCCATTC	GCGTGCATCCGCTTGTG
Pgc1a	Ppargc1a	GGAGCTCCAAGACTCTAGACA	CCAAAGTCTCTCTCAGGTAGC
Phospho1	Phospho1	AAGCACATCATCCACAGTCCCTC	TTGGTCTCCAGCTGTCATCCAG
Chdh	Chdh	GGACGCCAGTTAAAGAGCAG	TCTAAGGACCTGCCACATGC
Aldh	Aldh7a1	CTTGCCTTCTGAAAGACCCG	GACGTAGTCGGTGCTCCTTT
Bhmt1	Bhmt	GAAGGCCAAGAAGGGGATCT	GCTCTGAGGAACTCCCGATG
Bhmt2	Bhmt2	CTCGAGCCAAGAAGGGCATC	CAGCTCCCGCTCTCAAGAAT

### 3.7.14. Análisis de metabolitos por LC-MS/MS

Se homogeneizaron muestras de tejido adiposo subcutáneo (100 mg) y se extrajeron los metabolitos con una mezcla de agua, metanol y cloroformo en volúmenes iguales (volumen total 1 mL) en hielo. Se separó la fase acuosa y se secó en un SpeedVac. Para el análisis por LC-MS/MS, los extractos secos de tejido se reconstituyeron en 200  $\mu$ L de acetato de amonio 5 mM en agua 95%/acetonitrilo 5%/ácido acético 0.5% y se pasaron a través de un filtro de fluoruro de polivinilideno de 0.45  $\mu$ m. Los extractos fueron analizados en un UHPLC Shimadzu LC Nexera X2 acoplado a un espectrómetro de masa QTRAP 5500 (AB Sciex). La separación cromatográfica se realizó con una columna analítica ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1 $\times$ 50 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters). Los picos MRM extraídos fueron integrados utilizando el software MultiQuant 3.0.2 (AB Sciex).

### 3.7.15. Imágenes térmicas

Las imágenes térmicas de ratones despiertos y no anestesiados fueron adquiridas con una cámara termográfica FLIR E6. Las regiones de interés de las imágenes térmicas se seleccionaron utilizando el software FLIR Tools.

### 3.7.16. Efecto del antagonista de la creatina $\beta$ -GPA en la respuesta al frío

Ratones macho C57BL/6J previamente aclimatados a 22 °C fueron tratados o no (control) con SANA (20 mg/kg/día, SC), en combinación o no con ácido beta-guanidinopropiónico ( $\beta$ -GPA, 0.4

g/kg en PBS pH 7.5, IP) durante 5 días y alimentados con dieta normal. Posteriormente, los ratones se alojaron individualmente a 4 °C entre 1 y 6 h, con libre acceso a comida y agua. La temperatura corporal se midió con una sonda rectal para ratones (ThermoWorks).

### **3.7.17. Modelo murino de respuesta al frío al frío**

Los animales se aclimataron a 18 °C durante 24 h y posteriormente se pasaron al frío (4 °C) durante las siguientes 48 h. Luego del sacrificio se tomaron muestras de iWAT y BAT y se procesaron para el análisis de los niveles de ARNm como se indica en 3.7.13.

### **3.7.18. Análisis del proteoma mitocondrial de hígado en un modelo murino de respuesta al frío**

Animales de entre 16 y 20 semanas se sometieron a un modelo de respuesta al frío como se indica en 3.7.17. Luego del sacrificio de los animales se conservaron muestras de hígado. Se utilizaron 4 réplicas biológicas de cada condición. Cada réplica consistió en 200 mg de tejido (proveniente de 2 animales). Los tejidos se homogeneizaron en una solución tampón (sacarosa 250 mM, HEPES 5 mM, EGTA 2 mM) en una proporción de 4 mL/g de tejido, usando homogeneizador de vidrio y teflón. Los homogenizados se filtraron con gaza para eliminar la grasa y se centrifugaron a 8500 g por 10 min a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 5 mL de la misma solución tampón y se centrifugó a 800 g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante lavó con 2 pasos sucesivos de centrifugación a 8500 g por 10 min a 4 °C y el sedimento final se conservó a – 80 °C.

La extracción y cuantificación de proteínas se realizó como se indica en el acápite 3.7.9. La reducción, alquilación y digestión trípica de proteínas se realizó utilizando el protocolo FASP<sup>235</sup> con pasivación previa de los filtros en Tween 20 al 5%<sup>236</sup>. Los péptidos trípticos se analizaron en un nano-HPLC UltiMate 3000 (Thermo Sc.) acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap Exploris 240 (Thermo Sc.) a través de una fuente Easy-Spray (Thermo Sc.). Las muestras se cargaron en una pre-columna Acclaim PepMap<sup>TM</sup> 100 C18 (75 µm x 2 cm, tamaño de partícula de 3 µm, Thermo Sc.) y se separaron en una columna analítica PepMap<sup>TM</sup> RSLC C18 (75 µm x 50 cm, tamaño de partícula de 2 µm, 100 Å, Thermo Sc.) a 40 °C utilizando un sistema de dos solventes: (A) 0,1% FA en agua, (B) 0,1% de FA en ACN. La separación se logró a través de un gradiente de elución de la siguiente manera: 1% a 35% B durante 150 min y 35% a 99% B durante

15 min, a 200 nL/min. El espectrómetro de masas se configuró en modo positivo con un método de adquisición dependiente de datos top-20. El voltaje spray de iones y la temperatura capilar se establecieron en 2.0 kV y 250 °C, respectivamente. Los espectros MS se adquirieron entre 200 y 2000 m/z con una resolución de 90000 a 200 m/z. La fragmentación de precursores se produjo en una celda HCD y los espectros MS/MS se adquirieron con una resolución de 22500 a 200 m/z. El valor objetivo de AGC y el tiempo máximo de inyección de iones se establecieron en Estándar y Automático, respectivamente, para escaneos completos y de fragmentación. Los iones precursores con estados de carga no asignados, simples y superiores a cinco se excluyeron para la fragmentación. La energía de colisión normalizada se utilizó en pasos de NCE 25, 30 y 35. El tiempo de exclusión dinámica se estableció en 10 s.

El análisis de los datos se realizó con el software PatternLab V <sup>237</sup> usando los mismos parámetros de búsqueda descritos para los proteomas mitocondriales y totales de tejido adiposo. La base de datos inversa se generó a partir de un proteoma de *Mus musculus* (descargado de UniProt, 06/11/2023, SwissProt, 17173 secuencias) y los contaminantes más comunes en los experimentos de proteómica. Se utilizó el módulo estadístico diagrama de Venn de PatternLab para determinar las proteínas detectadas de forma única en cada condición biológica utilizando un valor de  $p < 0.05$ . El módulo Pairwise comparison de PatternLab se utilizó para cuantificar relativamente las proteínas presentes en ambas condiciones biológicas mediante un método de cuantificación libre de marcaje basado en los valores de XIC a nivel de péptidos ( $p < 0.05$ , tasa de cambio: 2) <sup>237</sup>.

### 3.7.19. Síntesis de SANA unido a biotina (bSANA)

(a) (E)-N-succinimidil-2-hidroxi-5-(2-nitrovinil)benzoato (1). SANA (0.2 g, 0.96 mmol), N-hidroxisuccinimida (0.13 g, 1.15 mmol) y DMAP (0.012 g, 0.096 mmol), se disolvieron en tetrahidrofurano (THF) seco (3 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota una disolución de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0.21 g, 1.0 mmol) en THF seco (2 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la forma sólida (subproducto diciclohexilurea) se filtró y se lavó con acetato de etilo (EtOAc). Los filtrados combinados se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en columna (SiO<sub>2</sub>, hexano:EtOAc, 1:1) dando el producto deseado (1) como sólido amarillo (99%).

(b) (E)-N-(2-Boc-aminoetil)-2-hidroxi-5-(2-nitrovinil)benzamida (2). Se disolvieron 0.29 g (0.96 mmol) del compuesto 1 y N-Boc-etilendiamina (0.17 g, 1.06 mmol) en THF seco (8 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en columna (SiO<sub>2</sub>, hexano:EtOAc, 6:4) dando el producto deseado (2) como un aceite amarillo (92%).

(c) éster de biotinil-N-hidroxisuccinimida (3). La biotina (0.05 g, 0.20 mmol) y la N-hidroxisuccinimida (0.024 g, 0.21 mmol) se disolvieron en N,N-dimetilformamida (DMF) seca (1.5 mL) bajo atmósfera de nitrógeno a 60°C. Tras añadir DCC (0.044 g, 0.21 mmol), la solución se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, el producto obtenido se utilizó en el siguiente paso de la reacción sin purificación adicional.

(d) SANA unido a biotina (bSANA). El compuesto 2 (0.07 g, 0.20 mmol) se disolvió en diclorometano (DCM) (0.5 mL) y se añadió ácido trifluoroacético (0.1 mL, 20%). La mezcla se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. Después se evaporó el disolvente a presión reducida haciendo lavados sucesivos con hexano. El residuo se disolvió en DMF (1 mL) y se añadió trietanolamina (0.061 mL, 0.044). La mezcla se agitó durante 5 minutos y se añadió el crudo 3. La nueva mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente, la forma sólida (subproducto dicitclohexilurea) se filtró y se lavó con DCM. Los filtrados combinados se lavaron con agua. La capa orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en columna (SiO<sub>2</sub>, DCM:metanol, 9:1), para dar el producto deseado (bSANA) como sólido amarillo (rendimiento global del 70%).

### 3.7.20. Análisis de las propiedades electrofílicas del SANA y SANA-biotinilado

El SANA (10 μM) o el SANA biotinilado (10 μM) fueron disueltos en solución tampón fosfato 20 mM, pH 7.4 y se incubaron con β-mercaptoetanol (BME) o glutatión (GSH) 100 μM. La reacción se monitoreó mediante espectrofotometría UV-Vis haciendo lecturas continuas de absorbancia (200-600 nm) cada 1 min durante los primeros 10 minutos de la reacción. Se utilizó

un espectrofotómetro Varian Cary 50 bio UV-VIS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.).

### **3.7.21. Estudio por espectrometría de masa de la reactividad de SANA y SANA biotiniliado con catalasa bovina**

Para el análisis se preparó una mezcla de la proteína catalasa de *Bos taurus* (17-0441B, Pharmacia) a una concentración de 1  $\mu$ M con 10  $\mu$ M de SANA o bSANA (a partir de una solución madre de cada compuesto de 5 mM en dimetilsulfóxido) en una solución tampón AMBIC 50 mM, pH 8.0. La mezcla se incubó en agitación y oscuridad a 25 °C durante 30 min. Posteriormente se adicionaron 0.4  $\mu$ g de tripsina de grado de secuenciación (Promega, Fitchburg, WI, EE.UU.) y se incubó en agitación y oscuridad a 37 °C durante 90 min. Todo el proceso también se realizó para una muestra control a la que no se añadieron los compuestos. Los péptidos trípticos obtenidos de la digestión en solución se concentraron y desalaron utilizando ZipTips C18 (Merck Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork, IRL), luego fueron disueltos con FA 0,1% en agua de calidad LC/MS (LiChrosolv®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las muestras (1  $\mu$ g de péptidos trípticos) fueron analizadas por LC-MS/MS como se indica en el acápite “Análisis LC-MS/MS” pero utilizando el gradiente de separación siguiente: 1% a 50% de B en 90 min, 35% a 99% de B en 20 min, 99% de B durante 10 min y 1% de A durante 15 min. El tiempo de exclusión dinámica fue de 5 s.

La identificación de secuencia y de los sitios de modificación de la catalasa se realizó con el software Patternlab V <sup>237</sup>. La base de datos para la búsqueda se generó usando el proteoma de *Bos taurus* descargado de UniProt (16/06/2022, 37508 secuencias) y los contaminantes más comunes en experimentos de proteómica. Además, se incluyeron los inversos de todas las secuencias como señuelos para el cálculo del FDR. Para la identificación de los péptidos la tolerancia de m/z del precursor se estableció inicialmente en 35 ppm. La oxidación de metionina, la adición de 209.032 Da (adición de SANA) y 477.1679 (adición de bSANA) en cisteínas e histidinas y la pérdida de 1.0078 Da en dos cisteínas por péptido (puente disulfuro) se definieron como modificaciones variables. Se permitió un máximo de 2 cortes salteados y 2 modificaciones variables por péptido. Los resultados de la búsqueda fueron filtrados por el algoritmo Search Engine Processor (SEPro) de PatternLab con un valor de FDR  $\leq$  1% a nivel de proteína y una

tolerancia de 10 ppm para los iones precursores. Los módulos estadístico diagrama de Venn y TFCold se utilizaron para determinar los péptidos significativamente aumentados en cada condición.

### 3.7.22. Identificación de proteínas de unión a SANA

Se lisaron 100 mg de tejido adiposo marrón de ratón en 500  $\mu$ L de tampón NETN (Tris 20 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, NP40 al 0,5%) utilizando un homogeneizador Bullet Blender® (Next Advance). Los homogeneizados se centrifugaron a 10000 g durante 10 min, 4 °C y las concentraciones de proteína del sobrenadante se midieron mediante el ensayo de Bradford (PanReac AppliChem) utilizando un estándar BSA (Capricorn Scientific). Se incubaron cuatro réplicas de 200  $\mu$ L de lisado (100  $\mu$ g de proteína total cada una) con SANA 100  $\mu$ M o SANA biotinilado 100  $\mu$ M a 25 °C durante 30 min en agitación. A cada muestra se añadió una suspensión de resina Strep-Tactin® Sepharose® (IBA Lifesciences) en tampón NETN (50:50 v/v; 30  $\mu$ L de volumen total). La mezcla se incubó en rotación durante 1 h a 4 °C y se centrifugó a 1000 g durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y la resina se lavó 4 veces con 500  $\mu$ L de NETN. Posteriormente la resina se resuspendió en 60  $\mu$ L de tampón de muestra SDS-PAGE reductor (Tris-Cl 62.5 mM, SDS 2%, glicerol 10% v/v, 2-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,01%, pH 6,8) y se calentó a 95 °C durante 5 min. Se cargó una fracción de 20  $\mu$ L de cada muestra en un SDS-PAGE 1D y se digirió con tripsina en gel como se describe en 3.7.9.1.

El análisis por espectrometría de masa se realizó como se describe en 3.7.9.2 excepto por el gradiente de elución: 1% a 35% B durante 60 min y 35% a 99% B durante 15 min; el voltaje de spray iónico se fijó en 2.3 kV.

El análisis de datos de espectrometría de masa se realizó con el software PatternLab V <sup>237</sup> usando los mismos parámetros de búsqueda descritos para los proteomas mitocondriales y totales de tejido adiposo. La base de datos inversa se generó a partir de un proteoma de *Mus musculus* (descargado de UniProt, 04/08/2022) y los contaminantes más comunes en los experimentos de proteómica. Se utilizó el módulo estadístico diagrama de Venn de PatternLab para determinar las proteínas detectadas de forma única en cada condición biológica utilizando un valor de  $p < 0.05$ ; un mínimo de 2 réplicas por condición para ser considerada en el análisis y el modo de rigurosidad Lenient <sup>237</sup>. El módulo TFCold de PatternLab se utilizó para cuantificar relativamente las proteínas presentes

en ambas condiciones biológicas mediante un método de cuantificación libre de marcaje basado en el conteo de espectros. Las proteínas presentes en al menos 6 réplicas biológicas del total de 8 fueron consideradas para el análisis TFold <sup>231</sup>. Las proteínas con un  $qBH < 0.05$  y una tasa de cambio superior a 1.5 se consideraron significativamente sobrerrepresentadas en una condición biológica. Los datos de proteómica por espectrometría de masa se depositaron en repositorio ProteomeXchange Consortium, PRIDE <sup>232</sup> con el identificador PXD040949 (para acceso de revisor: nombre de usuario: reviewer\_pxd040949@ebi.ac.uk, contraseña: DKT6NzQ9).

### 3.7.23. Análisis de la interacción SANA-CKMT2

Para el análisis en lisado de HEK293, las células de dicha línea fueron transfectadas con el plásmido de expresión MR206653 (Origene), que codifica para la CKMT2 murina. Los pellets celulares se obtuvieron de placas de cultivo de 60 mm transfectadas durante 24-48 horas. Posteriormente, las células fueron lisadas utilizando un buffer NETN (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM, Nonidet P-40 0.5%) suplementado con un inhibidor de proteasas (aproximadamente 500  $\mu$ l por pellet). La lisis se facilitó mediante vortex y se incubó en hielo durante 20 min, con agitación cada 5 min para mejorar la eficiencia de lisis.

Posteriormente, los lisados celulares obtenidos fueron tratados durante 1 h a 25°C con 10  $\mu$ M SANA. Como control, se utilizó un lisado sin tratamiento. Tanto los lisados tratados como los controles fueron sometidos a SDS-PAGE no reductora y transferidos a membranas de PVDF para su posterior detección mediante WB.

Para la detección de CKMT2, se utilizó el anticuerpo primario anti-CKMT2 (Invitrogen, PA5-28591), a una dilución de 1:1000 en solución de TBS-T con 2% de BSA, incubado durante la noche a 4 °C. El anticuerpo secundario empleado fue un anti-conejo conjugado HRP (Merck, A0545) a una dilución de 1:10000.

Las proteínas unidas a SANA fueron detectadas utilizando un anticuerpo primario anti-salicilato (MyBiosource, MBS340874) a una dilución de 1:1000, también incubado durante la noche a 4 °C en buffer TBS-T con 2% BSA. El anticuerpo secundario utilizado fue un anti-oveja conjugado a HRP (Abcam, ab6747) a una dilución de 1:10000. La detección de las proteínas en las membranas

fue realizada utilizando el sistema de revelado por quimioluminiscencia en el equipo ImageQuant 800.

El análisis de CKMT2 recombinante purificada fue realizado con la proteína expresada en un sistema de expresión de *Escherichia coli*. Posteriormente se trató durante 1 h a 25 °C con concentraciones crecientes de SANA biotinilado. La enzima fue utilizada a una concentración de 10 uM y se incubó con 2.5 uM, 5 uM, 10 uM, 50 uM y 100 uM de bSANA para evaluar la formación de aductos. Como control se usó la enzima sin tratar. Las muestras tratadas fueron sometidas a SDS-PAGE no reductor y se transfirieron a una membrana de PVDF. Para la detección de los aductos rCKMT2-bSANA, se utilizó estreptavidina-HRP. El revelado fue realizado mediante quimioluminiscencia en el equipo ImageQuant 800.

#### **3.7.24. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA ordinario unidireccional seguido de la prueba post hoc de Bonferroni, ANOVA de dos vías con prueba de comparaciones múltiples de Šídák o Tukey, o prueba t de Student no pareada de dos colas. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Los cálculos se realizaron utilizando GraphPad Prism. Los criterios estadísticos utilizados para el análisis de datos proteómicos se detallan en cada experimento específico.

## 4. Capítulo II: Identificación de miembros del divisoma de *Corynebacteriales* mediante interactómica cuantitativa basada en espectrometría de masa

### 4.1. Resumen

El orden *Corynebacteriales* incluye importantes patógenos humanos y bacterias de importancia industrial como *Mycobacterium tuberculosis* o *Corynebacterium glutamicum*. Estas bacterias tienen paredes celulares multicapa compuestas por el complejo de micolato-arabinogalactano-peptidoglicano y un modo de crecimiento polar, lo que requiere una estrecha coordinación entre el divisoma septal, organizado alrededor de la proteína similar a la tubulina FtsZ, y el elongasoma polar, ensamblado alrededor de la proteína de estructura helicoidal Wag31.

*En esta sección de mi tesis doctoral, utilizando C. glutamicum como modelo, descubrimos dos nuevos miembros del divisoma de Corynebacteriales: una molibdotransferasa reutilizada similar a la gefirina (Glp) y su receptor de membrana (GlpR).* Nuestros resultados muestran cómo la progresión del ciclo celular requiere la interacción entre Glp/GlpR, FtsZ y Wag31, demostrando un diálogo crucial entre las maquinarias del divisoma y el elongasoma que podría ser aprovechado para el descubrimiento de fármacos antimicobacterianos. Además, nuestro trabajo revela que los *Corynebacteriales* han desarrollado una estructura proteica para controlar la división celular y la morfogénesis, similar al sistema gefirina/GlyR que media la señalización sináptica en eucariotas superiores a través de la organización de redes de receptores de membrana y el citoesqueleto de microtúbulos.

*Los resultados de esta sección de mi tesis fueron recientemente publicados (ver artículo adjunto al capítulo). A continuación, y a modo de resumen, presentamos: el problema a resolver, la estrategia proteómica cuantitativa utilizada y una descripción de los principales resultados obtenidos en esta sección.*

## 4.2. Introducción

*Corynebacteriales* es un orden ampliamente distribuido en la naturaleza que incluye corynebacterias, micobacterias, nocardias, rhodococos y otros microorganismos relacionados <sup>238</sup>. Algunas de estas bacterias son patógenos humanos, conocidos por causar enfermedades infecciosas graves (*Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium leprae*) o patologías oportunistas (*Mycobacterium abscessus*, *Corynebacterium jeikeium* o algunas especies de *Nocardia*). Sin embargo, para este grupo de bacterias, el proceso de división celular a nivel molecular es poco comprendido.

Las bacterias crecen y se dividen incorporando nuevo material de pared celular en el sitio de crecimiento y septación, en estrecha coordinación con el estado de replicación del ADN de la célula <sup>239</sup>. La inserción de nuevo material en la pared celular de los bacilos durante la elongación y la división celular está mediado por los complejos multiproteicos elongasoma y divisoma, respectivamente <sup>240</sup>. En la últimas décadas se ha avanzado mucho en la comprensión de cómo se ensamblan estas hiperestructuras, sobre todo en organismos modelo como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* <sup>240-242</sup>. El ensamblaje del divisoma es iniciado y organizado por una proteína bacteriana altamente conservada, el homólogo de la tubulina bacteriana FtsZ, que se polimeriza para formar una estructura dinámica en forma de anillo (anillo Z) y que marca el sitio de la división celular. Este anillo sirve de plataforma para el reclutamiento de proteínas estructurales y accesorias de manera ordenada para formar la maquinaria funcional de división celular y construir una nueva pared celular <sup>242</sup>. Sin embargo, muchos de los componentes del divisoma bien estudiados en *E. coli* o *B. subtilis* están ausentes en los genomas de los *Corynebacteriales* <sup>243</sup>, incluyendo muchas de las proteínas que anclan el anillo a la membrana (a excepción de SepF) y aquellas que regulan positiva o negativamente el ensamblaje del anillo Z <sup>243</sup>. En el caso de SepF, se ha identificado inequívocamente como interactor directo de FtsZ en el dominio C-terminal (FtsZ<sub>CTD</sub>) en *Corynebacterium glutamicum* (*Cglu*) <sup>244</sup>.

Por otro lado, en los bacilos modelo mencionados anteriormente la elongación ocurre lateralmente a lo largo del cuerpo celular y el elongasoma se ensambla alrededor de la proteína de andamiaje similar a la actina MreB. Sin embargo, los *Corynebacteriales* se elongan desde los polos y carecen de homólogos reconocibles para esta proteína. En su lugar, Wag31 es la proteína central para el

ensamblaje del elongosoma polar y para preservar la morfología en forma de bastón <sup>245-247</sup>. Más aún, la mayoría de los integrantes bien caracterizados del elongosoma de los bacilos no se encuentran codificados en los genomas de los *Corynebacteriales*.

***Por tanto, aún se desconocen cuáles son las proteínas que cumplen roles esenciales en el ensamblaje y funcionamiento de la maquinaria de elongación y división celular en Corynebacteriales.***

### **4.3. Objetivo específico del capítulo II**

El objetivo central del trabajo presentado en este capítulo fue identificar piezas faltantes en el divisoma de *Corynebacteriales*. Para ellos nos enfocamos en estudios interactómicos utilizando proteínas conocidas de estos complejos como dianas y *Cglu* como organismo representante de este grupo de bacterias.

#### 4.4. Descripción de los principales resultados

Para descubrir piezas faltantes en el divisoma de *Corynebacteriales*, utilizamos una estrategia interactómica basada en purificación por afinidad y análisis por espectrometría de masa (AP-MS) en *Corynebacterium glutamicum*.

Nuestra búsqueda comenzó usando a la proteína del divisoma SepF como cebo. Para estabilizar las interacciones entre proteínas, los cultivos bacterianos se entrecruzaron con formaldehído. Posteriormente, se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación (co-IP) (Figura 43). Como muestra el esquema de la figura, utilizamos la proteína fluorescente mScarlet en cepas *Cglu* que expresaban SepF-mScarlet o sólo mScarlet. Además, utilizamos anticuerpos anti-SepF tanto en la cepa *Cglu* no transformada como en la cepa SepF-mScarlet.

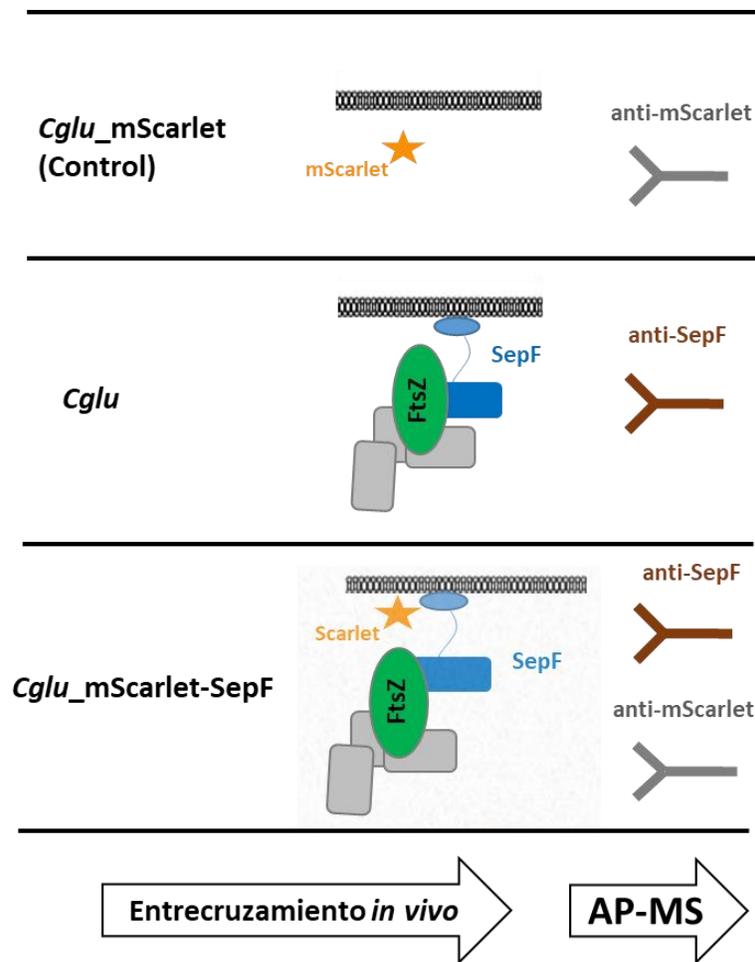


Figura 43. Esquema de la estrategia de purificación por afinidad y análisis por espectrometría de masa (AP-MS) usando anticuerpos anti-mScarlet y anti-SepF en cepas de *Corynebacterium glutamicum* WT (*Cglu*) o que expresan la proteína mScarlet sola (*Cglu\_mScarlet*) o fusionada a SepF (*Cglu\_mScarlet-SepF*). Para estabilizar las interacciones entre las proteínas, previo a la AP-MS, los cultivos son sometidos a entrecruzamiento *in vivo* con formaldehído.

Para identificar interactores de SepF, se compararon las listas de proteínas recuperadas bajo diferentes condiciones: cepa *Cglu* WT utilizando anticuerpos  $\alpha$ -SepF (*Cglu*/ $\alpha$ -SepF), cepa SepF-mScarlet utilizando anticuerpos  $\alpha$ -SepF (SepF-Scarlet/ $\alpha$ -SepF) y cepa SepF-mScarlet utilizando anticuerpos  $\alpha$ -mScarlet (SepF-Scarlet/ $\alpha$ -Scarlet). Como control de la unión inespecífica, se utilizó la cepa mScarlet con anticuerpos  $\alpha$ -mScarlet. Siguiendo esta estrategia reportamos 12 proteínas que representan el interactoma “núcleo” de SepF. Utilizando el factor de enriquecimiento de cada proteína en el interactoma respecto al proteoma pudimos identificar los mejores candidatos para la validación. ***El mayor factor de enriquecimiento correspondió a la proteína molibdotransferasa MoeA (Cgl0883), uno de los dos nuevos componentes del divisoma identificados en este trabajo.*** En *Cglu* esta proteína está anotada como una de las tres enzimas

MoeA (EC 2.10.1.1) que incorporan el metal molibdeno en el precursor de molibdopterina para formar el cofactor Moco, utilizado por las molibdoenzimas para catalizar reacciones redox<sup>248</sup>. Este hallazgo resultó sorprendente dado que MoeA es conocida como una proteína con un rol asociado al metabolismo y no se ha relacionado antes a la división celular.

La participación de esta proteína en la división celular fue posteriormente confirmada mediante análisis por microscopía de las cepas KO y sobreexpresante fusionada a mNeon. La ausencia de MoeA genera células con una morfología típica de alteraciones en la división celular. La expresión de la proteína fusionada al marcador fluorescente mNeon muestra su localización específica en el centro de la célula antes de la formación del septo, colocándola entre los primeros integrantes en llegar al sitio de la división celular. Por otro lado, el interactoma de una mutante de SepF incapaz de unir FtsZ aportó claras evidencias de que MoeA era un interactor directo de Ftsz, lo que fue posteriormente validado mediante experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Buscando profundizar en el rol de esta nueva proteína de división celular llevamos a cabo el análisis de su interactoma. Para eso se siguió la misma estrategia de entrecruzamiento y AP-MS utilizado para sepF, pero con un anticuerpo específico contra MoeA en una cepa *Cglu* WT y usando como control una cepa *Cglu* carente de la proteína. Entre los interactores recuperados se identificaron SepF y FtsZ, como era esperable, pero también una proteína de membrana de función desconocida (Cgl0885) y Wag 31, la proteína central del elongasoma.

***En base a los resultados interactómicos basados en AP-MS, y utilizando estrategias in vitro e in vivo para su posterior validación, comprobamos que Cgl0885 es también un nuevo integrante del divisoma que se localiza específicamente en el septo, y es capaz de interactuar con gran afinidad con MoeA y con Wag31.***

***Este trabajo reveló por primera vez un vínculo directo entre el elongasoma y el divisoma en el medio de la célula. Esta conexión esta mediada por dos nuevos integrantes del divisoma identificados en este trabajo y renombrados como Glp (MoeA) y su receptor de membrana GlpR (Cgl0083).*** Nuestros resultados indican que estas proteínas actuarían como un puente que facilita la transición del divisoma tardío en las células en división al elongasoma polar en las nuevas células hijas. Esta investigación también revela una característica llamativa de este grupo de

bacterias: la enzima Glp, originalmente involucrada en el metabolismo del molibdeno, ha adquirido nuevas funciones en la división celular por interacción con el homólogo bacteriano de la tubulina, FtsZ. Sorprendentemente, este fenómeno hace eco de lo que se encuentra en el sistema nervioso de los eucariotas superiores. En este caso, una enzima MoeA, denominada gefirina, interacciona con la tubulina eucariota y adquiere nuevas funciones en la organización de receptores de glicina, que juegan un papel fundamental en la señalización sináptica. ***Este paralelismo dio lugar al nombre de dos nuevos integrantes del divisoma de los Corynebacteriales: Glp (por gephyring-like protein) y GlpR (por gephyrin-like protein receptor).***

**4.5. Artículo: "Eukaryotic-like gephyrin and cognate membrane receptor coordinate corynebacterial cell division and polar elongation"**



# Eukaryotic-like gephyrin and cognate membrane receptor coordinate corynebacterial cell division and polar elongation

Received: 27 December 2022

Accepted: 11 August 2023

Published online: 7 September 2023

Check for updates

Mariano Martinez<sup>1,6</sup>, Julienne Petit<sup>1,6</sup>, Alejandro Leyva<sup>2,6</sup>, Adrià Sogues<sup>1,5</sup>, Daniela Megrian<sup>1</sup>, Azalia Rodriguez<sup>2</sup>, Quentin Gaday<sup>1</sup>, Mathilde Ben Assaya<sup>1</sup>, Maria Magdalena Portela<sup>2</sup>, Ahmed Haouz<sup>3</sup>, Adrien Ducret<sup>4</sup>, Christophe Grangeasse<sup>4</sup>, Pedro M. Alzari<sup>1</sup>, Rosario Durán<sup>2</sup>✉ & Anne Marie Wehenkel<sup>1</sup>✉

The order *Corynebacteriales* includes major industrial and pathogenic Actinobacteria such as *Corynebacterium glutamicum* or *Mycobacterium tuberculosis*. These bacteria have multi-layered cell walls composed of the mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex and a polar growth mode, thus requiring tight coordination between the septal divisome, organized around the tubulin-like protein FtsZ, and the polar elongasome, assembled around the coiled-coil protein Wag31. Here, using *C. glutamicum*, we report the discovery of two divisome members: a gephyrin-like repurposed molybdotransferase (Glp) and its membrane receptor (GlpR). Our results show how cell cycle progression requires interplay between Glp/GlpR, FtsZ and Wag31, showcasing a crucial crosstalk between the divisome and elongasome machineries that might be targeted for anti-mycobacterial drug discovery. Further, our work reveals that *Corynebacteriales* have evolved a protein scaffold to control cell division and morphogenesis, similar to the gephyrin/GlyR system that mediates synaptic signalling in higher eukaryotes through network organization of membrane receptors and the microtubule cytoskeleton.

Cell division is central to bacterial physiology. Since the seminal work of Francois Jacob in 1968 on the *filamentation temperature-sensitive* (*fts*) genes in *Escherichia coli*, which led to the discovery of the tubulin-like bacterial cytoskeleton protein FtsZ<sup>1</sup>, a few well-studied model systems

set the basis for our current knowledge of cell division at the molecular level. In this process, FtsZ regulates—through GTP-dependent polymerization—the assembly of the cell division machinery (the divisome) at the site of septation and governs the ordered assembly

<sup>1</sup>Structural Microbiology Unit, Institut Pasteur, CNRS UMR 3528, Université Paris Cité, Paris, France. <sup>2</sup>Analytical Biochemistry and Proteomics Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. <sup>3</sup>Plate-forme de cristallographie, C2RT-Institut Pasteur, CNRS UMR 3528, Université Paris Cité, Paris, France. <sup>4</sup>Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, CNRS UMR 5086, Université de Lyon, Lyon, France. <sup>5</sup>Present address: Structural and Molecular Microbiology, VIB-VUB Center for Structural Biology, VIB, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium. <sup>6</sup>These authors contributed equally: Mariano Martinez, Julienne Petit, Alejandro Leyva. ✉e-mail: [duran@pasteur.edu.uy](mailto:duran@pasteur.edu.uy); [anne-marie.wehenkel@pasteur.fr](mailto:anne-marie.wehenkel@pasteur.fr)

of the cell wall biosynthetic machinery<sup>3</sup>. However, while many cell division genes and interaction networks were identified in model organisms, the detailed molecular mechanisms underlying bacterial cell division remain enigmatic, notably because of the diversity of species-specific adaptations<sup>2-4</sup>. In Actinobacteria, a large phylum that includes important human pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*, many of the well-studied components of the divisome from *E. coli* or *Bacillus subtilis* are missing from the genomes<sup>5</sup>. This is especially the case for several FtsZ regulatory proteins, including FtsA, EzrA and ZipA. So far, only the essential membrane anchor SepF has been unequivocally identified as a direct interactor with the C-terminal domain of FtsZ (FtsZ<sub>CTD</sub>)<sup>6,7</sup>. This apparent lack of divisome components in *Corynebacteriales* is particularly intriguing, as these polar-growing bacteria need to coordinate the mid-cell division and elongation machineries at a precise moment of the cell cycle when the septum becomes a new pole<sup>8</sup>. Furthermore, their complex multi-layered cell wall formed by peptidoglycan, arabinogalactan and the mycolate outer membrane<sup>9,10</sup> needs to be fully assembled before cytokinesis<sup>11</sup>.

How the polar elongasome is assembled remains to be elucidated. In laterally elongating bacteria such as *E. coli* or *B. subtilis*, the actin-like MreB scaffold organizes the elongasome<sup>12-14</sup>. In *Corynebacteriales*, MreB is absent from the genomes. Instead, the cytoskeletal DivIVA homologue Wag31, a coiled-coil scaffolding protein with an N-terminal membrane-binding domain, is essential for assembling the polar elongasome and preserving the rod-shaped morphology of *Corynebacteriales*<sup>15-17</sup>. Several proteins have been described as putative Wag31 interactors, mainly from genetic and cellular experiments, such as ParA/B<sup>18,19</sup>, CwsA<sup>20</sup>, RodA<sup>16</sup> or MksG<sup>21</sup>. Wag31 has a subpolar localization and, concomitant with or soon after septum formation, migrates to the cell division site at mid-cell to eventually assemble the daughter cell elongasome at the new cell pole<sup>22</sup>. The old pole grows faster than the new pole, suggesting that full maturation of polar and subpolar assemblies occurs over time and is divisome-independent<sup>23,24</sup>. How division and elongation processes are related in space and time and to what extent Wag31 is directly involved in protein-protein interactions with other components of these machineries is unknown.

Here we report the discovery of two members of the corynebacterial divisome and the dissection of a regulatory cell cycle network that directly links FtsZ to Wag31. We show that this link is mediated by a gephyrin-like protein (Glp) and its membrane receptor (GlpR). Mammalian gephyrin is a moonlighting protein that plays an essential role in synaptic signalling via clustering of the glycine receptor GlyR. Like gephyrin, Glp has undergone evolutionary repurposing in Actinobacteria to bind FtsZ. Our studies show that Glp and GlpR form a tight complex that is part of the early divisome, where Glp and GlpR directly bind FtsZ and Wag31, respectively, placing the Glp-GlpR complex at the centre of the divisome-elongasome transition.

## Results

### Glp is a divisome component in Actinobacteria

To discover missing players in corynebacterial cell division, we used mass-spectrometry-based interactomics, starting with the FtsZ membrane anchor SepF as bait for co-immunoprecipitation (co-IP) studies. *Corynebacterium glutamicum* (*Cglu*) cultures were cross-linked during exponential growth to stabilize interactions that are highly dynamic or that depend on spatial cues such as the inner membrane or the FtsZ polymerization status. We conducted co-IPs using the mScarlet fluorescent protein tag as bait in *Cglu* strains expressing either SepF-mScarlet or mScarlet. In addition, we used anti-SepF antibodies in both the untransformed *Cglu* and the SepF-mScarlet strain. Twenty proteins representing putative direct or indirect SepF interactors were exclusively detected or statistically enriched from *Cglu* when compared with the control, and 22 and 98 proteins were recovered from the *Cglu*\_SepF-mScarlet strain using anti-SepF and anti-mScarlet antibodies

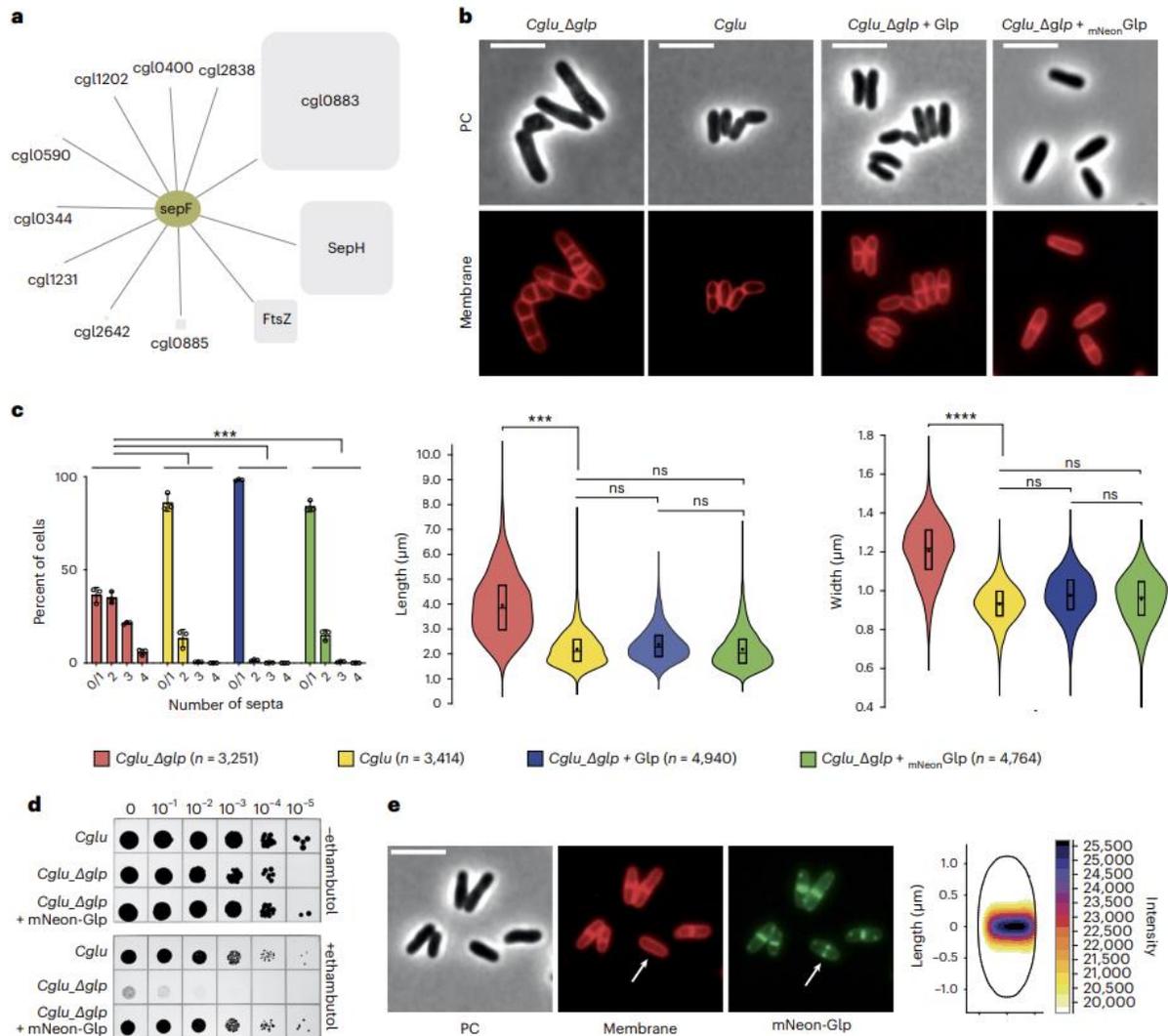
(Extended Data Fig. 1a and Supplementary Table 1a). Common to all IPs, 11 proteins with a quantifiable enrichment factor represent the SepF core interactome (Fig. 1a). As expected, this core interactome includes FtsZ as well as SepH, a recently identified FtsZ interactor in Actinobacteria<sup>25</sup>, but the most enriched protein compared with the *Cglu* proteome is *Cgl0883*. This top interactor appeared consistently in all replicates and was named Glp (explained below). In *Cglu*, Glp is annotated as one of three molybdopterin molybdotransferase MoeA enzymes (EC 2.10.1.1) that incorporate the molybdenum metal into the molybdopterin (MPT) precursor to form the Moco co-factor used by molybdoenzymes to catalyse redox reactions<sup>26</sup>.

A Glp knockout strain (*Cglu\_Δglp*, Extended Data Fig. 1b) was viable but displayed a strong cell division phenotype, with elongated, wider cells and multiple septa (Fig. 1b,c), suggesting a delay in the final steps of cell division. The *Cglu\_Δglp* strain was sensitive to the anti-tuberculosis drug ethambutol (Fig. 1d), a further indication of Glp involvement in cell division, as sublethal concentrations of ethambutol have been used to identify genes required for cell division<sup>27</sup>. Both the multi-septate and ethambutol-sensitive phenotypes were restored to wild type (WT) when Glp or mNeon-Glp were expressed from a plasmid under the control of *P<sub>gnk</sub>* (ref. 28) (Fig. 1b-d). Fluorescently labelled mNeon-Glp localized to mid-cell before septum formation, placing it with the early arrivers to the site of cell division (Fig. 1e). In contrast, the two paralogues of Glp in the *Cglu* genome, MoeA1/*Cgl0212* and MoeA3/*Cgl1196*, displayed a cytoplasmic distribution (Extended Data Fig. 1c,d), suggesting that only Glp evolved specific functions related to the divisome.

### Glp is a gephyrin-like protein that interacts with FtsZ

The eukaryotic gephyrin is described as a moonlighting enzyme originally identified as a glycine receptor-associated protein in neurons<sup>29-31</sup>. It was later found that the E-domain of gephyrin corresponds to MoeA and functions as a Moco biosynthetic enzyme<sup>32,33</sup>. Full-length gephyrin, which has an additional MogA domain, acts as a scaffold through oligomerization<sup>34</sup> and transiently clusters and stabilizes glycine (Gly) and GABAA receptors at the post-synapse of the mammalian brain<sup>33,35</sup>. It is thus tempting to speculate that Glp could also form protein networks in bacteria upon association with cell division proteins. Since there is evidence for a physical linkage between gephyrin, GlyR and microtubules<sup>30</sup>, we tested whether Glp septum localization could be accounted for by a direct interaction with the bacterial tubulin homologue FtsZ. Our interactomics data were consistent with this hypothesis because, when using a SepF mutant unable to bind FtsZ as bait, we saw a significant decrease in Glp binding (Fig. 2a and Supplementary Table 1b), suggesting that the observed SepF-Glp interaction was indirect and occurred via FtsZ. This was further confirmed *in vitro* with purified proteins. We could not detect direct binding between SepF and Glp, but we could measure a direct interaction between Glp and FtsZ with an apparent  $K_d$  of  $4.7 \pm 0.77 \mu\text{M}$  as determined by biolayer interferometry (BLI, Fig. 2b). The interaction is stronger with polymerized FtsZ in the presence of GTP (Extended Data Fig. 2a) and mediated by the conserved FtsZ<sub>CTD</sub> (Extended Data Fig. 2b).

We crystallized Glp alone and in complex with the 10-residue peptide FtsZ<sub>CTD</sub>. The apo-structure was solved at 2.1 Å resolution and the structure of the complex (Fig. 2c,d) was solved at 2.7 Å resolution (Supplementary Table 2). The overall architecture of the Glp dimer and the monomer organization into four structural domains (I-IV) are similar to those described for *E. coli* MoeA<sup>34</sup> or the E-domain of gephyrin<sup>36</sup>. However, a pronounced hinge motion around the segments connecting structural domains I and III leads to an open form of the Glp homodimer compared with the closed form of *E. coli* MoeA (Fig. 2e). This conformational change, also seen in the absence of ligand (Extended Data Fig. 2c), generates the FtsZ-binding site within the central Glp dimer interface, far from the putative Mo-active site (Fig. 2c). The FtsZ<sub>CTD</sub> is well defined in the electron density (Extended Data Fig. 2d)



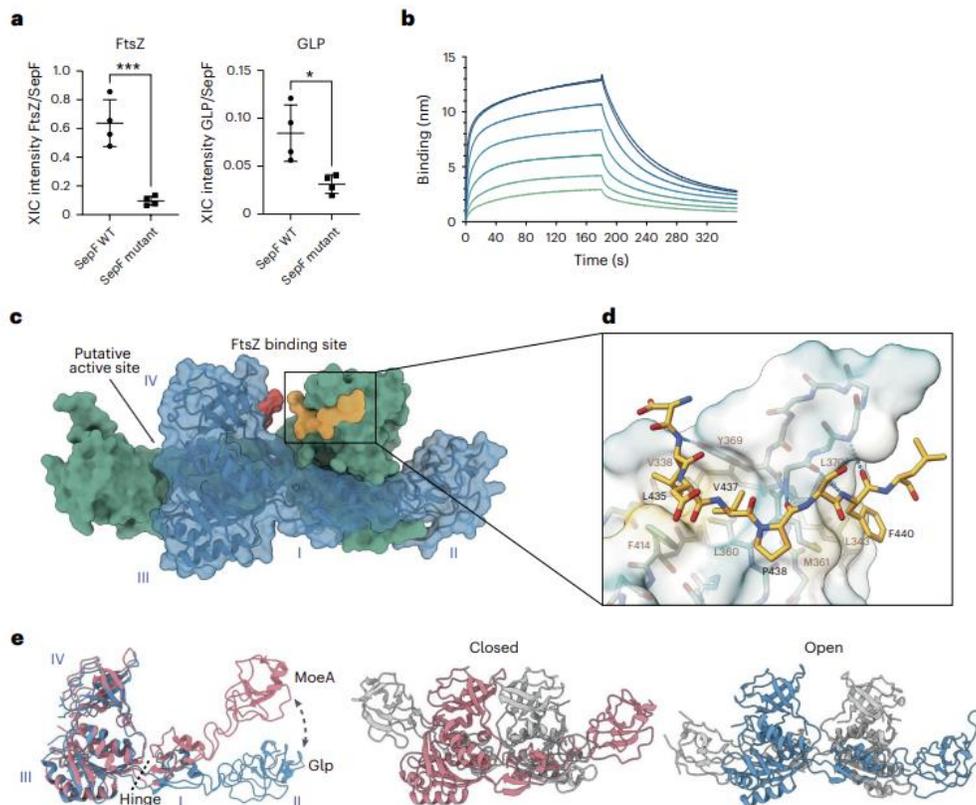
**Fig. 1 | Identification of Glp as a member of the corynebacterial divisome.**

**a**, The core interactome of SepF, including proteins recovered from three independent co-IP experiments using different strains/antibodies: *Cglu*/α-SepF, *Cglu*-SepF-Scarlet/α-SepF and *Cglu*-SepF-Scarlet/α-Scarlet. The square size for each interactor is proportional to its enrichment in the interactome compared to the proteome (Supplementary Table 1), and the lines indicate either direct or indirect interactors. **b**, Glp depletion and complementation. Representative images in phase contrast (PC) and membrane staining for indicated strains. **c**, Left: frequency histogram showing the number of septa per cell for the different strains, calculated from *n* cells imaged (indicated in the figure) from three independent experiments for each strain (*Cglu* Δ*glp*, *n* = 873, 1,538 and 840; *Cglu*, *n* = 718, 1,468 and 1,223; *Cglu* Δ*glp* + *Glp*, *n* = 2,465, 1,169 and 1,297; *Cglu* Δ*glp* + *mNeon-Glp*, *n* = 1,641, 1,311 and 1,801); open circles represent the corresponding data points; mean ± s.d.; Cohen's *d* (see Methods for interpretation of values), from top to bottom: (\*\*\*)*d* = 1.57, *P* = 0), (\*\*\*)*d* = 1.84, *P* = 0), (\*\*\*)*d* = 1.6, *P* = 0). Middle

and right: violin plots showing the distribution of cell length (Cohen's *d*, from top to bottom: (\*\*\*)*d* = 1.76, *P* = 0), (*m*)*d* = 0, *P* = 0.95), (*m*)*d* = 0.29, *P* = 3.78 × 10<sup>-37</sup>), (*m*)*d* = 0.27, *P* = 2.59 × 10<sup>-39</sup>) and cell width (Cohen's *d*: (\*\*\*)*d* = 2.21, *P* = 0), (*m*)*d* = 0.25, *P* = 4.13 × 10<sup>-25</sup>), (*m*)*d* = 0.38, *P* = 9.65 × 10<sup>-74</sup>), (*m*)*d* = 0.08, *P* = 1.74 × 10<sup>-12</sup>); the box indicates the 25th to the 75th percentile, the mean and the median are indicated with a dot and a line in the box, respectively. **d**, Ethambutol sensitivity assay. BHI overnight cultures of *Cglu* and *Cglu* Δ*glp* complemented with the empty plasmid or *mNeon-Glp* were normalized to an OD<sub>600</sub> of 0.5, serially diluted 10-fold and spotted onto BHI agar medium with or without 1 μg ml<sup>-1</sup> ethambutol. **e**, Left: localization of *mNeon-Glp* in *Cglu*. Representative images in PC, membrane staining and *mNeon-Glp* fluorescent signals. The arrow indicates the Glp localization before septum formation. Right: heat map representing the localization pattern of *mNeon-Glp*; 3,879 cells were analysed, from triplicate experiments. Scale bars, 5 μm.

and interacts primarily with a protruding β-hairpin in Glp domain IV (Fig. 2d). Interestingly, the known binding sites of GlyR on mammalian gephyrin and FtsZ<sub>CTD</sub> on Glp both map to structural domain IV, although not to the same binding site (Extended Data Fig. 2e). To validate the Glp–FtsZ interaction observed in the crystal, we produced a deletion

mutant of the entire FtsZ-binding loop between Met361 and Leu370 (GlpΔ<sub>loop</sub>). The purified mutant protein was correctly folded (Extended Data Fig. 2f) but was unable to interact with FtsZ in vitro (Extended Data Fig. 2g). Complementation of the *Cglu* Δ*glp* strain with *mNeon-Glp*<sub>Δloop</sub> failed to restore the septal localization or the wild-type morphology



**Fig. 2 | Glp–FtsZ interaction.** **a**, Comparison of the recovery of FtsZ and Glp in co-IP ( $\alpha$ -Scarlet) of *Cglu*\_SepF-Scarlet and the mutant unable to bind FtsZ (SepF<sub>K125E/F131A</sub>-Scarlet). Each point corresponds to the normalized XIC intensity in each replicate for each condition, calculated as described in Methods;  $n = 4$  biologically independent samples per condition; mean  $\pm$  s.d. Statistical analysis was performed using unpaired two-sided Student's *t*-test. FtsZ fold change (FC) = 6.61 ( $P = 0.0006$ ); Glp FC = 2.70 ( $P = 0.014$ ). See Supplementary Table 1b for corresponding analysis. **b**, BLI sensorgrams of Glp binding to immobilized SUMO-FtsZ. Glp concentrations range from 80  $\mu$ M (dark blue) to 1.25  $\mu$ M (light green) in 2-fold dilutions. **c**, Crystal structure of the Glp homodimer (blue and green) in complex with FtsZ<sub>210</sub> (yellow and red). The Glp monomer is composed of 4 structural domains (labelled I–IV): domain I (residues 20–45 and 146–181), domain II (residues 46–145), domain III (residues 1–19 and 182–331) and domain IV (residues 332–417). The location of the putative active site at the distal dimer interface is indicated. **d**, Detailed view of Glp–FtsZ interactions. The peptide

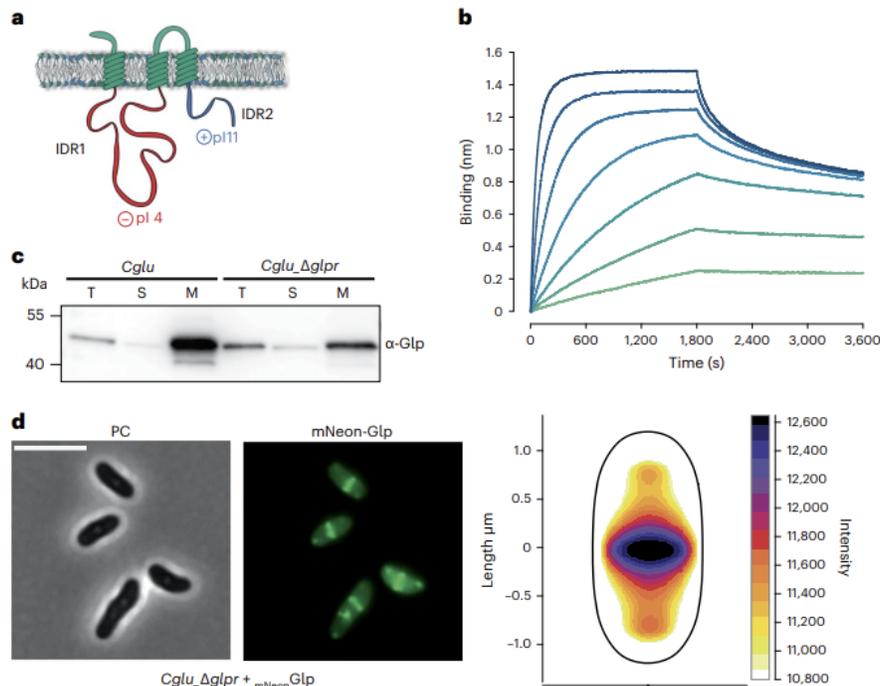
adopts a linear extended conformation, with a central kink promoted by the presence of Pro438. The C-terminal half of the peptide backbone runs roughly parallel to the Glp  $\beta$ -strand 360–363 and is stabilized by three intermolecular hydrogen bonds between main-chain atoms (N<sub>R362</sub>-O<sub>P438</sub>, O<sub>R362</sub>-N<sub>F440</sub> and N<sub>A364</sub>-O<sub>F440</sub>) and by hydrophobic interactions (FtsZ Phe440 with Glp Leu343, Met361 and Leu370). On the N-terminal half, the side chains of FtsZ residues Leu435 and Val437 are anchored in a hydrophobic pocket defined by Glp residues Val338, Leu360, Tyr369 and Phe414. Residues involved in protein–protein interactions are labelled; the molecular surface of Glp shows hydrophobicity (yellow, hydrophobic; green, hydrophilic); intermolecular hydrogen bonds are shown as blue dotted lines. **e**, Left: the superposition of the monomers from Glp (blue) and MoeA from *E. coli* (pink, pdb 1g8l) reveals a pronounced conformational change from a hinge region at the interface between domain I and III. This change leads to a central open (right; Glp, blue) or closed (middle; MoeA, pink) conformation in the respective homodimers.

(Extended Data Fig. 2h, i), stressing the physiological relevance of the crystallographic Glp–FtsZ complex.

### GlpR is a membrane receptor for Glp

To further investigate Glp function, we performed the reverse interactome, this time using Glp as bait (Supplementary Table 1c). Besides recovering FtsZ and SepF as expected, we identified *Cglu0885*, a membrane protein of unknown function (named GlpR hereafter) that was already present among the top SepF interactors (Fig. 1a and Supplementary Table 1a). GlpR is an integral membrane protein with 3 predicted transmembrane (TM) helices and two cytoplasmic, oppositely charged intrinsically disordered regions (IDRs) (Fig. 3a). To determine whether there is a direct interaction between Glp and GlpR, we produced the recombinant proteins and assessed their interaction *in vitro*. The two proteins form a high-affinity complex (apparent  $K_d$

of  $5.5 \pm 0.75$  nM, Fig. 3b), indicating that GlpR might function as a membrane receptor for Glp. Glp<sub>Δloop</sub> was unable to interact with GlpR (Extended Data Fig. 3), suggesting that both FtsZ and GlpR bind to an overlapping region at the centre of the Glp dimer. In cellular fractionation assays, Glp is found in the membrane fraction despite not having any membrane anchoring domains (Fig. 3c). Glp localization to the membrane is reduced, but not abolished, in the *Cglu*\_ΔglpR depletion strain, suggesting the probable contribution of other proteins (for example, FtsZ) to the membrane partitioning and septum localization of Glp. This agrees with the observation that Glp can still localize to the septum in the absence of GlpR (Fig. 3d). Taken together our results show that *Corynebacteriales* have evolved a gephyrin/GlyR-like system involved in cell division, prompting us to name the genes *Cglu0883* as Glp (for gephyrin-like protein) and *Cglu0885* as GlpR (for Glp receptor).



**Fig. 3 | Identification of GlpR as a membrane receptor for Glp.** **a**, Schematic representation of GlpR, with 3 transmembrane segments and the intrinsically disordered regions IDR1 (in red, residues 27–218, theoretical isoelectric points (pI) of 4.05) and IDR2 (in blue, residues 263–340, pI of 10.87). **b**, BLI sensorgrams of Glp binding to immobilized GlpR. Glp concentrations range from 100 nM (dark blue) to 1.56 nM (light green) in 2-fold dilutions. **c**, Cell fractionation and

subcellular localization of Glp. Total (T), soluble (S) and membrane (M) fractions of *Cglu* or *Cglu\_Dglpr* strains were obtained by differential centrifugation and analysed by western blot using an  $\alpha$ -Glp antibody. **d**, Left: localization of mNeon-Glp in *Cglu\_Dglpr*. Representative image in PC and mNeon-Glp fluorescent signal. Right: heat map representing the localization pattern of mNeon-Glp; 5,963 cells were analysed, from triplicate experiments. Scale bars, 5  $\mu$ m.

### GlpR links the mid-cell divisome to the future polar elongasome

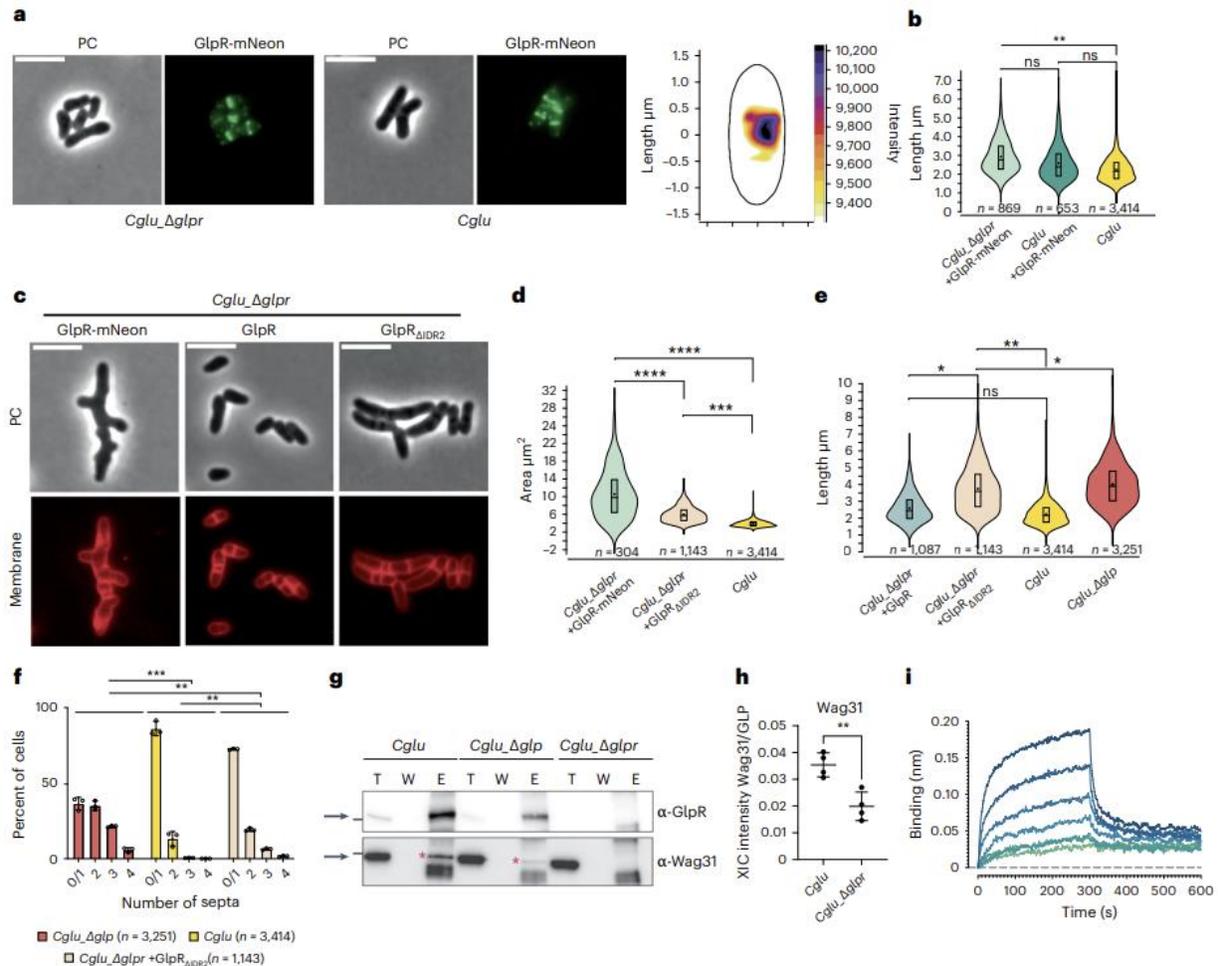
Unlike the *Cglu\_Dglpr* strain, depletion of GlpR in the *Cglu\_Dglpr* strain (Extended Data Fig. 4a) did not show a significant morphological phenotype (Extended Data Fig. 4b) or sensitivity to ethambutol (Extended Data Fig. 4c), possibly due to functional redundancy of yet to be identified divisome members. At low levels of expression, GlpR-mNeon localized to the septum in *Cglu* and *Cglu\_Dglpr* (Fig. 4a), and the cells displayed a mostly normal morphology (Fig. 4b). However, higher levels of GlpR-mNeon expression led to a strong morphotype characterized by the delocalization of the elongasome as revealed by aberrant pole formation along the lateral walls (branching, Fig. 4c). The cell projected surface area was significantly increased in *Cglu\_Dglpr* + GlpR-mNeon when compared with *Cglu* (Fig. 4d). The observed phenotype is likely due to steric hindrance induced by mNeon, as the untagged overexpression of full-length GlpR or GlpR lacking the C-terminal IDR (GlpR<sub>ΔIDR2</sub>) does not lead to branching (Fig. 4c–e). In fact, the lack of the GlpR-IDR2 domain partially phenocopies the *Cglu\_Dglpr* (Fig. 4e,f), suggesting that IDR2 is at least in part responsible for correct functioning of Glp.

In naturally branching actinomycetes such as *Streptomyces*, apical growth is directed by the essential coiled-coil protein DivIVA, which marks the hyphal site<sup>37,38</sup>. Similarly, Wag31, the *Corynebacteriales* homologue of *Streptomyces* DivIVA, specifically marks the sites of growth and its dysregulation results in polar growth from incorrect sites in *M. smegmatis*<sup>39,40</sup>, suggesting that Wag31 delocalization is linked to the branching phenotype of the GlpR-mNeon overexpression strain (Fig. 4c). The hypothesis that the Glp–GlpR complex might exert a regulatory role on early elongasome assembly and localization by

acting on Wag31 was further supported by IP experiments showing complex formation in vivo between Wag31 and GlpR. Pulling on GlpR with an anti-GlpR antibody showed the co-elution of the two proteins in *Cglu* (Fig. 4g). This co-elution was reduced in *Cglu\_Dglpr* and was not seen in *Cglu\_Dglpr*. Moreover, quantitative analysis of the MS experiments revealed that Wag31 was not only systematically enriched in the Glp interactome (Supplementary Table 1c), but that it was also significantly decreased in the Glp interactome in the *Cglu\_Dglpr* background (Fig. 4h). To seek direct biochemical evidence for in vitro interaction, we purified the full-length proteins (Glp, GlpR and Wag31) as well as the N-terminal DivIVA domain of Wag31 (Wag31<sub>1–61</sub>). We were unable to detect any interaction between Glp and Wag31 under the conditions tested. In contrast, GlpR did bind both full-length Wag31 as well as Wag31<sub>1–61</sub>, with apparent  $K_D$  values of  $43.4 \pm 0.16 \mu\text{M}$  and  $14.9 \pm 1.4 \mu\text{M}$ , respectively (Fig. 4i and Extended Data Fig. 5), demonstrating that Wag31–GlpR complex formation is mediated at least in part through the N-terminal DivIVA domain. Taken together, the above data suggest that the FtsZ-associated Glp–GlpR complex regulates early elongasome assembly at mid-cell via direct interaction with Wag31, the scaffolding protein of the elongasome.

### Glp is a repurposed protein that co-evolved with GlpR

Most actinobacterial genomes contain at least two copies of MoeA. In the phylogeny of these homologues, we identified a monophyletic clade that contains *Cglu* Glp (Fig. 5a) and whose sequences are distinguished by two conserved proline-rich (pro-rich) regions (Fig. 5b). These regions correspond to the linkers connecting structural domains I and III, which differ between Glp and *E. coli* MoeA and



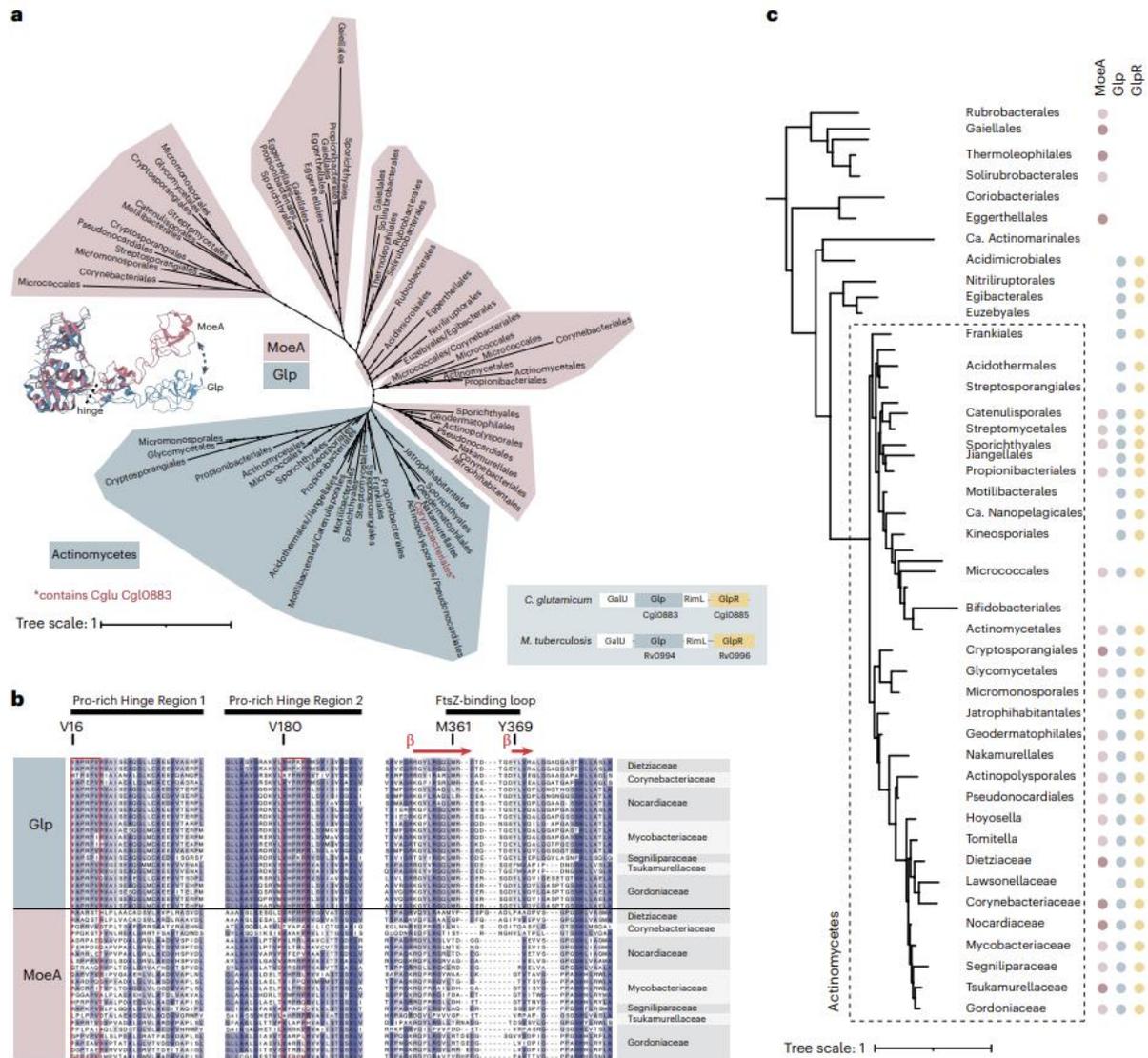
**Fig. 4 | GlpR links the mid-cell divisome with the future polar elongasome via Wag31.** **a**, Left: representative images of GlpR-mNeon expressed in *Cglu* and *Cglu\_Aglpr*. Right: heat map of the localization of GlpR-mNeon in *Cglu* ( $n = 111$ ). **b**, Violin plots (cell length). Cohen's  $d$ , from top to bottom: ( $**d = 0.98$ ,  $P = 2.88 \times 10^{-85}$ ), ( $^{m}d = 0.49$ ,  $P = 6.34 \times 10^{-19}$ ), ( $^{m}d = 0.39$ ,  $P = 2.78 \times 10^{-13}$ ). The expression levels of GlpR-mNeon are shown in Extended Data Fig. 4d. **c**, Representative images of *Cglu\_Aglpr* complementation (overexpression conditions). **d**, Violin plots (cell surface areas). Cohen's  $d$ : ( $****d = 3.95$ ,  $P = 7.34 \times 10^{-63}$ ), ( $****d = 2.35$ ,  $P = 1.01 \times 10^{-46}$ ), ( $***d = 1.4$ ,  $P = 5.37 \times 10^{-319}$ ). The expression levels of GlpR-mNeon are shown in Extended Data Fig. 4e. **e**, Violin plots of cell length. Cohen's  $d$ : ( $**d = 1.17$ ,  $P = 7.22 \times 10^{-255}$ ), ( $*d = 1.70$ ,  $P = 6.20 \times 10^{-338}$ ), ( $*d = 0.61$ ,  $P = 3.07 \times 10^{-60}$ ), ( $^{m}d = 0.49$ ,  $P = 8.12 \times 10^{-34}$ ). Boxes indicate the 25th to the 75th percentile, mean and median indicated with a dot and a line, respectively, in the box. Number of cells used ( $n$ ) below the violin representation corresponds to triplicates. **f**, Histogram of number of septa per

cell, calculated from  $n$  cells from 3 independent experiments (*Cglu\_Aglpr*,  $n = 873$ , 1,538 and 840; *Cglu*,  $n = 718$ , 1,468 and 1,223; *Cglu\_Aglpr* + GlpR $_{\Delta IDR2}$ ,  $n = 451$ , 737 and 841); open circles represent the corresponding data points; mean  $\pm$  s.d.; Cohen's  $d$ , from top to bottom: ( $***d = 1.60$ ,  $P = 0$ ), ( $**d = 0.80$ ,  $P = 3.70 \times 10^{-169}$ ), ( $*d = 0.79$ ,  $P = 8.20 \times 10^{-147}$ ). **g**, Co-IP of GlpR-Wag31 for indicated strains using GlpR as bait. Total (T), wash (W) and elution (E) fractions were analysed by western blot using  $\alpha$ -GlpR and  $\alpha$ -Wag31 antibodies. Arrows indicate GlpR (top) and Wag31 (bottom) and Wag31 is additionally highlighted by a red \*. The black bar corresponds to the 55 kDa molecular weight marker. **h**, Wag31 recovery in co-IPs of Glp from indicated strains. Each point corresponds to the normalized XIC intensity in each biologically independent replicate ( $n = 4$ ) for each condition; mean  $\pm$  s.d. Wag31 FC = 1.78 ( $P = 0.004$ ). Statistical analysis was performed using a two-sided unpaired Student's  $t$ -test. **i**, BLI sensorgrams of Wag31 binding to GlpR. Wag31 concentrations: 150  $\mu$ M (dark blue) to 2.3  $\mu$ M (light green) in 2-fold dilutions.

are responsible for the hinge motion that generates the FtsZ-binding site in the former (Fig. 2e). Together, the two pro-rich regions and the FtsZ-binding loop can discriminate Glp from non-Glp MoeA homologues (Fig. 5b) and therefore represent a molecular signature of the functional repurposing for specific divisome functions. These results demonstrate that Glp has evolved to bind FtsZ and is recruited to the division site by the direct interaction of domain IV with the conserved C-terminal domain of FtsZ. Interestingly, synteny analysis in Actinobacteria revealed that both *glp* and *glpr* genes co-localize in

the genome (Fig. 5a and Extended Data Fig. 6a) and that their genomic context is well conserved. Moreover, when present, genes *glp* and *glpr* co-occur (Fig. 5c and Extended Data Fig. 7), suggesting a common evolutionary history.

The *glp* clade contains sequences mostly restricted to Actinobacteria, the largest class of Actinobacteria that includes the order Corynebacteriales (Fig. 5a), and the topology of the clade resembles that of Actinobacteria species (Fig. 5c). This suggests that *glp* was obtained early during the diversification of Actinobacteria as



**Fig. 5 | Phylogenetic analyses of Glp in Actinobacteria.** **a**, Maximum-likelihood phylogeny of MoeA homologues in Actinobacteria. The clade with a blue background corresponds to Glp, clades in pink correspond to other MoeA homologues. Monophyletic classes were collapsed into a single branch for clarity. Dots indicate ultrafast bootstrap (UFB) > 0.85. Scale bar, average number of substitutions per site. For the detailed tree, see Supporting Data. The genomic context of *glp* in *Cglu* and *M. tuberculosis* is indicated on the right of the tree. The locus tags are indicated for genes *glp* and *glpR* present in *Cglu* (Cgl locus tag) and *M. tuberculosis* (Rv locus tag) genomes. **b**, Partial alignment of three selected regions from MoeA paralogues in Corynebacteriales. Sequences of Glp and MoeA are shown for the same species, representative of all Corynebacteriales families. The FtsZ-binding loop is delimited by the key residues methionine (M361) and

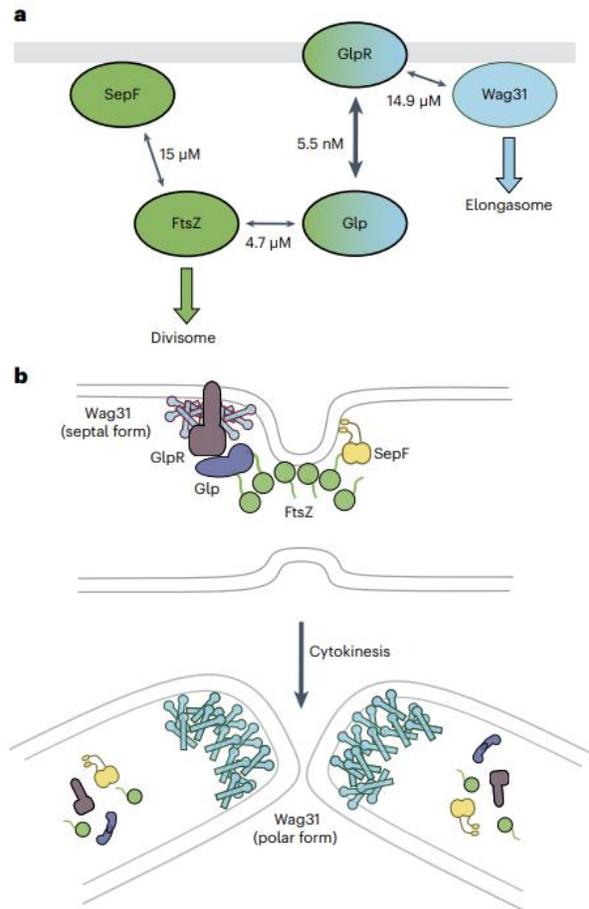
tyrosine (Y369) indicated according to their position on the *Cglu* sequence. The Pro-rich hinge regions 1 and 2 are indicated by a red rectangle and the first residue inside the box is numbered and highlighted above. **c**, Phyletic pattern for the presence of MoeA, Glp and GlpR in Actinobacteria. Full circles indicate presence of the gene in >50% of the analysed genomes of the phylum. Column MoeA indicates the presence of one (light pink) or more (dark pink) paralogues, except for Glp that is indicated in a separate column. The presence of GlpR is indicated by yellow dots. The phyletic pattern is represented on a reference Actinobacteria tree. Actinobacteria classes were collapsed into a single branch for clarity. Actinomycetes class is indicated by a dashed line. Dots indicate UFB > 0.85. Scale bar, average number of substitutions per site. For the detailed tree, see Extended Data Fig. 7, and for the detailed analysis, see Supplementary Table 3.

a duplication of *moeA* and was inherited vertically by its members. The genomes of most other bacterial phyla contain one *moeA* paralogue that does not branch with actinobacterial *glp* (Extended Data Fig. 6a,b) and likely corresponds to the MoeA enzyme, as in *E. coli*. These results suggest that Glp is a molybdotransferase-related enzyme that has acquired novel functions in Actinobacteria as a result of

divergent evolution, to carry out cellular processes specific to the physiology of this order of Bacteria (divisome–elongasome transition).

**Discussion**

In this work we have identified Glp, a gephyrin-like repurposed molybdotransferase MoeA enzyme, and its membrane receptor, GlpR, as



**Fig. 6 | Interaction network and proposed function for Glp-GlpR.** **a**, Known direct protein-protein interactions and their associated apparent  $K_d$  values. Note that SepF-FtsZ was determined using surface plasmon resonance<sup>7</sup>, whereas all other measurements were done with BLI (this work). **b**, Working model of the roles of Glp-GlpR-Wag31 in the divisome-elongasome transition during cytokinesis in *Corynebacteriales*. At the septum, Glp-GlpR would control the functional status of Wag31 and prevent premature pole formation through excessive Wag31 accumulation. Once cell division is completed, this septal control on Wag31 would disappear and an elongation-competent cell pole could form.

components of the corynebacterial divisome. We show that Glp and GlpR are central elements of a protein-protein interaction network directly connecting the cytoskeletal proteins from the divisome (FtsZ) and the elongasome (Wag31) (Fig. 6a). The structure of Glp is consistent with its annotation as MoeA, the enzyme involved in the synthesis of the molybdenum co-factor (Moco), which is present in all forms of life and is used by molybdoenzymes to mediate essential cellular functions such as energy generation and detoxification reactions, and to support virulence in pathogenic bacteria<sup>41,42</sup>. MoeA-containing proteins have also acquired additional functions and act as moonlighting proteins<sup>33</sup>. While this feature was thought to be a recent evolutionary trait restricted to eukaryotic Moco biosynthetic enzymes<sup>29</sup>, the results presented here show that this is also the case for Glp in *Corynebacteriales*. The crystal structure of the Glp-FtsZ complex reveals the precise mode of binding of the FtsZ<sub>CTD</sub> to Glp and provides a molecular signature for the evolutionary repurposing of the molybdotransferase. Glp has evolved a specific groove at the homodimer interface

that creates the FtsZ-binding pocket for a 2:2 stoichiometric complex. Importantly, these results show that, as in other well-studied bacteria, the corynebacterial FtsZ<sub>CTD</sub> also acts as a hub for protein-protein interactions in complex and dynamic protein-protein association networks that govern cell division.

Wag31 appears at mid-cell very early in the cell cycle and accumulates asymmetrically at the cell poles over time<sup>22</sup>. This coiled-coil protein has a high propensity to self-associate and build higher-order assemblies or networks<sup>43</sup> (full-length Wag31 easily forms gels in vitro and large foci of Wag31 are seen at the cell poles in vivo). As Wag31 arrives at the septum well before daughter cell separation, its self-association must be controlled to avoid premature pole formation. This negative regulation might depend on conformational states of Wag31, protein concentration and/or post-translational modifications. Indeed, phosphorylation of Wag31 has been shown to be functionally important in *Mycobacteria* as well as *Streptomyces*<sup>17,44</sup>. Whichever the case, the initial control of Wag31 accumulation at mid-cell most likely depends on the divisome. Evidence for this comes from cellular studies where, upon conditional depletion of essential divisome components such as SepF, FtsQ and others<sup>7,45,46</sup>, cells start branching (that is, they assemble new poles in erroneous places over the lateral cell walls). Although Wag31 is most abundantly localized at the poles in WT cells, neither Glp nor GlpR are found there (Figs. 1e and 4a). This is consistent with FtsZ retaining Glp/GlpR at the septum to specifically interact with and regulate Wag31, possibly in a coiled-coil conformation differing from the polar one, to preclude premature pole formation. The here identified network could thus make FtsZ a direct regulator of early elongasome assembly and maturation, implying that the Z-ring cytoskeleton would ultimately be responsible for the septal localization of Wag31 (Fig. 6a). Timely removal of this control by Z-ring disassembly and cytokinesis would lead to full maturation of the new pole linked to further Wag31 aggregation and late polar elongasome assembly (Fig. 6b).

We observed erratic pole formation when overexpressing GlpR-mNeon (Fig. 4c), indicating a possible functional interference of the mNeon tag on the FtsZ-Glp-GlpR-Wag31 network and subsequent Wag31 delocalization to induce polar growth in incorrect sites. However, removing Glp or the C-terminal IDR2 from GlpR results in an elongated multiseptal phenotype and septal elongasome dysregulation, but not branching (Figs. 1b,c and 4c-e), probably because these deletions are less disruptive for network formation. These observations suggest that interfering with the regulatory function of Glp/GlpR leads to a delay in cell separation, possibly by dysfunction of the early septal elongasome. Early elongasome assembly should start while the divisome is still in place, as the two protein machineries are thought to be required for the synthesis of the full cell wall at the septum before cytokinesis. Two distinct enzyme systems exist to incorporate the septal and polar peptidoglycan, orchestrated by the SEDS pair of enzymes FtsW/FtsI (divisome) and RodA/b-PBP (elongasome), respectively. However, the synthesis and incorporation of the outer layers of the cell envelope are catalysed by a unique set of enzymes, which belong to the elongasome but are also required to finalize cell separation<sup>11</sup>. Evidence for this comes from experiments done with the anti-tuberculosis drug ethambutol, which targets arabinosyltransferases (EmbA-C) and affects specifically the elongasome<sup>47</sup>, but not sPG assembly and divisome function. Although we cannot exclude other effects of Glp/GlpR on cell wall metabolism, their differential sensitivity to ethambutol (Extended Data Fig. 4c) lends some support to the Glp-GlpR complex acting as a bridge between the late divisome and the early elongasome, and makes this system an interesting target for anti-mycobacterial drug development.

In humans, gephyrin is an essential protein for clustering GlyR and GABA receptors at the inhibitory synapse, a process mediated by the underlying tubulin and/or actin cytoskeletons<sup>48-51</sup>. Although the gephyrin-GlyR and Glp-GlpR complexes are involved in unrelated

biological processes, we can draw a molecular analogy between these two networks. They both have undergone evolutionary repurposing from a common enzymatic scaffold (MoeA), and both interact with or organize the tubulin cytoskeleton. They are associated with the membrane through a tight complex formed between MoeA and their membrane receptor, with affinities in the low micromolar or nanomolar range (this work and refs. 52–54). Until now, repurposing of gephyrin was thought to be a trait reserved to recently evolved species such as *Homo sapiens*<sup>52</sup>. In light of our results on bacterial Glp, it remains an open question whether MoeA repurposing and its link to the tubulin cytoskeleton are inherited traits or evolutionarily independent events. In any case, it appears that the MoeA scaffold has a propensity to acquire functions related to network formation and control at the inner membrane of cells in crucially important processes such as mammalian synaptic signalling and bacterial cell division.

## Methods

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions

All strains and plasmids used are listed in Supplementary Table 5. *E. coli* DH5 $\alpha$  or CopyCutter EPI400 (Lucigen) were used for cloning and grown in Luria-Bertani (LB) broth or agar plates at 37 °C, supplemented with 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamycin when required. For protein production, *E. coli* BL21 (DE3) was grown in 2YT broth supplemented with auto-induction medium (0.5% glycerol, 0.05% glucose, 0.2% lactose) and 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamycin or 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  carbenicillin. *C. glutamicum* ATCC13032 (*Cglu*) was used as the wild-type strain. *Cglu* strains were grown in brain heart infusion (BHI) or CGXII minimal medium<sup>55</sup> at 30 °C and 120 r.p.m., supplemented with 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamycin when required. For overexpression, CGXII containing 4% sucrose was supplemented with 1% gluconate.

### Ethambutol sensitivity assay

Overnight BHI cultures of *Cglu* and derivative strains were normalized to an optical density (OD)<sub>600</sub> of 0.5, serially diluted and spotted (10  $\mu\text{l}$ ) onto BHI agar medium with and without 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ethambutol as indicated. Plates were incubated for 24 h at 30 °C and imaged using a ChemiDoc imaging system (BioRad).

### Cgl10883 (*glp*) and Cgl10885 (*glpr*) deletion in *C. glutamicum*

We used the two-step recombination strategy with the pk19mobsacB plasmid to delete the coding region of Glp. We amplified approximately 600 bp upstream and downstream of *glp* or *glpr* using chromosomal DNA of *Cglu* as a template. The PCR fragments were cloned by Gibson assembly into a linearized pk19mobsacB, obtaining the plasmid pk19- $\Delta\text{glp}$  or pk19- $\Delta\text{glpr}$ . Plasmids were sequence verified (Eurofins) and electroporated into *Cglu*. Insertion of the plasmids was checked by colony PCR and positive colonies were cultured overnight. The second round of recombination was selected on BHI plates containing 10% (w/v) sucrose. Kanamycin-sensitive colonies were screened by colony PCR for deletions. Positive colonies were sequence verified (Eurofins).

### Cloning for recombinant protein production in *E. coli*

Primers used are listed in Supplementary Table 6. Cloning was performed by assembling the purified PCR fragments into the specified pET derivative expression vector using Gibson assembly with the commercially available NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning kit (New England Biolabs).

The *glp* gene was amplified by PCR using genomic DNA of *Cglu* as template and cloned into a pET vector containing an N-terminal 6xHis-SUMO tag. Glp <sub>$\Delta\text{loop}$</sub>  (residues 362–371 were replaced by a glycine) was generated by site-directed mutagenesis using the plasmid pET-SUMO-Glp as template.

The gene coding for Wag31 was amplified using gDNA of *Cglu* as template and cloned into a pET vector containing an N-terminal 6xHis-SUMO tag. The plasmid encoding Wag31 with an N-terminal

6xHis tag (pET-His-TEV-Wag31) was synthesized by Genscript. Wag31<sub>1–61</sub> was generated from the pET-His-TEV-Wag31 plasmid by introducing a STOP codon by PCR mutagenesis after residue 61.

The *glpr* and *glpr*<sub>DR1</sub> (residues R24–R214) genes were amplified by PCR using gDNA of *Cglu* as template and cloned into a pET vector containing an N- or C-terminal 6xHis tag. PCR products were digested with DpnI and transformed into chemio-competent *E. coli* cells. All plasmids were verified by Sanger sequencing (Eurofins).

### Cloning for recombinant protein expression in *C. glutamicum*

For recombinant expression in *Cglu*, we used the pUMS\_3 shuttle vector, where the gene of interest was placed under the control of *P*<sub>gntK</sub>, a tight promoter repressed by sucrose and induced by gluconate. Genes were assembled in this plasmid by Gibson or site-directed mutagenesis using the primers listed in Supplementary Table 6. For cellular localization studies, codon-optimized mNeonGreen was ordered from Genscript and cloned alone or fused in frame to the N terminus of *glp*, *moeA1* (*Cgl0212*) and *moeA3* (*Cgl1196*) constructs, including a GSGS linker between the fused proteins, or at the C terminus of *glpr*, *glpr* and *glpr* <sub>$\Delta\text{DR2}$</sub>  expression vectors were generated from the pUMS\_3-GlpR-mNeon vector by introducing a STOP codon by PCR mutagenesis after *glpr* residues 337 and 266, respectively. Plasmids generated are listed in Supplementary Table 6.

### Protein expression and purification

N-terminal 6xHis-SUMO-tagged Glp and Glp <sub>$\Delta\text{loop}$</sub>  were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) following an auto-induction protocol<sup>56</sup>. After 4 h at 37 °C, cells were grown for 20 h at 20 °C in 2YT supplemented with auto-induction medium and 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamycin, collected and flash frozen in liquid nitrogen. Cell pellets were resuspended in 50 ml lysis buffer (50 mM HEPES (pH 8), 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, benzamide, EDTA-free protease inhibitor cocktails (ROCHE)) at 4 °C and sonicated. The lysate was centrifuged for 30 min at 30,000  $\times g$  at 4 °C and loaded onto a Ni-NTA affinity chromatography column (HisTrap FF crude, GE Healthcare). His-tagged proteins were eluted with a linear gradient of buffer B (50 mM HEPES (pH 8), 500 mM NaCl, 500 mM imidazole). The eluted fractions containing the protein of interest were pooled and dialysed in the presence or absence of the SUMO protease (ratio 1:40). Dialysis was carried out at 18 °C overnight in 20 mM HEPES (pH 7.5) and 500 mM NaCl. Cleaved His-tags and His-tagged SUMO protease were removed with Ni-NTA agarose resin. The SUMO-tagged or cleaved proteins were concentrated and loaded onto a Superdex 200 16/60 size exclusion (SEC) column (GE Healthcare) pre-equilibrated at 4 °C in 20 mM HEPES (pH 7.5) and 500 mM NaCl. The peak corresponding to the protein was concentrated, flash frozen in small aliquots in liquid nitrogen and stored at –80 °C.

6xHis-SUMO-FtsZ was produced as described above except for changes in buffer composition: lysis buffer (50 mM HEPES (pH) 8, 300 mM KCl, 5% glycerol, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, benzamide, lysozyme, 0.25 mM TCEP, EDTA-free protease inhibitor cocktails (Roche)), buffer B (50 mM HEPES (pH 8), 300 mM KCl, 5% glycerol, 1 M imidazole). The eluted IMAC fractions containing the protein of interest were pooled and dialysed in the presence or absence of the SUMO protease (ratio used 1:100). Dialysis was carried out at 4 °C overnight in 25 mM HEPES (pH 8), 150 mM KCl and 5% glycerol. Cleaved His-tags and His-tagged SUMO protease were removed with Ni-NTA agarose resin. The protein was concentrated and loaded onto a Superdex 200 16/60 SEC column (GE Healthcare) at 4 °C in 25 mM HEPES (pH 8), 150 mM KCl and 5% glycerol. The pure protein was concentrated, flash frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C.

N- or C-terminal 6xHis-tagged GlpR was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) using auto-induction. Cell pellets were resuspended in 150 ml lysis buffer (50 mM HEPES (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, benzamide, EDTA-free protease inhibitor cocktails (ROCHE)) at 4 °C and loaded 3 times in a CellID disrupter (Constant Systems). The lysate was

centrifuged for 15 min at  $12,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  and the supernatant was centrifuged again for 1 h at  $100,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$ . The pellet containing the membrane fraction was resuspended in 40 ml membrane buffer (50 mM HEPES (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol, 1% DDM and EDTA-free protease inhibitor cocktails (Roche)) and incubated for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . The membrane solubilized fraction was incubated for 1 h at  $4^\circ\text{C}$  with 1 ml of Ni-resin (Super Ni-NTA resin, Neo Biotech). Beads were collected and washed with 10 column volumes of IMAC A buffer (50 mM HEPES (pH 7.5), 300 mM NaCl, 25 mM imidazole, 10% glycerol, 0.05% DDM) and His-tagged GlpR was eluted with 10 column volumes of IMAC B buffer (50 mM HEPES (pH 7.5), 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, 10% glycerol, 0.05% DDM). The eluted fractions containing the protein of interest were pooled, concentrated and loaded onto a Superdex 200 10/300 SEC column (GE Healthcare) pre-equilibrated at  $4^\circ\text{C}$  in SEC buffer (25 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.05% DDM). The pure protein was concentrated, flash frozen in small aliquots in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

6xHis-TEV-Wag31<sub>1-61</sub> (DivIVA domain) was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) using auto-induction. Cell pellets were resuspended in 50 ml lysis buffer (50 mM HEPES (pH 7), 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol, benzonase, lysozyme, EDTA-free protease inhibitor cocktails (Roche)) at  $4^\circ\text{C}$  and sonicated. The lysate was centrifuged for 1 h at  $20,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  and loaded onto a Ni-NTA affinity chromatography column (HisTrap FF crude, GE Healthcare). His-tagged protein was eluted with a linear gradient of buffer B (50 mM HEPES (pH 7), 500 mM NaCl, 10% glycerol, 1 M imidazole). The eluted fractions containing the protein of interest were pooled and dialysed with the TEV protease (ratio 1:25). Dialysis was carried out at  $18^\circ\text{C}$  overnight in 50 mM HEPES (pH 7), 150 mM NaCl and 5% glycerol. Cleaved His-tags and His-tagged TEV protease were removed with Ni-NTA agarose resin. The cleaved protein was concentrated and loaded onto a Superdex 200 16/60 SEC column (GE Healthcare) pre-equilibrated at  $4^\circ\text{C}$  in 50 mM HEPES (pH 7), 150 mM NaCl and 5% glycerol. The pure protein was concentrated, flash frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

6xHis-SUMO-Wag31 was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) using auto-induction. Cell pellets were resuspended in 50 ml lysis buffer (20 mM HEPES (pH 7), 150 mM NaCl, benzonase, EDTA-free protease inhibitor cocktails (Roche)) at  $4^\circ\text{C}$  and lysed by sonication. The lysate was centrifuged for 30 min at  $30,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$ . After centrifugation, a gel-like layer containing His-SUMO-Wag31 was formed between the cell debris pellet and the clarified supernatant. This gel was recovered, washed 3 times with lysis buffer and solubilized in buffer (20 mM HEPES (pH 8.5), NaCl 150 mM). Solubilized SUMO-Wag31 was digested overnight with SUMO protease (ratio used 1:100) at  $18^\circ\text{C}$ . Cleaved His-tags and His-tagged SUMO protease were removed with Ni-NTA agarose resin. Wag31 protein was dialysed overnight at  $4^\circ\text{C}$  in buffer (20 mM HEPES (pH 8.5), 150 mM NaCl), concentrated, flash frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

For antibody production, N-terminal 6xHis-SUMO-GlpR<sub>IDRI</sub> was expressed and purified according to the same protocol as 6xHis-SUMO-tagged Glp described above, except that the final step was carried out on a Superdex 75 16/60 SEC column pre-equilibrated at  $4^\circ\text{C}$  in 20 mM HEPES (pH 8) and 150 mM NaCl. The pure protein was concentrated, flash frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

All purified proteins used in this work were run on SDS-PAGE and shown in Supplementary Fig. 1.

### Crystallization

Crystallization screens were done using the sitting-drop vapour diffusion method and a Mosquito nanolitre-dispensing crystallization robot at  $18^\circ\text{C}$  (TTP Labtech)<sup>57</sup>. Optimal crystals of Glp ( $13.5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) were obtained in 100 mM Tris (pH 8.5), 30% (v/v) PEG400 and 200 mM  $\text{Na}_3\text{Cit}$ . For single-wavelength anomalous diffraction (SAD) phasing, Glp crystals were soaked in mother liquor containing 10 mM  $\text{Cl}_4\text{K}_2\text{Pt}$  for 30 min. The complex of Glp bound to the FtsZ<sub>CTD</sub> peptide

(DDLVDPSFLQ, purchased from Genosphere) was crystallized at 0.34 mM Glp ( $15 \text{ mg ml}^{-1}$ ) and 1.7 mM FtsZ<sub>CTD</sub>. Crystals appeared after 2 weeks in 0.1 M NaCl, 0.1 M Bis-Tris (pH 6.5) and 1.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Crystals were cryo-protected in mother liquor containing 33% (v/v) ethylene glycol or 33% (v/v) glycerol.

### Data collection, structure determination and refinement

X-ray diffraction data were collected at 100 K using synchrotron radiation (Supplementary Table 2) at Soleil (France) and processed using XDS<sup>58</sup> and AIMLESS from the CCP4 suite<sup>59</sup>. A 2.35 Å dataset from a Glp crystal soaked in  $\text{Cl}_4\text{K}_2\text{Pt}$  was used to solve the structure by SAD phasing using Phaser<sup>60</sup> and automatic model building with Buccaneer both from the CCP4 suite. The structures of Glp alone and in complex with FtsZ<sub>CTD</sub> were refined through iterative cycles of manual model building with COOT<sup>61</sup> and reciprocal space refinement with Phenix<sup>62</sup>. The final crystallographic statistics and the PDB deposition codes of the atomic coordinates and structure factors are shown in Supplementary Table 2. Structural figures were generated with ChimeraX<sup>63</sup>.

### Differential scanning fluorescence (thermoFluor) assay

Glp (3 µg) in 25 mM HEPES (pH 8), 150 mM NaCl and 5% glycerol with or without 1 mM FtsZ<sub>CTD</sub> was dispensed into 96-well PCR plates (20 µl per well in triplicates). 50X Sypro Orange (0.6 µl, Invitrogen) was added and the mixture heated from 25 to  $95^\circ\text{C}$  in steps of  $1^\circ\text{C}$  per min in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection system (BioRad). Excitation and emission filters (492 and 516 nm, respectively) were used to monitor the fluorescence increase. The midpoint of the protein unfolding transition was defined as the melting temperature  $T_m$ .

### BLI assays

Experiments were performed on the Octet-Red384 device (Pall Forte-Bio) at  $25^\circ\text{C}$ . To test interactions between FtsZ and Glp variants, the His-SUMO\_Glp variants were diluted at 227 nM in capture buffer (20 mM HEPES (pH 7.5), 500 mM NaCl, 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  BSA) and immobilized on Sartorius Ni-NTA biosensors for 10 min at 1,000 r.p.m., followed by a washing step of 2 min. Empty sensors were used as reference for non-specific binding. FtsZ was diluted at 10 µM in polymerization buffer (25 mM Pipes (pH 6.9), 100 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) and pre-incubated with or without 1 mM guanosine-5'-triphosphate at room temperature for 20 min. Binding of FtsZ to the immobilized His-SUMO\_Glp variants was monitored for 10 min with agitation at 1,000 r.p.m., followed by dissociation in the same buffer without proteins for 10 min. In the reciprocal approach, His-SUMO-FtsZ was diluted at 4 µM in polymerization buffer supplemented with 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  BSA and then immobilized on the Ni-NTA biosensors for 10 min at 1,000 r.p.m., followed by a washing step in the same buffer. Sensors loaded with His-LysA (an unrelated protein) were used as control for non-specific binding. His-SUMO-FtsZ-loaded or reference sensors were incubated for 3 min at 1,000 r.p.m. in the absence or presence of 2-fold serially diluted concentrations of Glp (80–1.25 µM range) in polymerization buffer, followed by dissociation in the same buffer without protein for another 3 min. To test the interaction between Glp, Glp $\Delta_{\text{loop}}$  and GlpR, C-terminal His-tagged GlpR was immobilized at the surface of Ni-NTA biosensors and untagged Glp or Glp $\Delta_{\text{loop}}$  were tested for binding to GlpR. Empty sensors were used as reference. GlpR was diluted at 0.4 µM in 25 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.05% DDM and 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  BSA, and then immobilized on Ni-NTA biosensors. Association of untagged Glp variants in GlpR buffer was monitored for 30 min, followed by dissociation in the same buffer without proteins for another 30 min.

For the biotinylation reaction, 100 µl of His-GlpR at 25 µM was incubated with 20x molar excess of EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (Thermo Scientific) following supplier instructions. Biotinylated GlpR was diluted to 0.25 µM in GlpR buffer (25 mM HEPES (pH 7.5) 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.05% DDM) and immobilized on the commercially available Sartorius Streptavidin biosensors for 5 min at 1,000 r.p.m., followed by

a washing step in GlpR buffer. Empty sensors were used as reference. GlpR-loaded or empty reference sensors were incubated for 5 min at 1,000 r.p.m. in the absence or presence of 2-fold serially diluted concentrations of Wag31 (150–2.34  $\mu\text{M}$  range) in buffer A (20 mM HEPES (pH 8.5), 150 mM NaCl, DDM 0.05%) or DivIVA (200–3.15  $\mu\text{M}$  range) in buffer B (25 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.05% DDM, 1 mg ml<sup>-1</sup> BSA). Specific signals were obtained by double referencing, subtracting non-specific signals measured on reference sensors and buffer signals on specific loaded sensors. Assays were performed at least twice. To obtain the  $K_d$  values, steady-state signal versus concentration curves were fitted using GraphPad Prism 9, assuming a one-site binding model.

### Circular dichroism

All measurements were acquired with an Aviv 215 spectropolarimeter. Far-UV (195–260 nm) spectra were recorded at 25 °C using a 0.2-mm-path-length cylindrical cell. Glp $\Delta_{\text{loop}}$  was measured at 20  $\mu\text{M}$  in a buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.5) and 500 mM NaCl. Ellipticity was measured every 0.5 nm and averaged over 2 s. The final spectrum was obtained by averaging 3 successive scans and subtracting the baseline spectrum of the buffer recorded under the same conditions. BestSel<sup>TM</sup> was used for quantitative decomposition of the far-UV circular dichroism spectrum.

### Co-IP of Wag31/GlpR in *C. glutamicum*

*Cglu*, *Cglu\_Δglp* or *Cglu\_Δglpr* strains were grown in CGXII minimal medium at 30 °C for 6 h. Cells were collected, washed with 1X PBS and normalized by resuspending cell pellets in PBS-T (1X PBS, 0.1% (v/v) Tween-80) to a final OD<sub>600</sub> of 10. The cell suspensions were cross-linked with formaldehyde (0.25% v/v) for 20 min at 30 °C with gentle agitation. The crosslinking reaction was stopped by adding 1.25 M glycine and incubated for 5 min at room temperature. Sample preparation and co-IP was performed as described above with magnetic agarose beads coupled to anti-GlpR antibodies. Eluted samples were subjected to immunoblot analysis using anti-GlpR or anti-DivIVA antibodies.

### Cell fractionation

*Cglu* strains were grown in BHI medium at 30 °C for 6 h and collected by centrifugation. Bacterial cell pellets were resuspended in lysis buffer (25 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, benzonase, EDTA-free protease inhibitor cocktails (Roche)) and disrupted at 4 °C with 0.1 mm glass beads and using a PRECELLYS 24 homogenizer. Cell debris and aggregated proteins were removed by centrifugation at 14,000 × g for 20 min at 4 °C. The supernatant was recentrifuged at 90,000 × g for 30 min at 4 °C to pellet cell membranes. Membrane fractions were solubilized with lysis buffer + 0.5% SDS. Protein concentrations were determined using UV<sub>280</sub> absorbance and adjusted to 6 mg ml<sup>-1</sup>. Of each fraction, 120  $\mu\text{g}$  was run on an SDS-PAGE gel and analysed by western blot using anti-Glp antibodies.

### Antibody production, purification and characterization

Anti-Glp, anti-GlpR and anti-Wag31 antibodies were raised in rabbits (Covalab) against purified Glp, GlpR<sub>10RI</sub> or Wag31<sub>1-61</sub> antigens. For antibody purification, sera from day 67 post inoculation were purified using a 1 ml HiTrap NHS-activated HP column (GE Healthcare) loaded with the corresponding antigen according to manufacturer instructions. Sera were diluted in binding buffer (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 500 mM NaCl), loaded onto the column and washed with 7 ml of binding buffer. Antibodies were eluted with 10 ml elution buffer (100 mM glycine (pH 3), 500 mM NaCl) and neutralized with 1 M Tris (pH 9). Purified antibodies were concentrated to 8 mg ml<sup>-1</sup> and mixed 1:1 with 100% glycerol, aliquoted and stored at -20 °C. The characterization of the antibodies is shown in Supplementary Fig. 3. Anti-SepF and anti-mScarlet antibody production was described previously<sup>7</sup>.

### Western blots

For cell extracts, pellets were resuspended in lysis buffer (50 mM Bis-Tris (pH 7.4), 75 mM 6-aminocaproic acid, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, benzonase and protease inhibitor) and disrupted at 4 °C with 0.1 mm glass beads and using a PRECELLYS 24 homogenizer. Total extracts (6–120  $\mu\text{g}$ ) were run on an SDS-PAGE gel, transferred onto a 0.2  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membrane and incubated for 1 h with blocking buffer (5% skimmed milk, 1X TBS-Tween buffer) at r.t. Blocked membranes were incubated for 1 h at r.t., with the corresponding primary antibody diluted to the appropriate concentration in blocking buffer. After washing in TBS-Tween buffer, membranes were probed with an anti-rabbit or an anti-mouse horseradish peroxidase-linked secondary antibody (GE healthcare) for 45 min. For chemiluminescence detection, membranes were washed with 1X TBS-T and revealed with HRP substrate (Immobilon Forte, Millipore). Images were acquired using the ChemiDoc MP imaging system (BioRad). All uncropped blots are shown in Supplementary Fig. 3. Dilutions used: anti-Glp (1:500), anti-GlpR (1:500), anti-Wag31 (1:500), anti-mNeonGreen (1:1,000), anti-mouse and anti-rabbit secondary Abs (1:10,000).

### Mass spectrometry

**Sample preparation for mass spectrometry analysis.** For SepF interactome, *Cglu* and the strains expressing SepF-Scarlet, SepF<sub>K125E/F131A</sub>-Scarlet and Scarlet were grown in CGXII minimal media supplemented with 1% gluconate for 6 h at 30 °C. Cell suspensions were cross-linked with 0.25% (v/v) formaldehyde for 20 min at 30 °C and protein extracts were incubated with magnetic beads with 10  $\mu\text{g}$  of purified antibodies covalently linked<sup>7</sup> (anti-Scarlet or anti-SepF produced by Covalab). Proteins recovered after washing and elution with 1 M glycine (pH 2) were neutralized with 1 M Tris (pH 9), denatured (2 M urea), reduced (10 mM DTT, 1 h, r.t.), alkylated (55 mM IAM, 45 min, r.t.) and digested with 0.5  $\mu\text{g}$  of trypsin (Promega). Tryptic peptides were desalted using a POROS R2 resin (Thermo Fisher), vacuum dried and resuspended in 0.1% formic acid (FA). GLP interactomes were obtained in two strains (*Cglu* and *Cglu\_Δglpr*) using anti-GLP antibodies and the experimental conditions described above, except for the protein reduction, alkylation and tryptic digestion steps that were performed using the FASP protocol<sup>65</sup> with filter passivation in 5% Tween-20 (ref. 66). *Cglu\_Δglp* was used as control. For all interactomes, tryptic peptides from 4 biological replicates for each condition were analysed using a nano-HPLC-MS/MS. To calculate protein enrichment, we analysed the full proteome of *Cglu* grown in CGXII minimal media from 1 cm long SDS-PAGE gels (12% acrylamide) using 3 biological replicates. In-gel reduction, Cys alkylation and digestion were performed in the conditions described above.

### Nano-HPLC-MS/MS

Tryptic peptides were analysed using a nano-HPLC (UltiMate 3000, Thermo) coupled to a Q-Exactive Plus mass spectrometer (Thermo). Peptide mixtures were loaded onto a precolumn (Acclaim PepMapTM 100, C18, 75  $\mu\text{m}$  × 2 cm) and separated on a C<sub>18</sub> Easy-Spray column (PepMapTM RSLC, 75  $\mu\text{m}$  × 50 cm) using a two-solvent system: (A) 0.1% FA in water and (B) 0.1% FA in acetonitrile at a flow rate of 200 nl min<sup>-1</sup>. The separation gradients used were: from 0% to 55% B in 65 min for the SepF interactome; from 1% to 35% B over 90 min for the GLP interactome and over 150 min for the total proteome.

MS analysis was carried out in data-dependent mode (MS followed by MS/MS of the top 12 ions) using dynamic exclusion. The survey scans were acquired from 200 to 2,000  $m/z$  with a resolution of 70,000 at 200  $m/z$ , while MS/MS spectra were acquired at a resolution of 17,500 at 200  $m/z$ .

### Protein identification and data analysis

PatternLab for Proteomics V (PatternLabV) was used to perform peptide spectrum matching and label-free quantitation analyses on the

basis of extracted-ion chromatograms (XIC)<sup>67</sup>. XICs were obtained by integrating the intensity of a given peptide's ion current over a narrow mass-to-charge window as a function of retention time. For the SepF interactome, a target reverse database was generated using the Cglu ATCC13032 proteome downloaded from UniProt (November 2018), to which the sequences of Scarlet, SepF-Scarlet, SepF<sub>K125E/F131A</sub>-Scarlet and the most common contaminants in proteomics experiments were added. For the GLP interactome and the global proteome, a target reverse Cglu ATCC13032 database downloaded from UniProt (November 2021) including the most common contaminants in proteomics was used. Search parameters were set as follows: *m/z* precursor tolerance: 35 ppm, methionine oxidation and cysteine carbamidomethylation as variable and fixed modifications, respectively, and a maximum of two missed cleavages. Search results were filtered to achieve a false discovery rate value of ≤1% at protein level and 10 ppm tolerance for precursor ions.

To identify SepF interactors, we compared the list of proteins recovered under different conditions: WT strain using α-SepF antibodies (WT/α-SepF), SepF-Scarlet strain using α-SepF antibodies (SepF-Scarlet/α-SepF) and SepF-Scarlet strain using α-Scarlet antibodies (SepF-Scarlet/α-Scarlet). As a control for background binding, the Scarlet strain using α-Scarlet antibodies was used. In addition, we compared proteins recovered from SepF-Scarlet and SepF<sub>K125E/F131A</sub>-Scarlet using α-Scarlet antibodies. To identify GLP interactors, we compared the proteins recovered from *Cglu* or *Cglu ΔglpR* with *Cglu ΔglpR* strain.

PatternLab's Venn diagram statistical module was used to determine proteins uniquely detected in each biological condition using  $P < 0.05$  (ref. 68). In addition, pairwise comparison between Co-IPs and controls was performed using the XIC browser on the basis of the Benjamini-Hochberg theoretical estimator to deal with multiple *t*-tests and the following conditions: maximum parsimony, minimum number of peptides of 1, minimum number of MS1 counts of 5 and  $\log_2FC > 1.8$ .

Enrichment factors for SepF interactors were calculated as the ratio of the normalized spectral abundance factor of each interactor in the interactome to that in the proteome. To compare the recovery of SepF interactors in pull-down analyses of SepF-Scarlet and SepF<sub>K125E/F131A</sub>-Scarlet strains, the signal ( $\Sigma$ XIC of detected peptides in each replicate) was normalized by the signal of SepF in the corresponding sample. Statistical analysis was performed using a two-sided unpaired Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ). All data are presented as mean ± s.d. Calculations were done using GraphPad Prism. The same approach was used to compare the recovery of Wag31 in the GLP interactome of *Cglu* and *Cglu ΔglpR* strains.

### Phase contrast and fluorescence microscopy

For imaging, cultures were grown in BHI for ~6 h, pelleted at 5,200 × *g* at r.t. and inoculated into CGXII, 4% sucrose and kanamycin (25 μg ml<sup>-1</sup>) for overnight growth. The following day, cultures were diluted to an OD<sub>600</sub> of 1 in CGXII and 4% sucrose (±1% gluconate), and grown for 6 h to an OD<sub>600</sub> of ~5 (early exponential phase). Cultures (100 μl) were pelleted, washed with fresh medium and diluted to an OD<sub>600</sub> of 3 for imaging. For membrane staining, Nile Red (2 μg ml<sup>-1</sup> final, Enzo Life Sciences) was added to the culture before placing them on 2% agarose pads prepared with corresponding growth media. Cells were visualized using a Zeiss Axio Observer Z1 microscope fitted with an Orca Flash 4 V2 sCMOS camera (Hamamatsu) and a Pln-Apo ×63/1.4 oil Ph3 objective. Images were collected using Zen Blue 2.6 (Zeiss) and analysed using the software Fiji<sup>69</sup> and the plugin MicrobeJ<sup>70</sup> to generate violin plots and fluorescence intensity heat maps. Heat maps represent the averaged localization of the mNeon-tagged protein on a representative cell. For all analyses, the *Cglu* strain corresponds to *Cglu* + empty plasmid. For *Cglu ΔglpR* + GlpR-mNeon, only cells showing a mean intensity of mNeon fluorescence >35,000 were considered, to discard cells that lost the plasmid.

### Statistics and reproducibility

Because of the important number of cells analysed in each sample, Cohen's *d* value was used to describe effect sizes between different strains independently of sample size:

$$d = \frac{\text{mean}_2 - \text{mean}_1}{\sqrt{\frac{(n_1-1)s_{d_1}^2 + (n_2-1)s_{d_2}^2}{n_1+n_2-2}}}$$

Values were interpreted according to the reference intervals suggested by Cohen<sup>71</sup> and expanded by Sawilowsky<sup>72</sup> as follows: small (ns),  $d < 0.50$ ; medium (\*),  $0.50 < d < 0.80$ ; large (\*\*),  $0.80 < d < 1.20$ ; very large (\*\*\*),  $1.20 < d < 2.0$ ; huge (\*\*\*\*),  $d > 2.0$ .

Unless otherwise stated, *P* values were obtained using a Welch two-sample *t*-test calculated in R. All experiments were performed as biological triplicates. Some autofluorescence was observed for wild-type *Cglu* as previously described<sup>7</sup>. All micrographs and blots shown are representative of similar experiments carried out at least three times, except for those corresponding to Figs. 3c and 4g, and Extended Data Fig. 1d that were performed only once.

### Protein database assemblies

For the sequence analyses in Actinobacteria, we assembled two databases representing all Actinobacteria diversity present at the National Center for Biotechnology (NCBI) as of February 2021: ACTINO\_DB (244 taxa) and ACTINO\_REDUCED\_DB (113 taxa from ACTINO\_DB). For ACTINO\_DB, we selected 5 species per class, except for class Corynebacteriales, where we selected 5 species per order (Supplementary Table 3). For the phylogenetic analyses in Bacteria, we assembled a database on the basis of the one provided in ref. 73. We reduced the taxonomic sampling to 76 species by removing all candidate phyla (Supplementary Table 4).

### Homology searches and mapping

To identify all MoeA homologues in the ACTINO\_DB, we used HMM profile searches. We used the HMMER package (v.3.3.2)<sup>74</sup> tool 'jackhmmmer' to look for homologues of Glp and GlpR in all the proteomes, respectively using the GenBank<sup>75</sup> sequences BAB98276.1 and BAB98278.1 as query. The hits were aligned with mafft (v.7.475)<sup>76</sup> using default parameters. Alignments were manually curated, removing sequences that did not align. The hits obtained by jackhmmmer might not include sequences that are very divergent from the single sequence query. For this, the curated alignments were used to create HMM profiles using the HMMER package tool 'hmmbuild'. Curated HMM profiles for Glp and GlpR were used for a final round of searches against the ACTINO\_DB and Bacteria databases, using the HMMER tool 'hmmsearch'. All hits were curated to remove false positives by checking alignments obtained using linsi, the accurate option of mafft (v.7.475). For Actinobacteria, hits were also curated on the basis of their genomic context. We retrieved 5 genes upstream and downstream of each MoeA paralogue, identified and grouped the corresponding proteins into protein families. Each family larger than 10 sequences was used to create HMM profiles as explained before. These profiles, together with the Glp and GlpR profiles, were used in MacSyFinder<sup>77</sup> against the ACTINO\_DB to identify conserved genomic contexts containing MoeA and 3 or more members of these families separated by no more than 5 other proteins and a permissive *e*-value (<0.1). This analysis complemented the GlpR homology searches, as the sequences are very divergent and therefore difficult to identify without their genomic context. Finally, we analysed the taxonomic distribution of the identified Glp and GlpR sequences. The phyletic pattern and the genomic context information were mapped on an Actinobacteria reference phylogeny using iTOL<sup>78</sup> and custom scripts.

### Phylogenetic analyses

The alignments of Glp homologues (including all MoeA paralogues) were trimmed using BMGE (v.1.2)<sup>79</sup> (option -m BLOSSUM30) to keep

only informative positions. These alignments were used to reconstruct the phylogeny of the MoeA paralogues in ACTINO\_REDUCED\_DB and Bacteria. We used the maximum-likelihood phylogeny reconstruction tool IQ-TREE (v.2.0.6)<sup>80</sup>, with the LG + F + R8 and LG + F + R10 models (-m MFP), respectively, and ultrafast bootstraps (-B 1000).

To reconstruct the reference phylogeny of ACTINO\_DB, we concatenated the protein sequences of RNAPol subunits B, B' and IF-2. Homologues of these proteins were identified, aligned and trimmed as explained before. These alignments were concatenated into a supermatrix to infer a maximum-likelihood tree with IQ-TREE, using the posterior mean site frequency (PMSF) and the model LG + C60 + F + I + G, with ultrafast bootstrap supports calculated from 1,000 replicates. The guide tree required by the PMSF model was obtained using the MFP option and the same supermatrix. The reference phylogeny of Bacteria was obtained from ref. 73 and candidate taxa were pruned from the tree.

### Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

### Data availability

Atomic coordinates and structure factors have been deposited in the PDB with accession codes 8BVE (Glp) and 8BVF (Glp-FtsZ<sub>CTD</sub>). The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE<sup>81</sup> partner repository with the dataset identifier PXD037255. All phylogenetic data used to produce our results are provided as Supporting Data at <https://doi.org/10.17632/265wyk8r3f.1>. All materials of this paper can be provided upon reasonable request. Custom scripts will be made available upon request. Source data for all relevant figures are provided with this paper.

### References

- Hirota, H., Rytter, A. & Jacob, F. Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **33**, 677–693 (1968).
- Du, S. & Lutkenhaus, J. At the heart of bacterial cytokinesis: the Z ring. *Trends Microbiol.* **27**, 781–791 (2019).
- den Blaauwen, T., Hamoen, L. W. & Levin, P. A. The divisome at 25: the road ahead. *Curr. Opin. Microbiol.* **36**, 85–94 (2017).
- McQuillen, R. & Xiao, J. Insights into the structure, function, and dynamics of the bacterial cytokinetic FtsZ-ring. *Annu. Rev. Biophys.* **49**, 309–341 (2020).
- Donovan, C. & Bramkamp, M. Cell division in *Corynebacterineae*. *Front. Microbiol.* **5**, 132 (2014).
- Gola, S., Munder, T., Casonato, S., Manganello, R. & Vicente, M. The essential role of SepF in mycobacterial division. *Mol. Microbiol.* **97**, 560–576 (2015).
- Sogues, A. et al. Essential dynamic interdependence of FtsZ and SepF for Z-ring and septum formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Nat. Commun.* **11**, 1641 (2020).
- Kieser, K. J. & Rubin, E. J. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 550–562 (2014).
- Houssin, C. et al. in *Corynebacterium glutamicum* (eds Inui, M. & Toyoda, K.) 25–60 (Springer, 2020).
- Abrahams, K. A. & Besra, G. S. Synthesis and recycling of the mycobacterial cell envelope. *Curr. Opin. Microbiol.* **60**, 58–65 (2021).
- Zhou, X. et al. Sequential assembly of the septal cell envelope prior to V snapping in *Corynebacterium glutamicum*. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 221–231 (2019).
- Garner, E. C. et al. Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science* **333**, 222–225 (2011).
- Domínguez-Escobar, J. et al. Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science* **333**, 225–228 (2011).
- van Teeffelen, S. et al. The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 15822–15827 (2011).
- Letek, M. et al. DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **190**, 3283–3292 (2008).
- Sieger, B. & Bramkamp, M. Interaction sites of DivIVA and RodA from *Corynebacterium glutamicum*. *Front. Microbiol.* **5**, 738 (2015).
- 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. *Microbiology* **154**, 725–735 (2008).
- Ginda, K. et al. ParA of *Mycobacterium smegmatis* co-ordinates chromosome segregation with the cell cycle and interacts with the polar growth determinant DivIVA. *Mol. Microbiol.* **87**, 998–1012 (2013).
- Donovan, C., Sieger, B., Krämer, R. & Bramkamp, M. A synthetic *Escherichia coli* system identifies a conserved origin tethering factor in Actinobacteria. *Mol. Microbiol.* **84**, 105–116 (2012).
- Plocinski, P. et al. *Mycobacterium tuberculosis* CwsA interacts with CrgA and Wag31, and the CrgA-CwsA complex is involved in peptidoglycan synthesis and cell shape determination. *J. Bacteriol.* **194**, 6398–6409 (2012).
- Böhm, K. et al. Chromosome organization by a conserved condensin-ParB system in the actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Nat. Commun.* **11**, 1485 (2020).
- Santi, I., Dhar, N., Bousbaine, D., Wakamoto, Y. & McKinney, J. D. Single-cell dynamics of the chromosome replication and cell division cycles in mycobacteria. *Nat. Commun.* **4**, 2470 (2013).
- Aldridge, B. B. et al. Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility. *Science* **335**, 100–104 (2012).
- Hannebelle, M. T. M. et al. A biphasic growth model for cell pole elongation in mycobacteria. *Nat. Commun.* **11**, 452 (2020).
- Ramos-León, F. et al. A conserved cell division protein directly regulates FtsZ dynamics in filamentous and unicellular actinobacteria. *eLife* **10**, e63387 (2021).
- Leimkühler, S. The biosynthesis of the molybdenum cofactors in *Escherichia coli*. *Environ. Microbiol.* **22**, 2007–2026 (2020).
- Lim, H. C. et al. Identification of new components of the RipC-FtsEX cell separation pathway of *Corynebacterineae*. *PLoS Genet.* **15**, e1008284 (2019).
- Frunzke, J., Engels, V., Hasenbein, S., Gätgens, C. & Bott, M. Co-ordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2. *Mol. Microbiol.* **67**, 305–322 (2008).
- Mayr, S. J., Mendel, R.-R. & Schwarz, G. Molybdenum cofactor biology, evolution and deficiency. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1868**, 118883 (2021).
- Kirsch, J. et al. The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J. Biol. Chem.* **266**, 22242–22245 (1991).
- Prior, P. et al. Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* **8**, 1161–1170 (1992).
- Stallmeyer, B. et al. The neurotransmitter receptor-anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants, and mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 1333–1338 (1999).
- Copley, S. D. Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 265–272 (2003).

34. Xiang, S., Nichols, J., Rajagopalan, K. V. & Schindelin, H. The crystal structure of *Escherichia coli* MoeA and its relationship to the multifunctional protein gephyrin. *Structure* **9**, 299–310 (2001).
35. Lionel, A. C. et al. Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2055–2066 (2013).
36. Sola, M. et al. Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *EMBO J.* **23**, 2510–2519 (2004).
37. Hempel, A. M., Wang, S. B., Letek, M., Gil, J. A. & Flårdh, K. Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **190**, 7579–7583 (2008).
38. Flårdh, K., Richards, D. M., Hempel, A. M., Howard, M. & Buttner, M. J. Regulation of apical growth and hyphal branching in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 737–743 (2012).
39. Meniche, X. et al. Subpolar addition of new cell wall is directed by DivIVA in mycobacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, E3243–E3251 (2014).
40. Baranowski, C., Rego, E. H. & Rubin, E. J. The dream of a mycobacterium. *Microbiol. Spectr.* <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0008-2018> (2019).
41. Zhong, Q., Kobe, B. & Kappler, U. Molybdenum enzymes and how they support virulence in pathogenic bacteria. *Front. Microbiol.* **11**, 615860 (2020).
42. Williams, M., Mizrahi, V. & Kana, B. D. Molybdenum cofactor: a key component of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? *Crit. Rev. Microbiol.* **40**, 18–29 (2013).
43. Stahlberg, H. et al. Oligomeric structure of the *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA determined by transmission electron microscopy. *Mol. Microbiol.* **52**, 1281–1290 (2004).
44. Hempel, A. M. et al. The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, E2371–E2379 (2012).
45. Wu, K. J. et al. Characterization of conserved and novel septal factors in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/jb.00649-17> (2018).
46. de Wet, T. J., Winkler, K. R., Mhlanga, M., Mizrahi, V. & Warner, D. F. Arrayed CRISPRi and quantitative imaging describe the morphotypic landscape of essential mycobacterial genes. *eLife* **9**, e60083 (2020).
47. Schubert, K. et al. The antituberculosis drug ethambutol selectively blocks apical growth in CMN group bacteria. *mBio* **8**, e02213–e02216 (2017).
48. Kneussel, M., Betz, H., Kneussel, M. & Betz, H. Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci.* **23**, 429–435 (2000).
49. Tretter, V. et al. Gephyrin, the enigmatic organizer at GABAergic synapses. *Front. Cell. Neurosci.* **6**, 23 (2012).
50. Tyagarajan, S. K. & Fritschy, J.-M. Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 141–156 (2014).
51. Choi, G. & Ko, J. Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer. *Exp. Mol. Med.* **47**, e158 (2015).
52. Schrader, N. et al. Biochemical characterization of the high affinity binding between the glycine receptor and gephyrin. *J. Biol. Chem.* **279**, 18733–18741 (2004).
53. Maric, H. M., Kasaragod, V. B. & Schindelin, H. Modulation of gephyrin–glycine receptor affinity by multivalency. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2554–2562 (2014).
54. Herweg, J. & Schwarz, G. Splice-specific glycine receptor binding, folding, and phosphorylation of the scaffolding protein gephyrin. *J. Biol. Chem.* **287**, 12645–12656 (2012).
55. Keilhauer, C., Eggeling, L. & Sahm, H. Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**, 5595–5603 (1993).
56. Studier, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234 (2005).
57. Weber, P. et al. High-throughput crystallization pipeline at the Crystallography Core Facility of the Institut Pasteur. *Molecules* **24**, 4451 (2019).
58. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D* **66**, 125–132 (2010).
59. Winn, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D* **67**, 235–242 (2011).
60. McCoy, A. J. et al. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 (2007).
61. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D* **66**, 486–501 (2010).
62. Liebschner, D. et al. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr. D* **75**, 861–877 (2019).
63. Pettersen, E. F. et al. UCSF ChimeraX: structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* **30**, 70–82 (2021).
64. Micsonai, A. et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, E3095–E3103 (2015).
65. Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* **6**, 359–362 (2009).
66. Erde, J., Loo, R. R. O. & Loo, J. A. Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments. *J. Proteome Res.* **13**, 1885–1895 (2014).
67. Santos, M. D. M. et al. Simple, efficient and thorough shotgun proteomic analysis with PatternLab V. *Nat. Protoc.* **17**, 1553–1578 (2022).
68. Carvalho, P. C. et al. Analyzing marginal cases in differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* **27**, 275–276 (2011).
69. Schindelin, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
70. Ducret, A., Quardokus, E. M. & Brun, Y. V. MicrobeJ, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis. *Nat. Microbiol.* **1**, 16077 (2016).
71. Cohen, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (Routledge, 1988).
72. Sawilowsky, S. S. New effect size rules of thumb. *J. Mod. Appl. Stat. Methods* **8**, 597–599 (2009).
73. Megrian, D., Taib, N., Jaffe, A. L., Banfield, J. F. & Gribaldo, S. Ancient origin and constrained evolution of the *division and cell wall* gene cluster in Bacteria. *Nat. Microbiol.* **7**, 2114–2127 (2022).
74. Johnson, L. S., Eddy, S. R. & Portugaly, E. Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure. *BMC Bioinformatics* **11**, 431 (2010).
75. Sayers, E. W. et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **50**, D161–D164 (2021).
76. Katoh, K. & Standley, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772–780 (2013).
77. Abby, S. S., Néron, B., Ménager, H., Touchon, M. & Rocha, E. P. C. MacSyFinder: a program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems. *PLoS ONE* **9**, e110726 (2014).
78. Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **47**, 256–259 (2019).
79. Criscuolo, A. & Gribaldo, S. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol. Biol.* **10**, 210 (2010).

Article

<https://doi.org/10.1038/s41564-023-01473-0>

80. Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Haeseler, A. V. & Minh, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 268–274 (2015).
81. Perez-Riverol, Y. et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D442–D450 (2018).

### Acknowledgements

We thank the core facilities at the Institut Pasteur C2RT, P. England, B. Raynal, S. Brûlé (PFBMI); P. Weber, C. Pissis, A. Mechaly (PFC), and J. Fernandes and A. Salles (UtechS PBI / Imagopole, supported by France BioImaging; ANR-10-INSB-04; Investments for the Future); P. Campagne from the Bioinformatics and Biostatistics Hub from the IP-C3BI; the synchrotron source Soleil (Saint-Aubin, France) for granting access to the facility and the staff of Proxima 1 and Proxima 2A beamlines for helpful assistance during X-ray data collection. Molecular graphics were done with ChimeraX, developed at UCSF with support from NIH (R01-GM129325) and NIAID. This work was supported in part by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR, France), contracts ANR-18-CE11-0017 (P.M.A.) and ANR-21-CE11-0003 (A.M.W.); Agencia Nacional de Investigación et Innovación (ANII, Uruguay), FCE\_1\_2019\_1\_155569 (R.D.), FOCEM-COF 03/11 (R.D.), ECOS-Sud France-Uruguay, contract U20B02 (A.M.W. and R.D.); and by institutional grants from the Institut Pasteur, the CNRS, and Université Paris Cité. J.P. was funded through the AMX programme from the Ecole Polytechnique. A.S. was part of the Pasteur–Paris University (PPU) International PhD Program, funded by the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under Marie Skłodowska-Curie grant agreement no. 665807. Q.G. was funded by MTCI PhD school (ED 563). A.R. was funded by ANII, CAP (UdelaR) and PEDECIBA.

### Author contributions

A.M.W., R.D. and P.M.A. designed the research. M.M., J.P., A.L., A.S., Q.G., M.B.A. and A.M.W. conducted the protein biochemistry, cell biology and genetic experiments, and purified proteins for structural and biophysical studies. J.P., A.D., C.G. and A.M.W. performed cellular imaging and analysis. M.M. and J.P. carried out the biochemical and biophysical studies of protein–protein interactions. A.L., M.M., A.R., M.M.P., A.M.W. and R.D. carried out MS and interactomics experiments. M.M., A.S., A.H. and P.M.A. carried out the crystallogenesis and crystallographic studies. D.M. performed

the phylogeny and sequence analyses. A.M.W. and P.M.A. wrote the paper. All authors edited the paper.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Extended data** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01473-0>.

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01473-0>.

**Correspondence and requests for materials** should be addressed to Rosario Durán or Anne Marie Wehenkel.

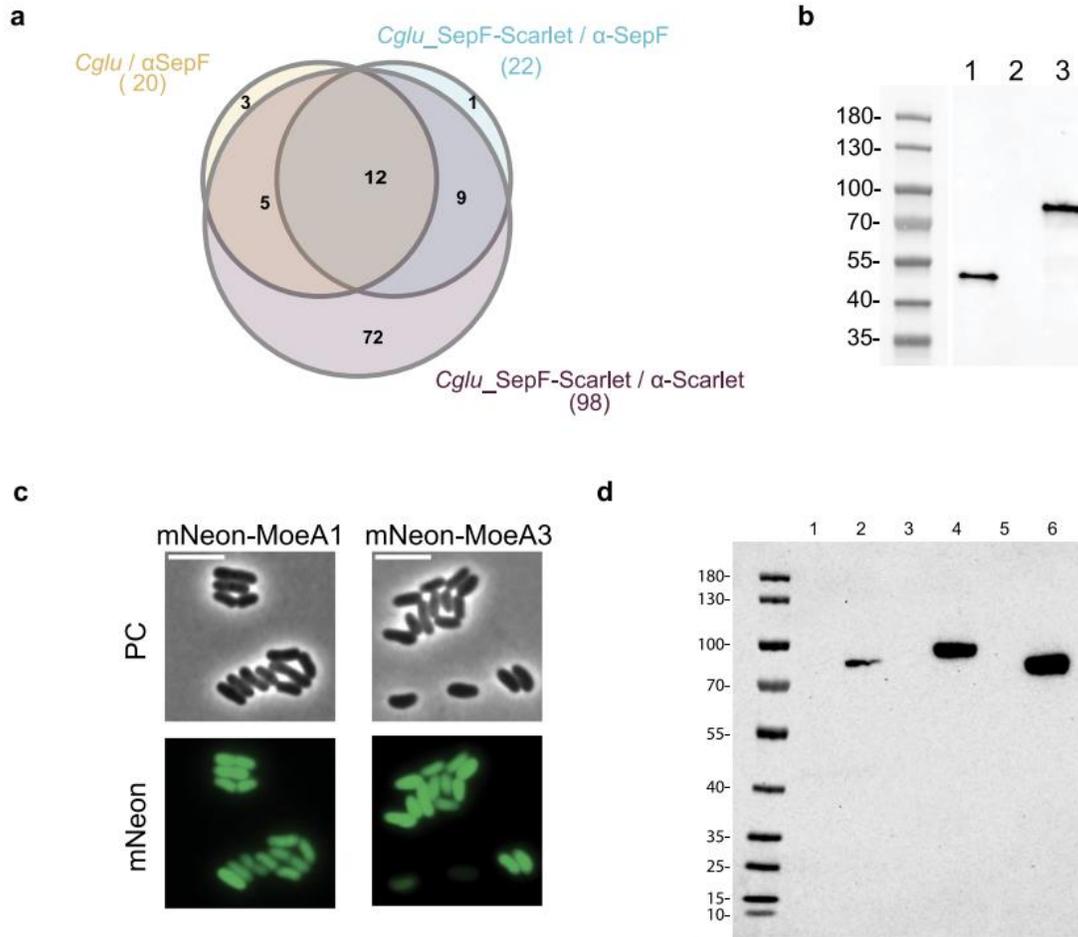
**Peer review information** *Nature Microbiology* thanks Michal Letek, Kanika Khanna and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher’s note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

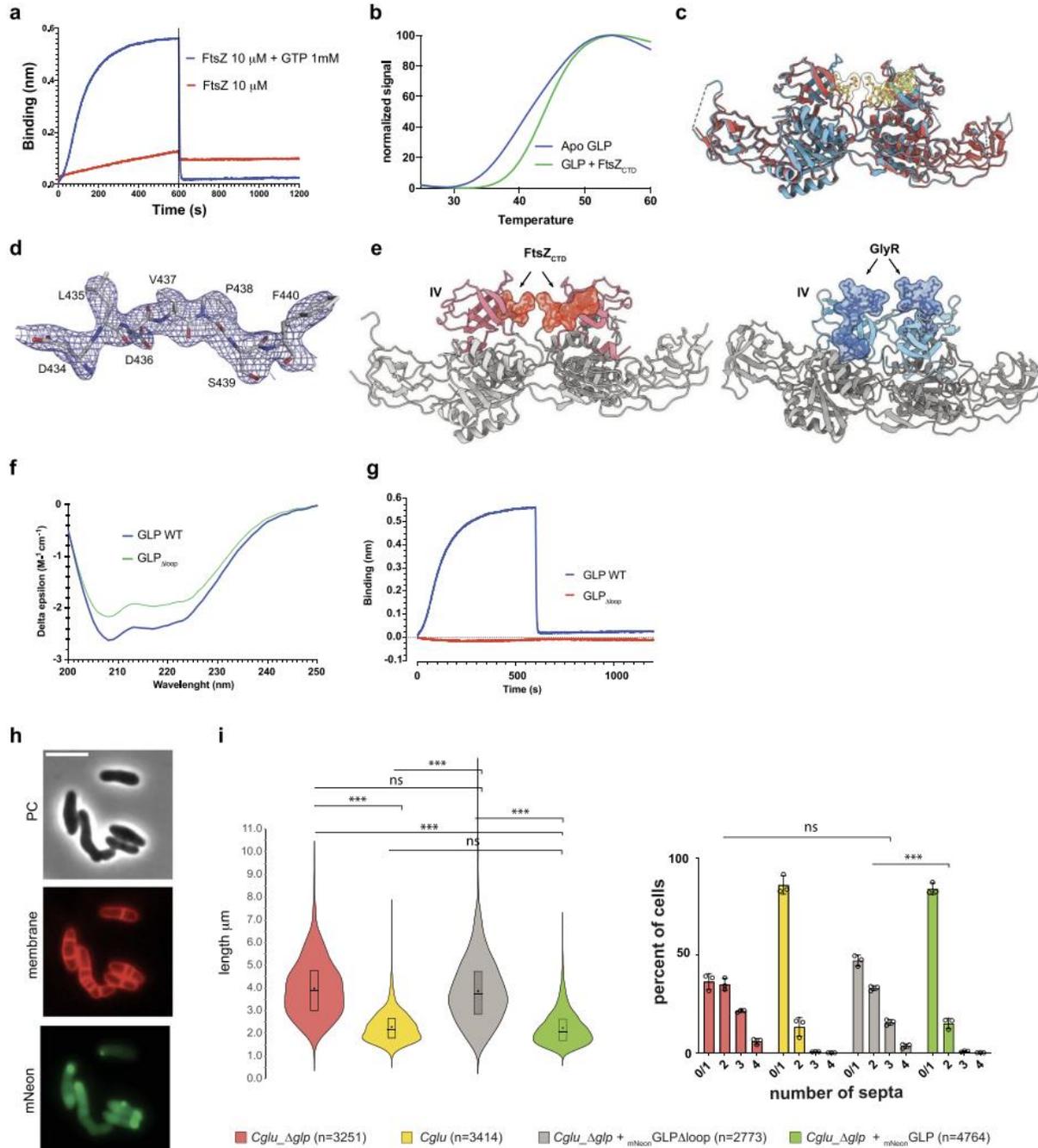
**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023



**Extended Data Fig. 1 | Identification of Glp as a cell division protein.** (a) Venn diagram showing the overlap between 3 independent SepF interactomes using *Cglu* or *Cglu\_SepF-Scarlet* strains. Proteins only detected in each interactome were identified by comparison with control condition and using the probability mode ( $p$  value < 0.05) of Patternlab Venn diagram module following a bayesian model<sup>68</sup>. Proteins enriched in SepF Co-IPs when compared to controls were identified using pairwise comparison module of Patternlab V based on XIC intensities. 20, 22 and 98 proteins were detected as SepF interactors in *Cglu*/ $\alpha$ -SepF (strain/antibody), *Cglu\_SepF-Scarlet*/ $\alpha$ -SepF and *Cglu\_SepF-Scarlet*/ $\alpha$ -Scarlet respectively. 12 proteins were common to all of Co-IPs, and for 11 of them an enrichment factor in relation to the total proteome could be calculated, and thus represent the core SepF interactome (Supplementary Table 1,a and Fig. 1a). One additional interactor, the hypothetical protein Cgl1805, could not be detected in the proteome and no enrichment factor could thus be reported. (b) Western blots of whole cell extracts (120  $\mu$ g) from *Cglu* (lane 1) and *Cglu\_Aglp* strains

transformed with the empty plasmid (lane 2) or mNeon-Glp (lane 3). Glp and mNeon-Glp levels were revealed using the  $\alpha$ -Glp antibody. Left: molecular weight markers (kDa) (c) Cellular localization of *Cglu* MoeA homologs MoeA1/*Cgl0212* (25% aa sequence identity) and MoeA3/*Cgl1196* (27% aa sequence identity). Representative images in phase contrast and mNeon fluorescent signal for *Cglu\_mNeon-MoeA1* and *Cglu\_mNeon-MoeA3*. Both MoeA1 and MoeA3 are cytosolic, which contrasts with the mid-cell localization of mNeon-Glp shown in Fig. 1e. All Scale bars 5  $\mu$ m. (d) the cytoplasmic distribution was not due to fusion protein degradation as shown by Western blots of whole cell extracts (120  $\mu$ g) from *Cglu* carrying mNeon-MoeA1, mNeon-Glp or mNeon-MoeA3 plasmids and revealed using an  $\alpha$ -mNeon antibody. Left: molecular weight markers (kDa); Lanes 1: mNeon-MoeA1 (sucrose); 2: mNeon-MoeA1 (gluconate); 3: mNeon-Glp (sucrose); 4: mNeon-Glp (gluconate); 5: mNeon-MoeA3 (sucrose); 6: mNeon-MoeA3 (gluconate).



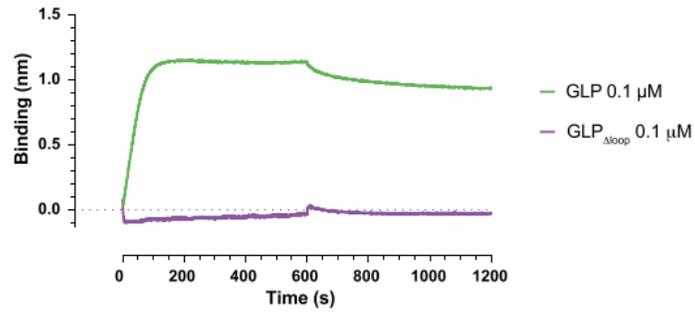
Extended Data Fig. 2 | See next page for caption.

Article

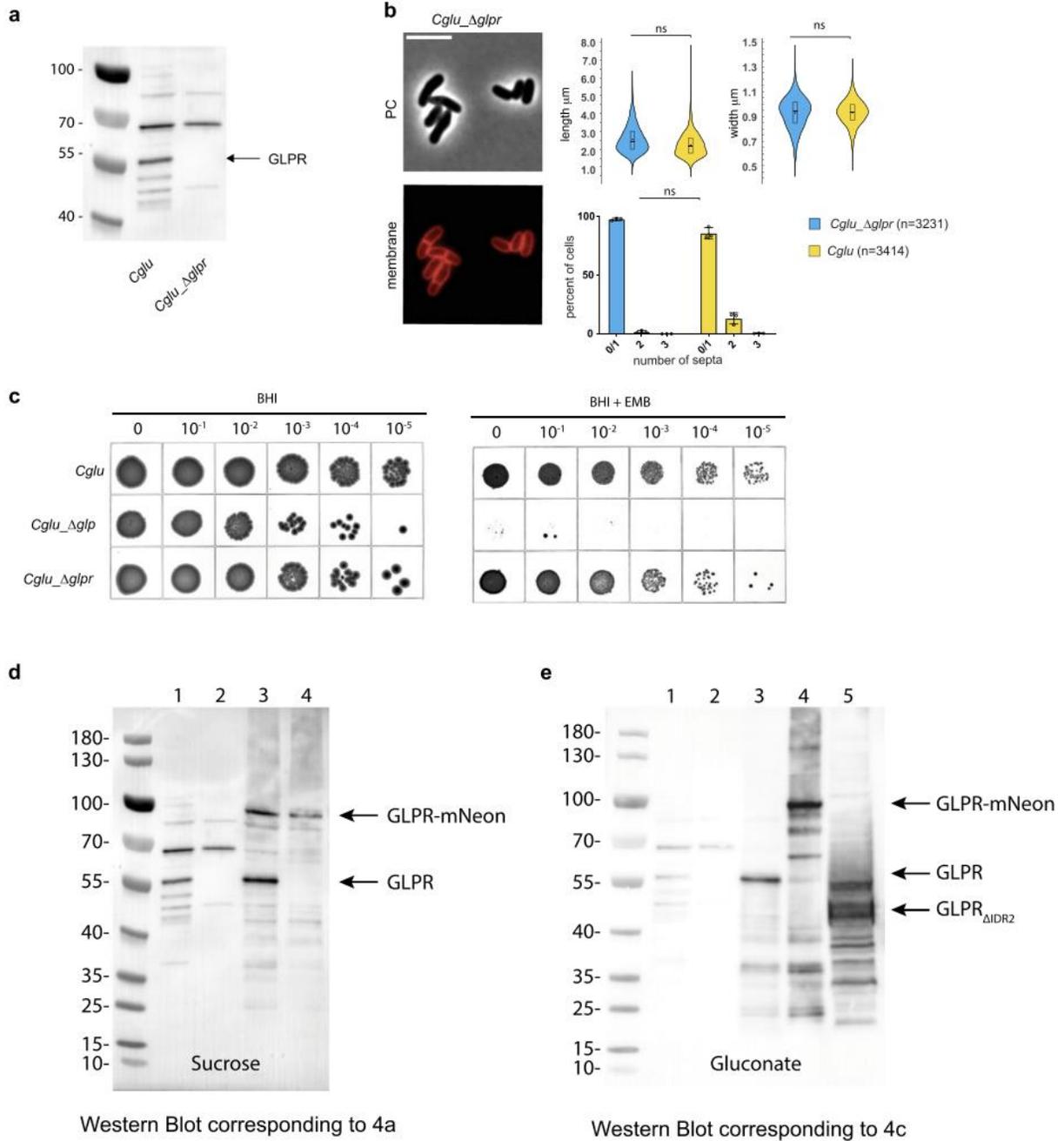
<https://doi.org/10.1038/s41564-023-01473-0>

**Extended Data Fig. 2 | Glp-FtsZ interaction.** (a) BLI sensorgrams of FtsZ binding to immobilized Glp in the presence or absence of 1 mM GTP. (b) Normalized melting curves of Glp with or without 1 mM FtsZ<sub>CTD</sub> peptide as determined by a thermofluor assay. Glp was stabilized by 2 °C in the presence of FtsZ<sub>CTD</sub>. (c) The crystal structures of ligand-free (red) and FtsZ<sub>CTD</sub>-bound (blue and yellow ligand). Glp can be superimposed with an r.m.s.d. of 0.64 Å for 392 equivalent Cα atoms. (d) Electron density map of FtsZ<sub>CTD</sub> bound to Glp monomer B contoured at 1.2 σ. (e) Comparison of the Glp-FtsZ<sub>CTD</sub> complex (red, left panel) with the Gephyrin-GlyR complex (blue, right panel, PDB code: 2fts). In both cases the FtsZ<sub>CTD</sub> and GlyR peptides (molecular surfaces) bind the domain IV (in colour) of Glp and gephyrin respectively. (f) Far-UV circular dichroism spectra of Glp and Glp<sub>Δloop</sub>. (g) BLI sensorgrams of FtsZ (10 μM) binding to immobilized Glp or Glp<sub>Δloop</sub>. (h) Representative images for mNeon-Glp<sub>Δloop</sub> in *Cglu\_Δglp*. Scale bar = 5 μm.

(i) Left, Violin plots showing the distribution of cell length. The number of cells used in the analyses (n) is indicated below each plot representing triplicate experiments. The box indicates the 25<sup>th</sup> to the 75<sup>th</sup> percentile, the mean and the median are indicated with a dot and a line in the box, respectively. Significance indicated corresponds to values of Cohen's d (from top to bottom: (\*\*\*, d = 1,55, P = 0), (ns, d = 0,09, P = 0,0012), (\*\*\*, d = 1,76, P = 0), (\*\*\*, d = 1,58, P = 0), (\*\*\*, d = 1,78, P = 0), (ns, d = 0, P = 0,95)). Right, frequency histogram indicating the number of septa per cell, calculated from n cells imaged from 3 independent experiments (triplicates) for each strain (for *Cglu*, n = 718, 1468 and 1223; for *Cglu\_Δglp* + mNeon-Glp, n = 1641, 1311 and 1801; for *Cglu\_Δglp*, n = 873, 1538 and 840; for *Cglu\_Δglp* + mNeon-Glp<sub>Δloop</sub>, n = 678, 1187 and 905); open circles represent the corresponding data points; bars represent the mean ± SD. Cohen's d from top to bottom (ns, d = 0.28, P = 1.19e-26), (\*\*\*, d = 1.25, P = 0).



**Extended Data Fig. 3 | BLI sensorgram.** BLI sensorgram of Glp or Glp<sub>Δloop</sub> (0.1 μM) binding to immobilized GlpR.



Extended Data Fig. 4 | See next page for caption.

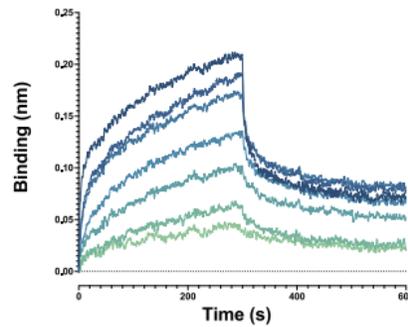
Article

<https://doi.org/10.1038/s41564-023-01473-0>

**Extended Data Fig. 4 | Phenotypic analysis of the *Cglu\_Aglpr* strain.**

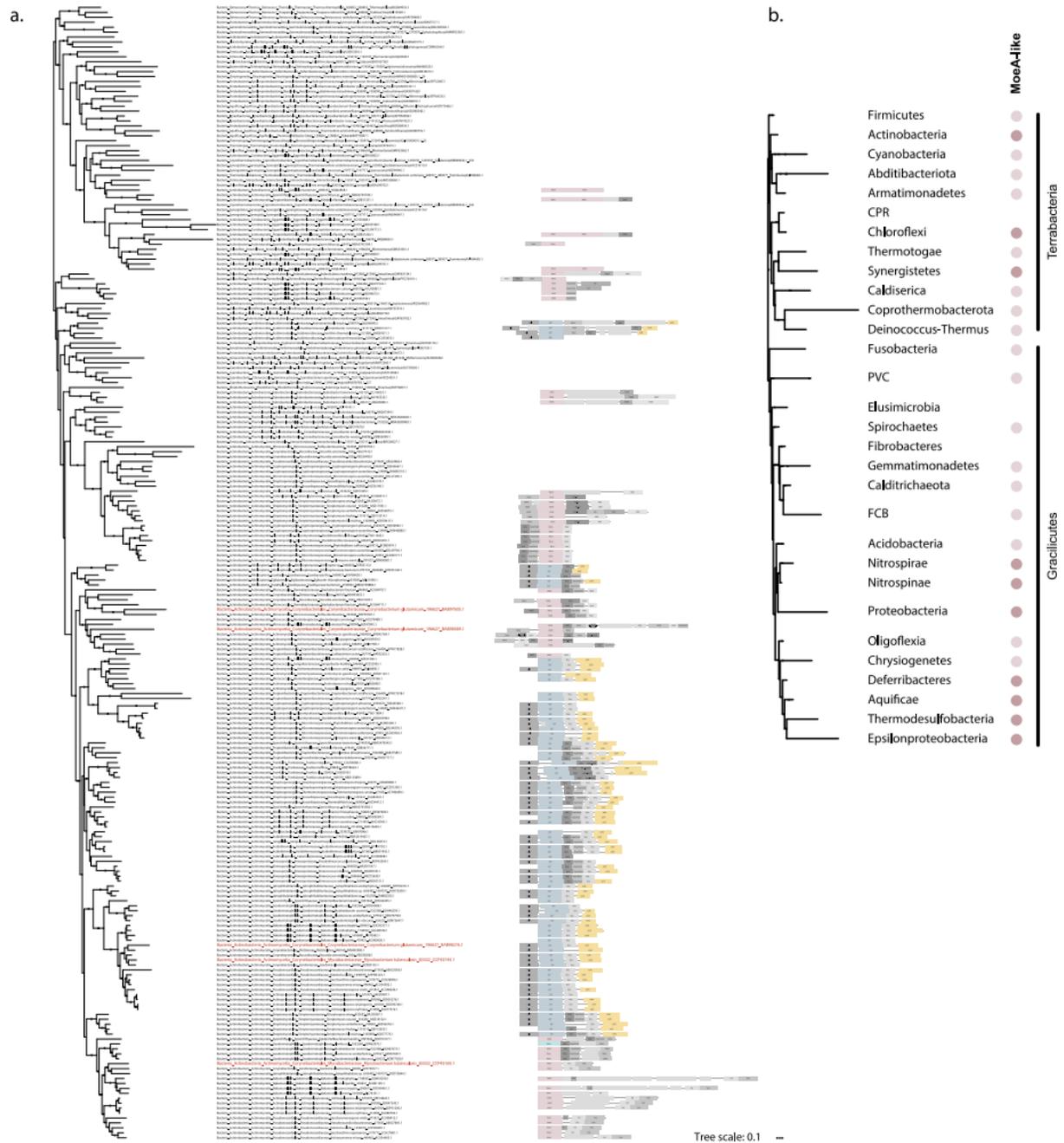
(a) Western blots of whole cell extracts (120 µg) from *Cglu* and *Cglu\_Aglpr*. GlpR was revealed using an α-GlpR antibody. An arrow indicates the specific signal for GlpR. Molecular weight markers (kDa) are shown on the left (b) Representative images of *Cglu\_Aglpr*. Scale bar 5µm. Violin plots showing the distribution of cell length (ns,  $d = 0,46$ ,  $p = 8,22e-75$ ) and cell width (ns,  $d = 0$ ,  $p = 0,29$ ) for *Cglu\_Aglpr* and *Cglu*. The number of cells (n) used (from triplicates) is indicated below each violin representation; the box indicates the 25<sup>th</sup> to the 75<sup>th</sup> percentile, mean and the median are indicated with a dot and a line in the box, respectively. Frequency histogram indicating the number of septa per cell for *Cglu* and *Cglu\_Aglpr* strains, calculated from n cells imaged from 3 independent experiments for each strain (for *Cglu*,  $n = 718, 1468$  and  $1223$ ; for *Cglu\_Aglpr*,  $n = 931, 934$  and  $1363$ ); open circles represent the corresponding data points; bars represent the mean ± SD. Cohen's d (ns,  $d = 0,01$ ,  $p\text{-value} = 0,8271459$ ) (c) Ethambutol sensitivity assay of *Aglpr* strain. (d) Western blots of whole cell extracts (120 µg) from *Cglu* and

*Cglu\_Aglpr* strains complemented with the empty plasmid or GlpR-mNeon. GlpR was revealed using an α-GlpR antibody. An arrow indicates the specific signal for GlpR and GlpR-mNeon. Western blot corresponds to representative cells shown in Fig. 4a. Left: molecular weight markers (kDa); Lane 1: *Cglu* + empty plasmid; Lane 2: *Cglu\_Aglpr* + empty plasmid; Lane 3: *Cglu* + GlpR-mNeon; Lane 4: *Cglu\_Aglpr* + GlpR-mNeon. (e) Western blots of whole cell extracts (120 µg) from *Cglu* and *Cglu\_Aglpr* strains complemented with the empty plasmid, GlpR, GlpR-mNeon or GlpR<sub>ΔIDR2</sub>. GlpR was revealed using an α-GlpR antibody. Arrows indicate specific signal for GlpR, GlpR-mNeon and GlpR<sub>ΔIDR2</sub>. Western blot corresponds to representative cells shown in Fig. 4c. Left: molecular weight markers (kDa); Lane 1: *Cglu* + empty plasmid; Lane 2: *Cglu\_Aglpr* + empty plasmid; Lane 3: *Cglu\_Aglpr* + GlpR; Lane 4: *Cglu\_Aglpr* + GlpR-mNeon; Lane 5: *Cglu\_Aglpr* + GlpR<sub>ΔIDR2</sub>. Note that many cells in the GlpR-mNeon overexpressing strain have lost their plasmid and thus the overexpression is underestimated in these whole cell extracts.



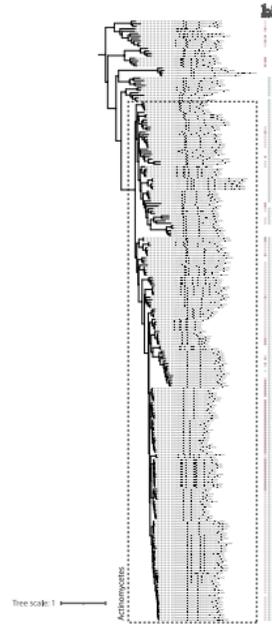
**Extended Data Fig. 5 | GIpR-Wag31 interactions.** Sensorgrams of Wag31<sub>1-61</sub> binding to immobilized GIpR by biolayer interferometry. A series of measurements using a range of concentrations for Wag31<sub>1-61</sub> (200  $\mu$ M

(dark blue) - 3.125  $\mu$ M (light green)) was carried out to derive the apparent equilibrium dissociation constant  $K_d$  (14.86  $\mu$ M) from steady-state signal versus concentration curves fitted assuming a one-site binding model.



**Extended Data Fig. 6 | Phylogenetic analyses of Glp in Bacteria.** (a) Maximum likelihood phylogeny of MoeA-like paralogs in Bacteria. The genomic context of Glp/MoeA paralogs is indicated for each branch, if conserved in at least two other cases. Non-conserved genes in the genomic context are indicated with gray rectangles without labels. Branches that correspond to *C. glutamicum* and *M. tuberculosis* species are indicated in red. Dots indicate UFB > 0.85.

The scale bar represents the average number of substitutions per site. (b) Phyletic pattern for the presence of MoeA-like paralogs in Bacteria. Full circles indicate presence of the gene in more than 50% of the analyzed genomes of the phylum, darker pink indicates the presence of more than one copy. The phyletic pattern is represented on a reference Bacteria tree<sup>73</sup>. Phyla were collapsed into a single branch for clarity. For the detailed analysis see Supplementary Table 4.



**Extended Data Fig. 7 | Phyletic pattern for the presence of MoeA, Glp and GlpR in *Actinobacteria*.** Extended version of Fig. 5c. Full circles indicate presence of the gene in the species and blanks indicate its absence. In the column MoeA, darker pink indicates the presence of more than one copy. Column MoeA

represents all paralogs, except for Glp that is indicated in a separate column. The phyletic pattern is represented on a reference *Actinobacteria* tree. *Actinomyces* class is indicated by a dashed line. Dots indicate UFB > 0.85. The scale bar represents the average number of substitutions per site.

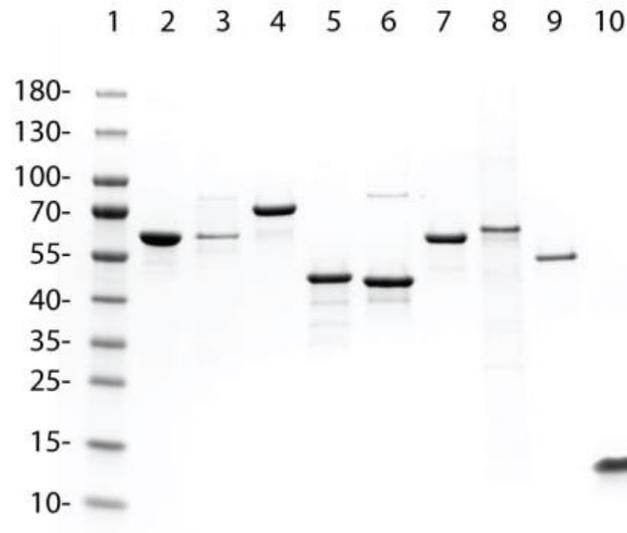
**This PDF file includes:**

Figures S1 to S3

Tables S2, S5 and S6

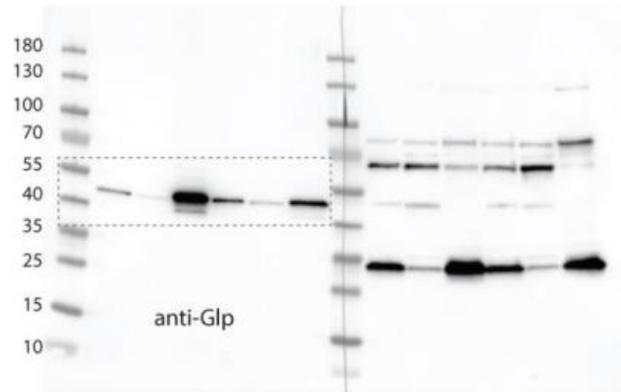
Supplementary References

Note: Tables S1, S3 and S4 are provided separately as an excel file

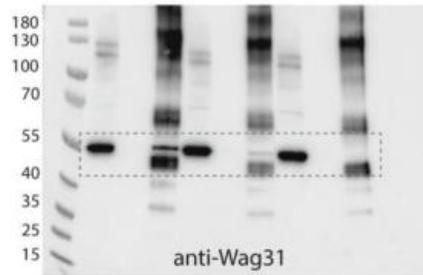


**Figure S1. SDS-PAGE on a 4-20% polyacrylamide gel of all purified recombinant proteins used in this work.** Lane 1: Molecular weight ladder (kDa); lane 2: His-Sumo-GLP (56.3 kDa); lane 3: His-Sumo-GLP<sub>Δloop</sub> (55.1 kDa); lane 4: His-Sumo-FtsZ (59.2 kDa); lane 5: GLP (44.2 kDa); lane 6: GLP<sub>Δloop</sub> (43 kDa); lane 7: FtsZ (47.2 kDa); lane 8: His-GLPR (40.7 kDa); lane 9: Wag31 (38.7 kDa); lane 10: Wag31<sub>1-61</sub> (7.1 kDa). Equivalent migration profiles have been obtained at least three times.

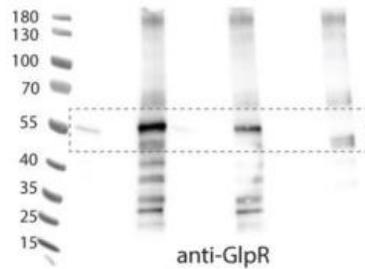
Corresponds to Figure 3c



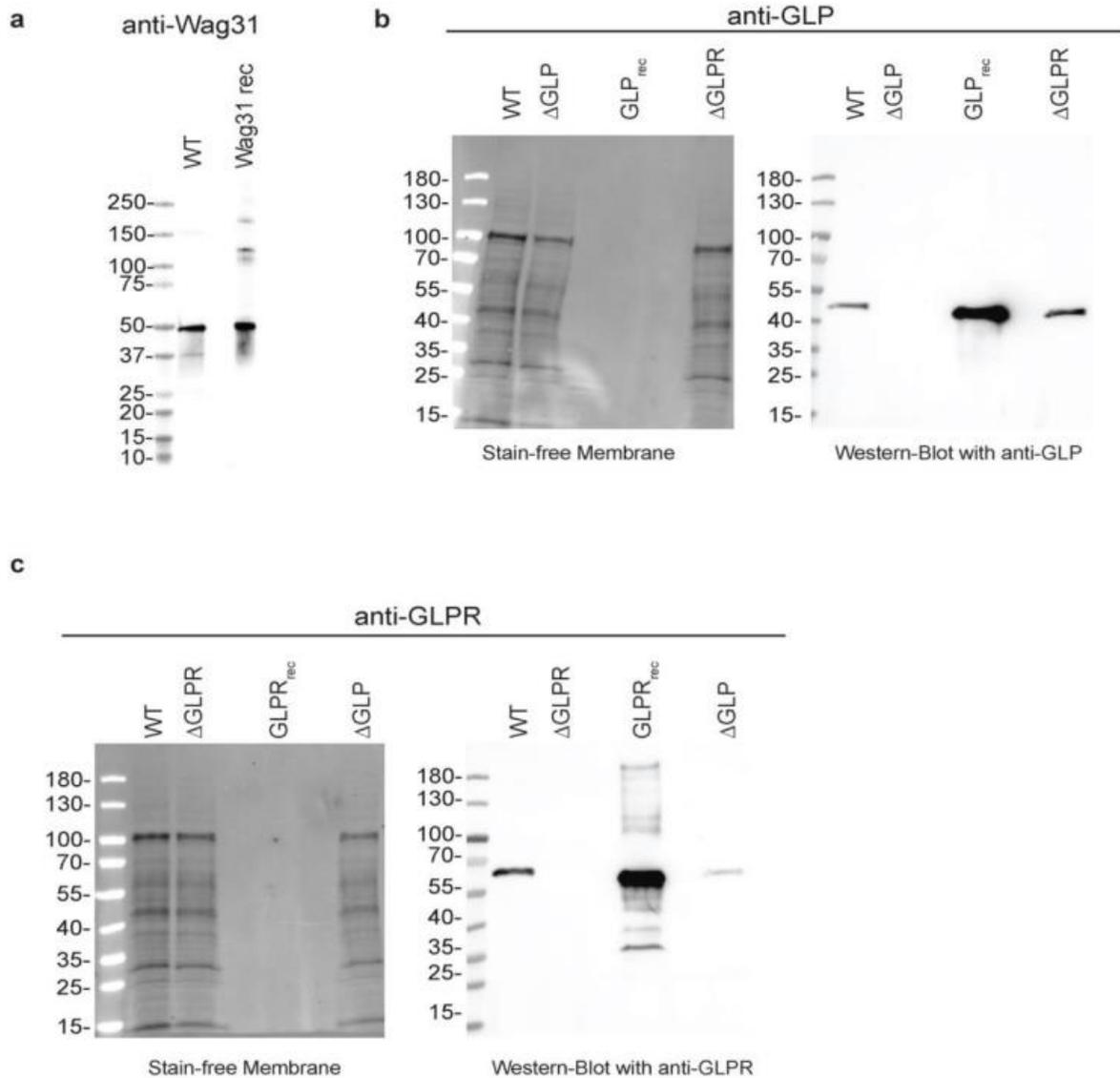
Corresponds to Figure 4g



Corresponds to Figure 4g



**Figure S2. Full uncropped Western Blots of all cropped analyses shown in this work.** The boxes correspond to the crops used in the named figures. In Figure 4g, background signals in elution fractions corresponds to the anti-GLPR rabbit antibodies used for the co-IP, which are recognized by the secondary anti-rabbit antibodies used to reveal the Western Blot. Molecular weight markers (kDa) are shown on the left of each blot.



**Figure S3. Antibody characterization.** (a) Western blot of whole cell extracts (120  $\mu$ g) from *Cglu* strain. Wag31 levels were revealed using the  $\alpha$ -DivIVA antibody. 10 ng of recombinant Wag31 were loaded as positive control. (b) Stain-free image and Western blot of whole cell extracts (120  $\mu$ g) from *Cglu*, *Cglu\_ΔGlp* and *Cglu\_Δglpr* strains. Cell lysates were separated on a Criterion TGX Stain-Free SDS gel, transferred onto a Nitrocellulose membrane using the Trans-Blot Turbo Transfer System, and imaged with the ChemiDoc MP imaging system. GLP levels were revealed using the  $\alpha$ -GLP antibody. 10 ng of recombinant GLP were loaded as positive control. (c) Stain-free image and Western blot of whole cell extracts (120  $\mu$ g) from *Cglu*, *Cglu\_ΔGlp* and *Cglu\_Δglpr* strains. Cell lysates were separated on a Criterion TGX Stain-Free SDS gel, transferred onto a Nitrocellulose membrane using the Trans-Blot Turbo Transfer System, and imaged with the ChemiDoc MP imaging system. GLPR levels were revealed using the  $\alpha$ -GLPR antibody. 10 ng of recombinant GLPR were loaded as positive control. Equivalent Blots have been obtained at least 3 times. Molecular weight markers (kDa) are shown on the left of each blot.

**Table S1. Interactomic data.** (a) SepF interactome, (b) differential interactome SepF<sub>K125E/F131A</sub> vs SepF (or derivatives), (c) GLP interactome in wild-type *Cglu* background, (d) GLP interactome in *Cglu\_Δglpr* background.

See separate Excel Table

**Table S2.** Crystallographic data collection and refinement statistics.

<b>Data collection</b>	<b>GLP Cl<sub>4</sub>K<sub>2</sub>Pt derivative</b>	<b>GLP</b>	<b>GLP FtsZ-CTD</b>
Synchrotron Beamline	SOLEIL Proxima 1	SOLEIL Proxima 2A	SOLEIL Proxima 2A
Wavelength (Å)	1.0720	0.9801	0.9801
Space group	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Cell dimensions <i>a, b, c</i> (Å)	94.46, 94.46, 230.61	94.44, 94.44, 230.56	95.58, 95.58, 229.52
Resolution (Å)	49.2 – 2.35 (2.41 – 2.35) *	49.2 – 2.14 (2.19 – 2.14)	49.2 – 2.68 (2.81 – 2.68)
<i>R</i> <sub>pim</sub>	0.018 (0.186)	0.023 (0.352)	0.050 (0.296)
<i>I</i> / <i>s</i> ( <i>I</i> )	26.8 (3.9)	21.1 (2.2)	14.6 (2.7)
Completeness (%)	99.7 (96.8)	99.7 (96.2)	99.6 (97.1)
CC(1/2)	1.0 (0.92)	1.0 (0.777)	0.997 (0.800)
Multiplicity	26.8 (26.6)	26.4 (25.0)	9.6 (9.7)
Total observations	1197065	1551838	251139
Unique observations	44612 (3156)	58764 (4332)	30746 (3905)
<b>Refinement</b>			
Resolution (Å)		2.14	2.68
No. reflections			
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)		0.191 / 0.223	0.190 / 0.239
No. atoms			
Protein		5823	5959
Ligands/ions		-	-
Solvent		457	234
Average B-factors (Å <sup>2</sup> )			
Protein		49	42
Ligand/ions		-	-
Solvent		57	50
R.m.s deviations			
Bond lengths (Å)		0.007	0.004
Bond angles (°)		0.876	0.663
Ramachandran favored (%)		98.0	98.6
Ramachandran outliers (%)		0	0.25
<b>PDB code</b>		8BVE	8BVF

\*Values in parenthesis correspond to the highest resolution shell.

**Table S3. Taxonomic sampling of Actinobacteria and protein identifiers of GLP, GLPR and MoeA paralogs.** Protein identifiers correspond to the NCBI GenBank database. “NA” indicates that the protein was not identified in the corresponding genome.

See separate Excel Table

**Table S4. Taxonomic sampling of Bacteria and protein identifiers of MoeA paralogs.** Protein identifiers correspond to the NCBI GenBank database. “NA” indicates that the protein was not identified in the corresponding genome.

See separate Excel Table

**Table S5. Plasmids and strains used in this study.**

Strains	Characteristics	Reference
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	F- endA1 $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 relA1 hsdR17(rK-mK+) deoR supE44 thi-1 gyrA96 phoA $\lambda$ -; strain used for general cloning procedures	<sup>1</sup>
CopyCutter EPI400	F- mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 endA1 araD139 $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK $\lambda$ - rpsL (StrR) nupG trfA tonA pcnB4 dhfr; strain used for general cloning procedures	<sup>2</sup>
BL21(DE)	F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3); host for protein production	<sup>3</sup>
<b><i>C. glutamicum</i></b>		
ATCC 13032	Biotin-auxotrophic wild type	<sup>4</sup>
$\Delta$ GLP	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 derivative with chromosomal deletion of GLP	This work
$\Delta$ GLPR	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 derivative with chromosomal deletion of GLPR	This work

Plasmids for <i>C. glutamicum</i> knock out generation		Reference
<i>pK19mobsacB</i>	KanaR; plasmid for allelic exchange in <i>C. glutamicum</i> ; (pK18 oriVec, sacB, lacZ $\alpha$ )	<sup>5</sup>
pk19- $\Delta$ GLP	KanaR; pK19mobsacB derivative for GLP chromosomal deletion	This work
pk19- $\Delta$ GLPR	KanaR; pK19mobsacB derivative for GLPR chromosomal deletion	This work

Plasmids for recombinant protein expression in <i>E. coli</i>		Reference
pET-SUMO-FtsZ	KanaR; pET derivate for <i>C. glutamicum</i> FtsZ recombinant expression containing a N-terminal His-tag followed by a SUMO protease cleavage site	<sup>6</sup>
pET-SUMO-GLP	KanaR; pET derivate for <i>C. glutamicum</i> GLP recombinant expression containing a N-terminal His-tag followed by a SUMO protease cleavage site	This work
pET-SUMO-GLP $\Delta$ Loop	KanaR; pET derivate for <i>C. glutamicum</i> GLP $\Delta$ Loop mutant recombinant expression containing a N-terminal His-tag followed by a SUMO protease cleavage site	This work
pET-SUMO-Wag31	KanaR; pET derivate for <i>C. glutamicum</i> Wag31 recombinant expression containing a N-terminal His-tag followed by a SUMO protease cleavage site	This work
pET-His-TEV-Wag31	KanaR; pET derivate for <i>C. glutamicum</i> Wag31 recombinant expression containing a N-terminal His-tag followed by a TEV protease cleavage site	This work
pET-His-TEV-Wag31 $_{1-61}$	KanaR; pET derivate for <i>C. glutamicum</i> N-terminal DivIVA domain of Wag31 (1-61) recombinant expression containing a N-terminal His-tag followed by a TEV protease cleavage site	This work
pET-SUMO-GLPR $_{IDR1}$	KanaR; pET derivate for the recombinant expression of GLPR IDR1 domain (24-214) containing a N-terminal His-tag followed by a SUMO protease cleavage site.	This work
pET-His-GLPR	AmpR; pET derivate for the recombinant expression of GLPR containing a N-terminal His-tag followed by a TEV protease cleavage site	This work

pET-GLPR-His	KanaR; pET derivative for the recombinant expression of GLPR containing a C-terminal His-tag.	This work
--------------	---	-----------

<b>Plasmids for recombinant protein expression in <i>C. glutamicum</i>.</b>		<b>Reference</b>
<i>pTGR5</i>	KanaR; <i>E. coli/C. glutamicum</i> shuttle vector for regulated gene expression of EGFP under control of tac promoter (Ptac lacI ColE1 oriVEc pGA1 oriVCg)	<sup>7</sup>
<i>pUMS3</i>	KanaR; <i>pTGR5</i> derivative in which <i>Ptac</i> was exchanged by <i>PgntK</i> promoter to control the expression of the EGFP protein	<sup>6</sup>
<i>pUMS3-PgntK</i>	KanaR; <i>pUMS3</i> derivative containing <i>PgntK</i> promoter (empty plasmid)	This work
<i>pUMS3-sepF-scarlet</i>	KanaR; <i>pUMS3</i> derivative for expression of SepF-Scarlet under control of <i>PgntK</i> promoter	<sup>6</sup>
<i>pUMS3-sepF<sub>K125/F131A</sub>-scarlet</i>	KanaR; <i>pUMS3</i> derivative for expression of SepF <sub>K125E-F131A</sub> -Scarlet mutant under control of <i>PgntK</i> promoter	<sup>6</sup>
<i>pUMS3-Scarlet-I</i>	KanaR; <i>pUMS3</i> derivative for expression of Scarlet-I fluorescent protein under control of <i>PgntK</i> promoter	<sup>6</sup>
<i>pUMS3-GLP</i>	KanaR; <i>pUMS3</i> derivative for expression of GLP under control of <i>PgntK</i> promoter	This work
<i>pUMS3-mNeon-GLP</i>	KanaR; <i>pUMS3</i> derivative for expression of mNeonGreen-GLP under control of <i>PgntK</i> promoter	This work
<i>pUMS3-mNeon-GLP<sub>ΔLoop</sub></i>	KanaR; <i>pUMS3</i> derivative for expression of mNeonGreen-GLP <sub>ΔLoop</sub> under control of <i>PgntK</i> promoter	This work
<i>pUMS3-GLPR-mNeon</i>	KanaR; <i>pUMS3</i> derivative for expression of GLPR-mNeonGreen under control of <i>PgntK</i> promoter	This work
<i>pUMS3-GLPR</i>	KanaR; <i>pUMS3</i> derivative for expression of GLPR under control of <i>PgntK</i> promoter	This work
<i>pUMS3-GLPR<sub>ΔIDR2</sub> (1-266)</i>	KanaR; <i>pUMS3</i> derivative for expression of GLPR with a deletion of the C-terminal IDR2 region under control of <i>PgntK</i> promoter	This work
<i>pUMS3-mNeon-MoeA1</i>	KanaR; <i>pUMS3</i> derivative for expression of mNeonGreen-MoeA1 under control of <i>PgntK</i> promoter	This work
<i>pUMS3-mNeon-MoeA3</i>	KanaR; <i>pUMS3</i> derivative for expression of mNeonGreen-MoeA3 under control of <i>PgntK</i> promoter	This work

**Table S6. Oligonucleotide primers used in this study.**

Oligonucleotide	Sequence 5' -->3' and properties <sup>a</sup>
<b>Plasmids for <i>C. glutamicum</i> knock out generation</b>	
<b>pk19-ΔGLP</b>	
OligoAS_p68	TGAGCGGATAACAATTCAC
OligoAS_p69	CAATCCACACAACATACG
OligoAS_p207	<b>TGTTGTGTGGAATTGCTTGCACACTTTGAGCGTTCTTC</b>
OligoAS_p208	<b>TTACGCATCGAATACGGACCTCCTAATCGGAAC</b>
OligoAS_p209	<b>CCGTATTCGATGCGTAATGCACCGTC</b>
OligoAS_p210	<b>AATTGTTATCCGCTCAGCAGATTTCTAATGAGATAGCCTTCTGG</b>
<b>pk19-ΔGLPR</b>	
OligoAS_p68	TGAGCGGATAACAATTCAC
OligoAS_p69	CAATCCACACAACATACG
OligoAS_p216	<b>TGTTGTGTGGAATTGATAAGGAATTCCTCAAGCCCGT</b>
OligoAS_p217	<b>CTTACCCTGTGGCTAACCTTCCCGTACGGGTGC</b>
OligoAS_p218	<b>GTTAGCCACAGGGTAAGGTTTCGGACTA</b>
OligoAS_p219	<b>AATTGTTATCCGCTCACTGGGAAGTCATACTTCTTGTCCAC</b>
<b>Oligonucleotides for KO screening</b>	
OligoAS_p211	CCTATCGATGAGCACGTGAA
OligoAS_p212	ATGCTTCTCCAGCCTTAGCA
OligoAS_p220	GCACCTATTGGCAGGATTGT
OligoAS_p221	TTCCACATAACCGAGGAAC

<b>Plasmids for recombinant protein expression in <i>E. coli</i></b>	
<b>pET-SUMO-GLP</b>	
OligoAS_P1	<b>AGATCCGGCTGCTAACAAGCCCGAAAG</b>
OligoAS_P2	<b>GAGGCTCACCGAACAGATTGGTGGC</b>
OligoAS_p169	<b>CGAACAGATTGGTGGCGTGCATCAGTCGAGCAAC</b>
OligoAS_p170	<b>GTTAGCAGCCGGATCTCTATCGACCTTGGGCAAGGAA</b>
<b>pET-SUMO-GLP<sub>ΔLoop</sub></b>	
OligoMM_372	<b>CATCAGGTCAGGCTCGGTGTGGAGGCTTTGGGTGGTGAACGGGCGCACCATCGCACCTATTGGCA</b>
OligoMM_373	<b>CAAAGCCTCCACACCGAGCCTGGACCTGATGAAACCTTTTCGACCCGCCACAGACACAAC</b>

<b>pET-SUMO-Wag31</b>	
OligoMM_378	GCCACCAATCTGTTTCGCGGTGAGCCTC
OligoMM_379	AGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAG
OligoMM_403	TCACCGCGAACAGATTGGTGGCATGCCGTTGACTCCAGCTGATG
OligoMM_404	GGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTTTACTCACCAGATGGCTTGTGTTGGTTGGTG
<b>pET-His-TEV-Wag31<sub>1-61</sub></b>	
P1_JP	ATATGTTATTACGCAACCTGCGCTCCAG
P2_JP	TAATAACATATGGCTAGCATGACTGGTGGAC
<b>pET-SUMO-GLPR<sub>IDR1</sub></b>	
OligoMM_392	ATGTTCCGCCGCGCTAATTAACCTAGGCTGCTGCCAC
OligoMM_393	GCAATGGGCTTTTGGCCTCGGCCACCAATCTGTTTCGCGGT
OligoMM_394	ACCGCGAACAGATTGGTGGCCGAGGCCAAAAGCCCATTGC
OligoMM_395	GTGGCAGCAGCCTAGGTTAATTAGCGCTGGCGGCGAACAT
<b>pET-GLPR-His</b>	
OligoMM_389	CTTAAAGAAGGAGATATACCATGTCCGGAATCCTTGTGATCG
OligoMM_390	GTGGCAGCAGCCTAGGTTAATCAGTGGTGGTGGTGGTGGT
OligoMM_388	ATCACAAGGATTCCGGACATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAA
OligoMM_391	ACCACCACCACCACCTGATTAACCTAGGCTGCTGCCAC
<b>pET-His-GLPR</b>	
OligoPB_9	GGATCCGGCAGCTGGAGCCA
OligoPB_10	TCCCTGAAAATACAGGTTTTCCGATCC
OligoMM_399	GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGAATGTCCGGAATCCTTGTGATCGGC
OligoMM_400	TGGCTCCAGCTGCCGGATCCTTAGCTCACGCGACGCTGACCCAG

<b>Plasmids for recombinant protein expression in <i>C. glutamicum</i>.</b>	
<b>pUMS3-mNeon-GLP</b>	
OligoMM_178	ATGGTCTTATCCTTTCTTTGGTGGC
OligoMM_179	AGCGGCCGCTTAAGGTAC
OligoMM_286	CAAAGAAAGGATAAGACCATATGGGTCATCACCATCATCATCACATGGTGTCCAAGGGCG AAG
OligoMM_306	TGAGCCAGATCCCTTGTACAGTTCATCCATGCCATC
OligoMM_305	AACTGTACAAGGGATCTGGCTCAATGCGATCAGTCGAGCA
OligoMM_311	GTACCTTAAGCGGCCGCTCTATCGACCTTGGGCAAGGAAGA

<b>pUMS3-mNeon-GLP<sub>ΔLoop</sub></b>	
OligoMM_372	<b>CATCAGGTCCAGGCTCGGTGTGGAGGCTTTGGGTGGTGCAACGGGCGCACCATCGCACCT</b> ATTGGCA
OligoMM_373	<b>CAAAGCCTCCACACCGAGCCTGGACCTGATG</b> AAACCTTTTCGACCCGCCACAGACACAAC
<b>pUMS3-GLPR-mNeon</b>	
OligoMM_178	<b>ATGGTCTTATCCTTTCTTTGGTGGC</b>
OligoMM_353	<b>GGAAGCGGCAGCATGGTGTCCAAGGGCGAAG</b>
OligoMM_354	<b>CGCCACCAAAGAAAGGATAAGACCATATGTCCGGAATCCTTGTGATCGGCCTGATTGTGG</b> TGGTGTGGCTTGTGT
OligoMM_355	<b>GACACCATGCTGCCGCTTCCGCTCACGCGACGCTGACCCAGGTGTGCAATGTTTCGACGTG</b> GCTCCTCGTAG
<b>pUMS3-GLPR</b>	
OligoMM_374	<b>GGACACCATGCTGCCGCTTAGCTCACGCGACGCTGACCCAG</b>
OligoMM_375	<b>CGCGTGAGCTAAAGCGGCAGCATGGTGTCCAAGGGCGAAGAG</b>
<b>pUMS3-GLPR<sub>ΔIDR2</sub></b>	
OligoMM_396	<b>GCTCTTCGCTAACGTGCAATCCG</b> CAGGCTCCGCCGCTC
OligoMM_397	<b>CGGATTCGACGTTAGCGAAGAGCATTCTCCTCACGAACCTG</b>
<b>pUMS3-mNeon-MoeA1</b>	
OligoMM_179	<b>AGCGGCCGCTTAAGGTAC</b>
OligoMM_306	<b>TGAGCCAGATCCCTTGTACAGTTCATCCATGCCCATC</b>
OligoMM_358	<b>TGTACAAGGGATCTGGCTCAATGTCTCGTTCGCCGGAGCAAC</b>
OligoMM_359	<b>GTACCTTAAGCGGCCGCTTAGTTGAATGGGTAAATCTTAACGATGTCGTTTTCTC</b>
<b>pUMS3-mNeon-MoeA3</b>	
OligoMM_179	<b>AGCGGCCGCTTAAGGTAC</b>
OligoMM_306	<b>TGAGCCAGATCCCTTGTACAGTTCATCCATGCCCATC</b>
OligoMM_360	<b>GAACTGTACAAGGGATCTGGCTCAATGGCACAGCAACGCAGCG</b>
OligoMM_361	<b>GTACCTTAAGCGGCCGCTTACATTCTCCCAGCACAAACATCAACCAGAC</b>
<b>pUMS3-GLP</b>	
OligoMM_178	<b>ATGGTCTTATCCTTTCTTTGGTGGC</b>
OligoMM_179	<b>AGCGGCCGCTTAAGGTAC</b>
OligoMM_310	<b>CCACCAAAGAAAGGATAAGACCATATGCGATCAGTCGAGCAACAGC</b>
OligoMM_311	<b>GTACCTTAAGCGGCCGCTCTATCGACCTTGGGCAAGGAAGA</b>

<sup>a</sup>Overlaps for Gibson assembly are written in bold letters.

**Supplementary References:**

1. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580 (1983).
2. D, H. *Epicentre Forum* 11, 6 (2004).
3. Studier, F. W. & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113–130 (1986).
4. Shimono, S. K. S. U. M. Studies on the amino acid fermentation. *J Gen Appl Microbiol* 3, (1957).
5. Schäfer, A. *et al.* Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69–73 (1994).
6. Sogues, A. *et al.* Essential dynamic interdependence of FtsZ and SepF for Z-ring and septum formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun* 11, 1641 (2020).
7. Ravasi, P., Peiru, S., Gramajo, H. & Menzella, H. G. Design and testing of a synthetic biology framework for genetic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact* 11, 147–147 (2012).

## 5. Conclusiones generales

El objetivo general de este trabajo estuvo orientado a optimizar y aplicar aproximaciones proteómicas cuantitativas no dirigidas para comprender procesos biológicos de interés biomédico.

En el capítulo I de esta tesis, la aplicación de abordajes proteómicos no dirigidos a nivel del tejido adiposo subcutáneo total y mitocondrial permitió identificar a la termogénesis dependiente de creatina como el mecanismo de acción por el cual el SANA ejerce sus efectos metabólicos. El análisis del proteoma comparativo de mitocondrias de iWAT nos permitió identificar marcadores del metabolismo de un carbono como parte de la repuesta termogénica dependiente de creatina mediada por el SANA, lo cual fue posteriormente confirmado mediante el análisis de los niveles de expresión de ARNm. Asimismo, utilizando un modelo murino de repuesta al frío (estímulo termogénico), se pudo evidenciar que en condiciones fisiológicas, sin tratamiento farmacológico, esta vía está activa tanto en el tejido adiposo como en el hígado de los animales.

Para identificar blancos moleculares involucrados en el mecanismo de acción del SANA, utilizamos una estrategia interactómica de AP-MS usando como cebo su análogo biotinilado. De esta manera, identificamos las creatina quinasas CKMT1/2 como las principales proteínas de unión al SANA en el tejido adiposo marrón y demostramos que el SANA es capaz de modificar preferentemente la Cys<sub>238</sub> de CKMT2 murina recombinante *in vitro* de manera covalente.

En el capítulo II de esta tesis, la aplicación de estrategias proteómicas similares, pero enfocadas en la identificación de interactores, nos permitió reportar a las proteínas Glp y GlpR como dos nuevos componentes de la maquinaria de división celular de los *Corynebacteriales*.

A lo largo de este trabajo de tesis utilizamos herramientas basadas en espectrometría de masa para poder resolver preguntas que surgen del estudio de dos problemas biomédicos diferentes que no pudieron ser abordados mediante estrategias guiadas por hipótesis.

***Esta tesis pone de manifiesto la potencia de la proteómica cuantitativa, controlada y no sesgada para la identificación de vías, blancos e interactores moleculares involucrados en los procesos biológicos estudiados.***

## 6. Referencias bibliográficas

1. Nugent, R. & Fottrell, E. Non-communicable diseases and climate change: linked global emergencies. *Lancet* **394**, 622–623 (2019).
2. Noncommunicable diseases. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>.
3. Nishtar, S. *et al.* Time to deliver: report of the WHO Independent High-Level Commission on NCDs. *Lancet* **392**, 245–252 (2018).
4. Chan, W. K. *et al.* Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD): A State-of-the-Art Review. *J. Obes. Metab. Syndr.* **32**, 197 (2023).
5. Chew, N. W. S. *et al.* The global burden of metabolic disease: Data from 2000 to 2019. *Cell Metab.* **35**, 414-428.e3 (2023).
6. Abbafati, C. *et al.* Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet (London, England)* **396**, 1204–1222 (2020).
7. Prevención de la obesidad - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/temas/prevencion-obesidad>.
8. Primeros resultados de la Encuesta de Nutrición, Desarrollo Infantil y Salud cohorte 2018 | MIDES. <https://www.gub.uy/ministerio-desarrollo-social/comunicacion/publicaciones/primeros-resultados-encuesta-nutricion-desarrollo-infantil-salud-cohorte>.
9. Sobrepeso y obesidad | MSP. <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/noticias/sobrepeso-y-obesidad>.
10. Ama. Report of the Council on Science and Public Health - Report 3-A-13.
11. Hudzik, B. *et al.* Discordance between Body-Mass Index and Body Adiposity Index in the Classification of Weight Status of Elderly Patients with Stable Coronary Artery Disease. *J. Clin. Med.* **10**, 1–12 (2021).
12. Gadde, K. M., Martin, C. K., Berthoud, H. R. & Heymsfield, S. B. Obesity: Pathophysiology and Management. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 69–84 (2018).
13. Lin, X. & Li, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **12**, (2021).
14. McAllister, E. J. *et al.* Ten Putative Contributors to the Obesity Epidemic. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 868 (2009).
15. Müller, T. D., Blüher, M., Tschöp, M. H. & DiMarchi, R. D. Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021 213 **21**, 201–223 (2021).
16. Müller, T. D., Clemmensen, C., Finan, B., Dimarchi, R. D. & Tschöp, M. H. Anti-Obesity Therapy: from Rainbow Pills to Polyagonists. *Pharmacol. Rev.* **70**, 712–746 (2018).
17. Goldfine, A. B. *et al.* Use of Salsalate to Target Inflammation in the Treatment of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Clin. Transl. Sci.* **1**, 36 (2008).
18. Bray, M. S. *et al.* NIH working group report—using genomic information to guide weight management: From universal to precision treatment. *Obesity (Silver Spring)*. **24**, 14 (2016).
19. Rohde, K. *et al.* Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism* **92**, 37–50 (2019).
20. Cordero, P., Li, J. & Oben, J. A. Epigenetics of obesity: Beyond the genome sequence. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **18**, 361–366 (2015).
21. Fall, T., Mendelson, M. & Speliotes, E. K. Recent Advances in Human Genetics and

- Epigenetics of Adiposity: Pathway to Precision Medicine? *Gastroenterology* **152**, 1695–1706 (2017).
22. Locke, A. E. *et al.* Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nat. 2015 5187538* **518**, 197–206 (2015).
  23. Berthoud, H. R., Münzberg, H. & Morrison, C. D. Blaming the Brain for Obesity: Integration of Hedonic and Homeostatic Mechanisms. *Gastroenterology* **152**, 1728–1738 (2017).
  24. Rajamoorthi, A., LeDuc, C. A. & Thaker, V. V. The metabolic conditioning of obesity: A review of the pathogenesis of obesity and the epigenetic pathways that “program” obesity from conception. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **13**, 1032491 (2022).
  25. Periasamy, M., Herrera, J. L. & Reis, F. C. G. Skeletal Muscle Thermogenesis and Its Role in Whole Body Energy Metabolism. *Diabetes Metab. J.* **41**, 327–336 (2017).
  26. Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med. 2013 1910* **19**, 1252–1263 (2013).
  27. Cohade, C., Osman, M., Pannu, H. K. & Wahl, R. L. Uptake in Supraclavicular Area Fat (“USA-Fat”): Description on 18F-FDG PET/CT. *J. Nucl. Med.* **44**, 170 LP – 176 (2003).
  28. Cohen, P. & Kajimura, S. The cellular and functional complexity of thermogenic fat. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2021 226 **22**, 393–409 (2021).
  29. Ukropec, J., Anunciado, R. P., Ravussin, Y., Hulver, M. W. & Kozak, L. P. UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue of cold-acclimated Ucp1<sup>-/-</sup> mice. *J. Biol. Chem.* **281**, 31894–31908 (2006).
  30. Ikeda, K. *et al.* UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nat. Med.* **23**, 1454–1465 (2017).
  31. Long, J. Z. *et al.* The secreted enzyme PM20D1 regulates lipidated amino acid uncouplers of mitochondria. *Cell* **166**, 424 (2016).
  32. Rahbani, J. F. *et al.* CKB controls futile creatine cycling in thermogenic fat HHS Public Access. *Nature* **590**, 480–485 (2021).
  33. Sun, Y. *et al.* Mitochondrial TNAP controls thermogenesis by hydrolysis of phosphocreatine. *Nat.* 2021 5937860 **593**, 580–585 (2021).
  34. Bariatric surgery - Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/bariatric-surgery/about/pac-20394258>.
  35. Eisenberg, D. *et al.* 2022 American Society for Metabolic and Bariatric Surgery (ASMBS) and International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders (IFSO): Indications for Metabolic and Bariatric Surgery. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **18**, 1345–1356 (2022).
  36. Robinson, M. K. Surgical treatment of obesity--weighing the facts. *N. Engl. J. Med.* **361**, 520–521 (2009).
  37. Sjöström, L. *et al.* Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N. Engl. J. Med.* **357**, 741–752 (2007).
  38. Wilson, R., Aminian, A. & Tahrani, A. A. Metabolic surgery: A clinical update. *Diabetes, Obes. Metab.* **23**, 63–83 (2021).
  39. Rubino, F. *et al.* Metabolic Surgery in the Treatment Algorithm for Type 2 Diabetes: A Joint Statement by International Diabetes Organizations. *Diabetes Care* **39**, 861–877 (2016).
  40. Albaugh, V. L. *et al.* Regulation of body weight: Lessons learned from bariatric surgery.
-

- Mol. Metab.* **68**, 101517 (2023).
41. Khera, R. *et al.* Association of Pharmacological Treatments for Obesity With Weight Loss and Adverse Events: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* **315**, 2424–2434 (2016).
  42. Michałowska, J., Miller-Kasprzak, E. & Bogdański, P. Incretin Hormones in Obesity and Related Cardiometabolic Disorders: The Clinical Perspective. *Nutrients* **13**, 1–32 (2021).
  43. Hayes, M. R., Miettlicki-Baase, E. G., Kanoski, S. E. & De Jonghe, B. C. Incretins and Amylin: Neuroendocrine Communication between the Gut, Pancreas, and Brain in Control of Food Intake and Blood Glucose. *Annu. Rev. Nutr.* **34**, 237 (2014).
  44. Wilding, J. P. H. *et al.* Once-Weekly Semaglutide in Adults with Overweight or Obesity. *N. Engl. J. Med.* **384**, 989–1002 (2021).
  45. Jastreboff, A. M. *et al.* Tirzepatide Once Weekly for the Treatment of Obesity. *N. Engl. J. Med.* **387**, 205–216 (2022).
  46. Chakhtoura, M. *et al.* Pharmacotherapy of obesity: an update on the available medications and drugs under investigation. *eClinicalMedicine* **58**, 101882 (2023).
  47. Khoo, N. K. H. & Freeman, B. A. Electrophilic nitro-fatty acids: anti-inflammatory mediators in the vascular compartment. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 179–184 (2010).
  48. Groeger, A. L. *et al.* Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 433 (2010).
  49. Goss, S. P. A., Hogg, N. & Kalyanaraman, B. The antioxidant effect of spermine NONOate in human low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 800–806 (1995).
  50. Hogg, N. *et al.* Inhibition of macrophage-dependent low density lipoprotein oxidation by nitric-oxide donors. *J. Lipid Res.* **36**, 1756–1762 (1995).
  51. Bonacci, G. *et al.* Conjugated Linoleic Acid Is a Preferential Substrate for Fatty Acid Nitration. *J. Biol. Chem.* **287**, 44071–44082 (2012).
  52. Vitturi, D. A. *et al.* Convergence of biological nitration and nitrosation via symmetrical nitrous anhydride. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 504–510 (2015).
  53. Kalyanaraman, S. Nitrated lipids: A class of cell-signaling molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 11527–11528 (2004).
  54. Rubbo, H. *et al.* Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 15–25 (1995).
  55. Rubbosi, H. *et al.* THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Nitric Oxide Regulation of Superoxide and Peroxynitrite-dependent Lipid Peroxidation FORMATION OF NOVEL NITROGEN-CONTAINING OXIDIZED LIPID DERIVATIVES\*. *J. Biol. Chem.* **269**, 26066–26075 (1994).
  56. O'Donnell, V. B. *et al.* Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry* **36**, 15216–15223 (1997).
  57. Napolitano, A., Camera, E., Picardo, M. & D'Ischia, M. Acid-promoted reactions of ethyl linoleate with nitrite ions: Formation and structural characterization of isomeric nitroalkene, nitrohydroxy, and novel 3-nitro-1,5-hexadiene and 1,5-dinitro-1,3-pentadiene products. *J. Org. Chem.* **65**, 4853–4860 (2000).
  58. Napolitano, A., Camera, E., Picardo, M. & D'Ischia, M. Reactions of hydro(pero)xy derivatives of polyunsaturated fatty acids/esters with nitrite ions under acidic conditions.
-

- Unusual nitrosative breakdown of methyl 13-hydro(pero)xyoctadeca-9,11-dienoate to a novel 4-nitro-2-oximinoalk-3-enal product. *J. Org. Chem.* **67**, 1125–1132 (2002).
59. Baker, P. R. S. *et al.* Fatty Acid Transduction of Nitric Oxide Signaling: MULTIPLE NITRATED UNSATURATED FATTY ACID DERIVATIVES EXIST IN HUMAN BLOOD AND URINE AND SERVE AS ENDOGENOUS PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR LIGANDS. *J. Biol. Chem.* **280**, 42464 (2005).
  60. Baker, P. R. S., Schopfer, F. J., Sweeney, S. & Freeman, B. A. Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11577–11582 (2004).
  61. Villacorta, L. *et al.* In situ generation, metabolism and immunomodulatory signaling actions of nitro-conjugated linoleic acid in a murine model of inflammation. *Redox Biol.* **15**, 522–531 (2018).
  62. Rudolph, V. *et al.* Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **85**, 155–166 (2010).
  63. Fazzari, M. *et al.* Electrophilic fatty acid nitroalkenes are systemically transported and distributed upon esterification to complex lipids. *J. Lipid Res.* **60**, 388 (2019).
  64. Schopfer, F. J. & Khoo, N. K. H. Nitro-Fatty Acid Logistics: Formation, Biodistribution, Signaling, and Pharmacology. *Trends Endocrinol. Metab.* **30**, 505 (2019).
  65. Lundberg, J. O., Carlström, M. & Weitzberg, E. Metabolic Effects of Dietary Nitrate in Health and Disease. *Cell Metab.* **28**, 9–22 (2018).
  66. Rudolph, V. *et al.* Nitro-fatty Acid Metabolome: Saturation, Desaturation,  $\beta$ -Oxidation, and Protein Adduction. *J. Biol. Chem.* **284**, 1461 (2009).
  67. Hernychova, L. *et al.* Serum albumin as a primary non-covalent binding protein for nitro-oleic acid. *Int. J. Biol. Macromol.* **203**, 116–129 (2022).
  68. Fazzari, M. *et al.* Nitro-fatty acid pharmacokinetics in the adipose tissue compartment. *J. Lipid Res.* **58**, 375–385 (2017).
  69. Salvatore, S. R., Rowart, P. & Schopfer, F. J. Mass spectrometry-based study defines the human urine nitrolipidome. *Free Radic. Biol. Med.* **162**, 327–337 (2021).
  70. Salvatore, S. R. *et al.* Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine. *J. Lipid Res.* **54**, 1998–2009 (2013).
  71. Batthyany, C. *et al.* Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J. Biol. Chem.* **281**, 20450–20463 (2006).
  72. Delmastro-Greenwood, M., Freeman, B. A. & Wendell, S. G. Redox-Dependent Anti-Inflammatory Signaling Actions of Unsaturated Fatty Acids. *Annu. Rev. Physiol.* **76**, 79 (2014).
  73. Ahmadian, M. *et al.* PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* **19**, 557–566 (2013).
  74. Schopfer, F. J. *et al.* Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2340–2345 (2005).
  75. Silverstein, R. L. & Febbraio, M. CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Sci. Signal.* **2**, re3 (2009).
  76. Cui, T. *et al.* Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J. Biol. Chem.* **281**, 35686–35698 (2006).
  77. Villacorta, L. *et al.* Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by
-

- disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc. Res.* **98**, 116 (2013).
78. Khoo, N. K. & Schopfer, F. J. Nitroated fatty acids: from diet to disease. *Curr. Opin. Physiol.* **9**, 67–72 (2019).
79. Kansanen, E. *et al.* Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: Identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J. Biol. Chem.* **284**, 33233–33241 (2009).
80. Knowlton, A. A. NFκB, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. *Cardiovasc. Res.* **69**, 7–8 (2006).
81. Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X. & Wang, W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021 61** **6**, 1–33 (2021).
82. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. Cellular responses to interferon-γ. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 749–795 (1997).
83. Ichikawa, T. *et al.* Nitroalkenes Suppress Lipopolysaccharide-Induced Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling in Macrophages: A Critical Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1. *Endocrinology* **149**, 4086–4094 (2008).
84. Ferreira, A. M. *et al.* Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem. J.* **417**, 223 (2009).
85. Khoo, N. K. H. *et al.* ACTIVATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE AND HEME OXYGENASE-1 EXPRESSION BY ELECTROPHILIC NITRO-FATTY ACIDS. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 230 (2010).
86. Bonacci, G. *et al.* Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *J. Biol. Chem.* **286**, 16074–16081 (2011).
87. Kelley, E. E. *et al.* Nitro-oleic Acid, a Novel and Irreversible Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **283**, 36176 (2008).
88. Charles, R. L. *et al.* Protection from hypertension in mice by the Mediterranean diet is mediated by nitro fatty acid inhibition of soluble epoxide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8167–8172 (2014).
89. Zhang, J. *et al.* Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension. *Circ. Res.* **107**, 540 (2010).
90. Asan, A. *et al.* Electrophilic fatty acids impair RAD51 function and potentiate the effects of DNA-damaging agents on growth of triple-negative breast cells. *J. Biol. Chem.* **294**, 397–404 (2019).
91. Hansen, A. L. *et al.* Nitro-fatty acids are formed in response to virus infection and are potent inhibitors of STING palmitoylation and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E7768–E7775 (2018).
92. Oduro, P. K. *et al.* The cGAS–STING signaling in cardiovascular and metabolic diseases: Future novel target option for pharmacotherapy. *Acta Pharm. Sin. B* **12**, 50–75 (2022).
93. Ni, H., Tan, X., Du, J. & Wang, Y. Nitro-fatty acids: mechanisms of action, roles in metabolic diseases, and therapeutics. *Curr. Med.* **2024 31** **3**, 1–23 (2024).
94. Cole, M. P. *et al.* Nitro-fatty acid inhibition of neointima formation after endoluminal vessel injury. *Circ. Res.* **105**, 965–972 (2009).
95. Liu, H. *et al.* Nitro-oleic acid protects the mouse kidney from ischemia and reperfusion injury. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **295**, F942 (2008).
96. Wang, H. *et al.* Nitro-oleic acid protects against endotoxin-induced endotoxemia and multiorgan injury in mice. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **298**, 754–762 (2010).
97. Rudolph, T. K. *et al.* Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient

- mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 938–945 (2010).
98. Liu, Y. *et al.* Combined losartan and nitro-oleic acid remarkably improves diabetic nephropathy in mice. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **305**, 1555–1562 (2013).
99. Arbeeny, C. M. *et al.* CXA-10, a nitrated fatty acid, is renoprotective in deoxycorticosterone acetate-salt nephropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **369**, 503–510 (2019).
100. Mollenhauer, M. *et al.* Nitro-fatty acids suppress ischemic ventricular arrhythmias by preserving calcium homeostasis. *Sci. Reports 2020 101* **10**, 1–11 (2020).
101. Braumann, S. *et al.* Nitro-oleic acid (No<sub>2</sub>-oa) improves systolic function in dilated cardiomyopathy by attenuating myocardial fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 9052 (2021).
102. Nettersheim, F. S. *et al.* Nitro-oleic acid reduces thoracic aortic aneurysm progression in a mouse model of Marfan syndrome. *Cardiovasc. Res.* **118**, 2211–2225 (2022).
103. Zhao, Y. *et al.* Suppression of Vascular Macrophage Activation by Nitro-Oleic Acid and its Implication for Abdominal Aortic Aneurysm Therapy. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **35**, 939–951 (2021).
104. Rom, O. *et al.* Nitro-fatty acids protect against steatosis and fibrosis during development of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *EBioMedicine* **41**, (2019).
105. Sánchez-Calvo, B. *et al.* Olive oil-derived nitro-fatty acids: protection of mitochondrial function in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Nutr. Biochem.* **94**, 108646 (2021).
106. Khoo, N. K. H. *et al.* Electrophilic nitro-oleic acid reverses obesity-induced hepatic steatosis. *Redox Biol.* **22**, 101132 (2019).
107. Kraakman, M. J. *et al.* PPAR $\gamma$  deacetylation dissociates thiazolidinedione's metabolic benefits from its adverse effects. *J. Clin. Invest.* **128**, 2600–2612 (2018).
108. Kelley, E. E. *et al.* Fatty acid nitroalkenes ameliorate glucose intolerance and pulmonary hypertension in high-fat diet-induced obesity. *Cardiovasc. Res.* **101**, 352–363 (2014).
109. Garner, R. M., Mould, D. R., Chieffo, C. & Jorkasky, D. K. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects of Oral CXA-10, a Nitro Fatty Acid, After Single and Multiple Ascending Doses in Healthy and Obese Subjects. *Clin. Transl. Sci.* **12**, 667–676 (2019).
110. Study Details | CXA-10 Study in Subjects With Pulmonary Arterial Hypertension | ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04053543>.
111. Study Details | FIRSTx - A Study of Oral CXA-10 in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) | ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03422510>.
112. Dapuelto, R. *et al.* A novel nitroalkene vitamin E analogue inhibits the NLRP3 inflammasome and protects against inflammation and glucose intolerance triggered by obesity. *Redox Biol.* **39**, 101833 (2021).
113. Rodriguez-Duarte, J. *et al.* A novel nitroalkene- $\alpha$ -tocopherol analogue inhibits inflammation and ameliorates atherosclerosis in Apo E knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 757 (2019).
114. Rodriguez-Duarte, J. *et al.* Electrophilic nitroalkene-tocopherol derivatives: synthesis, physicochemical characterization and evaluation of anti-inflammatory signaling responses. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
115. BATTHYANY DIGHIERO, C. I. & LOPEZ GONZALEZ, G. V. NITROALKENE TOCOPHEROLS AND ANALOGS THEREOF FOR USE IN THE TREATMENT AND PREVENTION OF INFLAMMATION RELATED CONDITIONS. (2015).
116. Ibarburu, S. *et al.* A Nitroalkene Benzoic Acid Derivative Targets Reactive Microglia and Prolongs Survival in an Inherited Model of ALS via NF- $\kappa$ B Inhibition. *Neurotherapeutics*
-

- 18**, 309 (2021).
117. Ding, P. & Ding, Y. Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends Plant Sci.* **25**, 549–565 (2020).
118. Hawley, S. A. *et al.* The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science* **336**, 918 (2012).
119. World Health Organization model list of essential medicines: 22nd list (2021). <https://iris.who.int/handle/10665/345533>.
120. Wu, K. K. Aspirin and Salicylate. *Circulation* **102**, 2022–2023 (2000).
121. Kopp, E. & Ghosh, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* **265**, 956–959 (1994).
122. Yin, M. J., Yamamoto, Y. & Gaynor, R. B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* **396**, 77–80 (1998).
123. Goldfine, A. B. *et al.* The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **152**, 346–357 (2010).
124. Fleischman, A., Shoelson, S. E., Bernier, R. & Goldfine, A. B. Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. *Diabetes Care* **31**, 289–294 (2008).
125. Kim, J. K. *et al.* Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J. Clin. Invest.* **108**, 437–446 (2001).
126. Alpert, D. & Vilček, J. Inhibition of IkappaB kinase activity by sodium salicylate in vitro does not reflect its inhibitory mechanism in intact cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 10925–10929 (2000).
127. Yuan, M. *et al.* Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* **293**, 1673–1677 (2001).
128. Smith, B. K. *et al.* Salsalate (Salicylate) Uncouples Mitochondria, Improves Glucose Homeostasis, and Reduces Liver Lipids Independent of AMPK-β1. *Diabetes* **65**, 3352–3361 (2016).
129. Galic, S. *et al.* Hematopoietic AMPK β1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. *J. Clin. Invest.* **121**, 4903–4915 (2011).
130. CARLING, D., CLARKE, P. R., ZAMMIT, V. A. & HARDIE, D. G. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur. J. Biochem.* **186**, 129–136 (1989).
131. Van Dam, A. D. *et al.* Salsalate activates brown adipose tissue in mice. *Diabetes* **64**, 1544–1554 (2015).
132. Nie, L. *et al.* Salsalate Activates Skeletal Muscle Thermogenesis and Protects Mice from High-Fat Diet Induced Metabolic Dysfunction. *EBioMedicine* **23**, 136–145 (2017).
133. Kajani, S. *et al.* Sodium salicylate rewires hepatic metabolic pathways in obesity and attenuates IL-1β secretion from adipose tissue: The implications for obesity-impaired reverse cholesterol transport. *Mol. Metab.* **56**, (2022).
134. Salastekar, N. *et al.* Salsalate Improves Glycemia in Overweight Persons With Diabetes Risk Factors of Stable Statin-Treated Cardiovascular Disease: a 30-month Randomized Placebo-Controlled Trial. *Diabetes. Obes. Metab.* **19**, 1458 (2017).
135. Goldfine, A. B. *et al.* Salicylate (salsalate) in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **159**, 1–12 (2013).
136. Mechanism matters. *Nat. Med.* 2010 164 **16**, 347–347 (2010).
137. Davis, R. L. Mechanism of Action and Target Identification: A Matter of Timing in Drug

- Discovery. *iScience* **23**, (2020).
138. Hughes, J. P., Rees, S. S., Kalindjian, S. B. & Philpott, K. L. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 1239–1249 (2011).
  139. Clatworthy, A. E., Romano, K. P. & Hung, D. T. Whole-organism phenotypic screening for anti-infectives promoting host health. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 331–341 (2018).
  140. Aulner, N., Danckaert, A., Ihm, J. E., Shum, D. & Shorte, S. L. Next-Generation Phenotypic Screening in Early Drug Discovery for Infectious Diseases. *Trends Parasitol.* **35**, 559–570 (2019).
  141. Meissner, F., Geddes-McAlister, J., Mann, M. & Bantscheff, M. The emerging role of mass spectrometry-based proteomics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **21**, 637–654 (2022).
  142. Renaud, J. P. *et al.* Biophysics in drug discovery: impact, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 679–698 (2016).
  143. Connelly, C. M., Moon, M. H. & Schneekloth, J. S. The Emerging Role of RNA as a Therapeutic Target for Small Molecules. *Cell Chem. Biol.* **23**, 1077 (2016).
  144. Xie, X. *et al.* Recent advances in targeting the “undruggable” proteins: from drug discovery to clinical trials. *Signal Transduct. Target. Ther.* **8**, 1–71 (2023).
  145. Bekker-Jensen, D. B. *et al.* An Optimized Shotgun Strategy for the Rapid Generation of Comprehensive Human Proteomes. *Cell Syst.* **4**, 587 (2017).
  146. Aebersold, R. & Mann, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* **537**, 347–355 (2016).
  147. Larance, M. & Lamond, A. I. Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 269–280 (2015).
  148. Fu, Q. *et al.* Highly Reproducible Automated Proteomics Sample Preparation Workflow for Quantitative Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **17**, 420–428 (2018).
  149. Geyer, P. E. *et al.* Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. *Cell Syst.* **2**, 185–195 (2016).
  150. Messner, C. B. *et al.* Ultra-High-Throughput Clinical Proteomics Reveals Classifiers of COVID-19 Infection. *Cell Syst.* **11**, 11-24.e4 (2020).
  151. Smith, L. M. *et al.* Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat. Methods* **10**, (2013).
  152. Tran, J. C. *et al.* Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature* **480**, 254–258 (2011).
  153. Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M. C. & Yates, J. R. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem. Rev.* **113**, 2343 (2013).
  154. Gillet, L. C. *et al.* Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, O111.016717 (2012).
  155. Tsiamis, V. *et al.* One Thousand and One Software for Proteomics: Tales of the Toolmakers of Science. *J. Proteome Res.* **18**, 3580–3585 (2019).
  156. Liu, K., Ye, Y., Li, S. & Tang, H. Accurate de novo peptide sequencing using fully convolutional neural networks. *Nat. Commun.* **14**, 1–11 (2023).
  157. Kalhor, M., Lapin, J., Picciani, M. & Wilhelm, M. Rescoring Peptide Spectrum Matches: Boosting Proteomics Performance by Integrating Peptide Property Predictors Into Peptide Identification. *Mol. Cell. Proteomics* **23**, 100798 (2024).
  158. Schubert, O. T., Röst, H. L., Collins, B. C., Rosenberger, G. & Aebersold, R. Quantitative

- proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. *Nat. Protoc.* 2017 **12**, 1289–1294 (2017).
159. Neilson, K. A., Keighley, T., Pascovici, D., Cooke, B. & Haynes, P. A. Label-free quantitative shotgun proteomics using normalized spectral abundance factors. *Methods Mol. Biol.* **1002**, 205–222 (2013).
160. Schenone, M., Dančik, V., Wagner, B. K. & Clemons, P. A. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 232–240 (2013).
161. Wright, M. H. & Sieber, S. A. Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products. *Nat. Prod. Rep.* **33**, 681 (2016).
162. Feng, Y. *et al.* Global analysis of protein structural changes in complex proteomes. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1036–1044 (2014).
163. Savitski, M. M. *et al.* Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome. *Science* **346**, (2014).
164. Murale, D. P., Hong, S. C., Haque, M. M. & Lee, J. S. Photo-affinity labeling (PAL) in chemical proteomics: a handy tool to investigate protein-protein interactions (PPIs). *Proteome Sci.* **15**, (2016).
165. Mellacheruvu, D. *et al.* The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat. Methods* **10**, 730–736 (2013).
166. Liu, W., Yuan, J., Liu, Z., Zhang, J. & Chang, J. Label-Free Quantitative Proteomics Combined with Biological Validation Reveals Activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Contributing to Trastuzumab Resistance in Gastric Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
167. Ruprecht, B. *et al.* A mass spectrometry-based proteome map of drug action in lung cancer cell lines. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 1111–1119 (2020).
168. Hariri, N. & Thibault, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr. Res. Rev.* **23**, 270–299 (2010).
169. Liu, Z. *et al.* High-Fat Diet Induces Hepatic Insulin Resistance and Impairment of Synaptic Plasticity. *PLoS One* **10**, e0128274 (2015).
170. Sakers, A., De Siqueira, M. K., Seale, P. & Villanueva, C. J. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* **185**, 419–446 (2022).
171. Tabb, D. L., Huang, Y., Wysocki, V. H. & Yates, J. R. Influence of Basic Residue Content on Fragment Ion Peak Intensities in Low-Energy Collision-Induced Dissociation Spectra of Peptides. *Anal. Chem.* **76**, 1243 (2004).
172. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30 (2000).
173. Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M. & Ishiguro-Watanabe, M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res.* **51**, D587–D592 (2023).
174. Zhang, B., Kirov, S. & Snoddy, J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* **33**, (2005).
175. Y, L., J, W., EJ, J., Z, S. & B, Z. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.* **47**, W199–W205 (2019).
176. Morgenstern, M. *et al.* Quantitative high-confidence human mitochondrial proteome and its dynamics in cellular context. *Cell Metab.* **33**, 2464 (2021).
177. Kazak, L. *et al.* A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat HHS Public Access. *Cell* **163**, 643–655 (2015).
-

178. Oudman, I., Clark, J. F. & Brewster, L. M. The effect of the creatine analogue beta-guanidinopropionic acid on energy metabolism: a systematic review. *PLoS One* **8**, (2013).
179. Jiang, M., Chavarria, T. E., Yuan, B., Lodish, H. F. & Huang, N. J. Phosphocholine accumulation and PHOSPHO1 depletion promote adipose tissue thermogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 15055–15065 (2020).
180. Suchacki, K. J. *et al.* PHOSPHO1 is a skeletal regulator of insulin resistance and obesity. *BMC Biol.* **18**, 1–20 (2020).
181. Liu, Y., Wu, Y. & Jiang, M. The emerging roles of PHOSPHO1 and its regulated phospholipid homeostasis in metabolic disorders. *Front. Physiol.* **13**, (2022).
182. Roberts, S. J., Stewart, A. J., Sadler, P. J. & Farquharson, C. Human PHOSPHO1 exhibits high specific phosphoethanolamine and phosphocholine phosphatase activities. *Biochem. J.* **382**, 59 (2004).
183. Ducker, G. S. & Rabinowitz, J. D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab.* **25**, 27 (2017).
184. Murray, B. *et al.* Methionine Adenosyltransferase  $\alpha 1$  Is Targeted to the Mitochondrial Matrix and Interacts with Cytochrome P450 2E1 to Lower Its Expression. *Hepatology* **70**, 2018–2034 (2019).
185. Clare, C. E., Brassington, A. H., Kwong, W. Y. & Sinclair, K. D. One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **7**, 263–287 (2019).
186. Melo, T., Montero-Bullón, J. F., Domingues, P. & Domingues, M. R. Discovery of bioactive nitrated lipids and nitro-lipid-protein adducts using mass spectrometry-based approaches. *Redox Biol.* **23**, (2019).
187. Aranda-Caño, L. *et al.* Post-Translational Modification of Proteins Mediated by Nitro-Fatty Acids in Plants: Nitroalkylation. *Plants 2019, Vol. 8, Page 82* **8**, 82 (2019).
188. Ferrer-Sueta, G. *et al.* Factors Affecting Protein Thiol Reactivity and Specificity in Peroxide Reduction. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 434–450 (2011).
189. Flicker, D., Sancak, Y., Mick, E., Goldberger, O. & Mootha, V. K. Exploring the In Vivo Role of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Brown Fat Bioenergetics. *Cell Rep.* **27**, 1364 (2019).
190. Panic, V. *et al.* Mitochondrial pyruvate carrier is required for optimal brown fat thermogenesis. *Elife* **9**, 1–27 (2020).
191. Protein BLAST: search protein databases using a protein query. [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).
192. Turell, L. *et al.* The chemical basis of thiol addition to nitro-conjugated linoleic acid, a protective cell-signaling lipid. *J. Biol. Chem.* **292**, 1145–1159 (2017).
193. Lang, P., Hasselwander, S., Li, H. & Xia, N. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Sci. Reports 2019 91* **9**, 1–14 (2019).
194. Jiang, H., Ding, X., Cao, Y., Wang, H. & Zeng, W. Dense Intra-adipose Sympathetic Arborizations Are Essential for Cold-Induced Beiging of Mouse White Adipose Tissue. *Cell Metab.* **26**, 686–692.e3 (2017).
195. Kajimura, S., Spiegelman, B. M. & Seale, P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab.* **22**, 546–559 (2015).
196. Wang, Y. *et al.* Integrated proteome and phosphoproteome analysis of interscapular brown

- adipose and subcutaneous white adipose tissues upon high fat diet feeding in mouse. *J. Proteomics* **255**, 104500 (2022).
197. Bonilauri, B. *et al.* Proteogenomic Analysis Reveals Proteins Involved in the First Step of Adipogenesis in Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Int.* **2021**, (2021).
198. Hruska, P. *et al.* Proteomic Signatures of Human Visceral and Subcutaneous Adipocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **107**, 755 (2022).
199. Halarnkar, P. P. & Blomquist, G. J. Comparative aspects of propionate metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **92**, 227–231 (1989).
200. He, W. *et al.* Fasting alleviates metabolic alterations in mice with propionyl-CoA carboxylase deficiency due to Pcca mutation. *Commun. Biol.* **2024 71 7**, 1–13 (2024).
201. Bckdhb - 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q6P3A8/entry>.
202. Yoneshiro, T. *et al.* Metabolic flexibility via mitochondrial BCAA carrier SLC25A44 is required for optimal fever. *Elife* **10**, (2021).
203. Holeček, M. Branched-chain amino acids in health and disease: Metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutr. Metab.* **15**, 1–12 (2018).
204. Yoneshiro, T. *et al.* BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44. *Nature* **572**, 614 (2019).
205. Nam, M. & Cooper, M. P. Role of energy metabolism in the brown fat gene program. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **6**, 151175 (2015).
206. Takeda, Y., Harada, Y., Yoshikawa, T. & Dai, P. Mitochondrial Energy Metabolism in the Regulation of Thermogenic Brown Fats and Human Metabolic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2023, Vol. 24, Page 1352 24**, 1352 (2023).
207. Jiang, Y. *et al.* MULocDeep web service for protein localization prediction and visualization at subcellular and suborganellar levels. *Nucleic Acids Res.* **51**, W343–W349 (2023).
208. Villanueva, E. *et al.* System-wide analysis of RNA and protein subcellular localization dynamics. *Nat. Methods* **2023 211 21**, 60–71 (2023).
209. Kazak, L. *et al.* Genetic depletion of adipocyte creatine metabolism inhibits diet-induced thermogenesis and drives obesity. *Cell Metab.* **26**, 660 (2017).
210. Houston, B., Stewart, A. J. & Farquharson, C. PHOSPHO1 - A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralisation in bone and cartilage. *Bone* **34**, 629–637 (2004).
211. Brosnan, J. T., da Silva, R. P. & Brosnan, M. E. The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids* **40**, 1325–1331 (2011).
212. Teng, Y. W., Ellis, J. M., Coleman, R. A. & Zeisel, S. H. Mouse Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase Deficiency Reduces Body Fat via Increasing Energy Expenditure and Impairing Lipid Synthesis and Enhancing Glucose Oxidation in White Adipose Tissue. *J. Biol. Chem.* **287**, 16187–16198 (2012).
213. Warriar, M. *et al.* Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress activates FGF21 and is associated with browning and atrophy of white adipose tissue in Bhmt knockout mice. *Heliyon* **9**, e13216 (2023).
214. Bhmt - Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt. [https://www.uniprot.org/uniprotkb/O35490/entry#subcellular\\_location](https://www.uniprot.org/uniprotkb/O35490/entry#subcellular_location).
215. Liu, Q., Zhou, Z., Liu, P. & Zhang, S. Comparative proteomic study of liver lipid droplets and mitochondria in mice housed at different temperatures. **593**, (2019).
-

- 
216. Liu, C. *et al.* Betaine-homocysteine methyltransferase promotes adipocyte commitment and insulin resistance via p38 MAPK/Smad signaling. *Obesity (Silver Spring)*. **31**, 1569–1583 (2023).
  217. Fisher, F. F. *et al.* FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* **26**, 271–281 (2012).
  218. Mat1a - S-adenosylmethionine synthase isoform type-1 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt.  
[https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q91X83/entry#subcellular\\_location](https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q91X83/entry#subcellular_location).
  219. Shi, J., Wang, X., Lyu, L., Jiang, H. & Zhu, H. J. Comparison of protein expression between human livers and the hepatic cell lines HepG2, Hep3B, and Huh7 using SWATH and MRM-HR proteomics: Focusing on drug-metabolizing enzymes. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **33**, 133–140 (2018).
  220. Meléndez-Hevia, E., De Paz-Lugo, P., Cornish-Bowden, A. & Cárdenas, M. L. A weak link in metabolism: the metabolic capacity for glycine biosynthesis does not satisfy the need for collagen synthesis. *J. Biosci.* **34**, 853–872 (2009).
  221. Duerre, D. J. *et al.* Heme biosynthesis regulates BCAA catabolism and thermogenesis in brown adipose tissue. *bioRxiv* 2023.11.28.568893 (2023) doi:10.1101/2023.11.28.568893.
  222. Choi, H. W. *et al.* A genome-wide screen for human salicylic acid (SA)-binding proteins reveals targets through which SA may influence development of various diseases. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
  223. Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., Kay, L. & Schlattner, U. Role of creatine and creatine kinase in UCP1-independent adipocyte thermogenesis. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **319**, E944–E946 (2020).
  224. Nicholls, D. G. & Brand, M. D. A critical assessment of the role of creatine in brown adipose tissue thermogenesis. *Nat. Metab.* 2023 51 **5**, 21–28 (2023).
  225. Maqdasy, S. *et al.* Impaired phosphocreatine metabolism in white adipocytes promotes inflammation. *Nat. Metab.* 2022 42 **4**, 190–202 (2022).
  226. Cero, C. *et al.*  $\beta$ 3-Adrenergic receptors regulate human brown/beige adipocyte lipolysis and thermogenesis. *JCI Insight* **6**, (2021).
  227. Wu, Q. *et al.* Intestinal hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  regulates lactate levels to shape the gut microbiome and alter thermogenesis. *Cell Metab.* **33**, 1988–2003.e7 (2021).
  228. Rivera, B. *et al.* Quantitative proteomic dataset from oro- and naso-pharyngeal swabs used for COVID-19 diagnosis: Detection of viral proteins and host's biological processes altered by the infection. *Data Br.* **32**, 106121 (2020).
  229. Carvalho, P. C. *et al.* Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat. Protoc.* **11**, 102–117 (2016).
  230. Carvalho, P. C. *et al.* Analyzing marginal cases in differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* **27**, 275–276 (2011).
  231. Carvalho, P. C., Yates, J. R. & Barbosa, V. C. Improving the TFCold test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* **28**, 1652–1654 (2012).
  232. Perez-Riverol, Y. *et al.* The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D442–D450 (2019).
  233. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
  234. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 2008 36 **3**, 1101–1108 (2008).
-

235. Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* 2009 65 **6**, 359–362 (2009).
236. Erde, J., Loo, R. R. O. & Loo, J. A. Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments. *J. Proteome Res.* **13**, 1885–1895 (2014).
237. Santos, M. D. M. *et al.* Simple, efficient and thorough shotgun proteomic analysis with PatternLab V. *Nat. Protoc.* 2022 177 **17**, 1553–1578 (2022).
238. Goodfellow, M. & Jones, A. L. Corynebacteriales ord. nov. *Bergey's Man. Syst. Archaea Bact.* 1–14 (2015) doi:10.1002/9781118960608.OBM00009.
239. Männik, J., Woldringh, C. L. & Zaritsky, A. Editorial: The Bacterial Cell: Coupling between Growth, Nucleoid Replication, Cell Division, and Shape. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
240. Egan, A. J. F., Errington, J. & Vollmer, W. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020 188 **18**, 446–460 (2020).
241. Cameron, T. A. & Margolin, W. Insights into the assembly and regulation of the bacterial divisome. *Nat. Rev. Microbiol.* 2023 221 **22**, 33–45 (2023).
242. McQuillen, R. & Xiao, J. Insights into the Structure, Function, and Dynamics of the Bacterial Cytokinetic FtsZ-Ring. *Annu. Rev. Biophys.* **49**, 309–341 (2020).
243. Donovan, C. & Bramkamp, M. Cell division in Corynebacterineae. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
244. Sogues, A. *et al.* Essential dynamic interdependence of FtsZ and SepF for Z-ring and septum formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
245. Sieger, B. & Bramkamp, M. Interaction sites of DivIVA and RodA from *Corynebacterium glutamicum*. *Front. Microbiol.* **5**, (2015).
246. 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. *Microbiology* **154**, 725–735 (2008).
247. Meniche, X. *et al.* Subpolar addition of new cell wall is directed by DivIVA in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E3243–E3251 (2014).
248. Leimkühler, S. The biosynthesis of the molybdenum cofactors in *Escherichia coli*. *Environ. Microbiol.* **22**, 2007–2026 (2020).

---

## 7. Anexos

### 7.1. Anexo 1. Otros artículos publicados en el período 2016-2024

Durante el desarrollo de esta tesis también participé con diferentes grados de contribución como co-autor de otras publicaciones además de las ya presentadas. Mi aporte a estos trabajos ha sido principalmente desde el área de la proteómica basada en espectrometría de masa y se llevó a cabo a través de colaboraciones con distintos grupos de investigación. A continuación se detallan los artículos publicados desde 2016 a la fecha:

1. Camillo-Andrade. A.C. et al. *Intra-Individual Paired Mass Spectrometry Dataset for Decoding Solar-Induced Proteomic Changes in Facial Skin*. *Sci Data* 11, 441 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03231-1>.
2. Tarallo, D. et al. *Mitofusin 1 silencing decreases the senescent associated secretory phenotype, promotes immune cell recruitment and delays melanoma tumor growth after chemotherapy*. *Sci Rep* 14, 909 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51427-7>.
3. Pousa S. et al. *On the utility of the extracted ion chromatograms for assigning the conjugation sites and side reactions in bioconjugates synthesized by the maleimide-thiol chemistry*. *Microchemical Journal*, (2024). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111025>.
4. Kiyuna L.A. et al. *4-Hydroxynonenal impairs miRNA maturation in heart failure via Dicer post-translational modification*, *European Heart Journal*, (2023); ehad662, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehad662>.
5. Hartman M. D. et al. *Phosphorylation of aldose-6-phosphate reductase from *Prunus persica* leaves*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.: 194, p.:461-469 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.12.003>.
6. Benítez D. et al. *Drug-like molecules with anti-trypanothione synthetase activity identified by high throughput screening*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v.: 37 p.:912 – 929 (2022). <http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2022.2045590>.
7. Lima A. et al. *Proteome remodeling in the *Mycobacterium tuberculosis* PknG knockout: Molecular evidence for the role of this kinase in cell envelope biogenesis and hypoxia response*. *Journal of Proteomics*, v.: 244 p.:104276 (2021). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104276>.
8. González L.J. et al. *Synthesis, LC-MS/MS analysis, and biological evaluation of two vaccine candidates against ticks based on the antigenic P0 peptide from *R. sanguineus* linked to the p64K carrier protein from *Neisseria meningitidis**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.: 413 p.:5885 – 5900 (2021). <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-021-03569-0>.

9. Ott C. et al. ***Decreased proteasomal cleavage at nitrotyrosine sites in proteins and peptides.*** Redox Biology, v.: 46 p.:102106 (2021). <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2021.102106>.
10. Rivera, B. #, Leyva, A.# et al. ***Quantitative proteomic dataset from oro- and nasopharyngeal swabs used for COVID-19 diagnosis: Detection of viral proteins and host's biological processes altered by the infection.*** Data in Brief, v.: 32 p.:106121 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.106121>. # co-primer autor.
11. Colman, L. et al. ***The protein Deleted in Breast Cancer-1 (DBC1) regulates vascular response and formation of aortic dissection during Angiotensin II infusion.*** Sci Rep **10**, 6772 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63841-8>.
12. Santos, L. et al. ***A novel form of Deleted in breast cancer 1 (DBC1) lacking the N-terminal domain does not bind SIRT1 and is dynamically regulated in vivo.*** Sci Rep **9**, 14381 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50789-7>.
13. R.F Silva A., B Lima D. et al. ***DiagnoProt: a tool for discovery of new molecules by mass spectrometry,*** Bioinformatics, Volume 33, Issue 12. (2017). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx093>.

## 7.2. Anexo 2. Proteínas exclusivamente detectadas en proteomas totales, iWAT

Proteínas detectadas exclusivamente en HFD + SANA, iWAT, $p < 0.05$ . ( <i>Mus musculus</i> )			
ID UniProt	Número de réplicas	Señal normalizada	Descripción
E9Q4Z2	2	2,06E-04	Acetyl-CoA carboxylase 2
P07310	3	1,56E-04	Creatine kinase M-type
P12246	2	1,18E-04	Serum amyloid P-component
O35744	2	9,35E-05	Chitinase-like protein 3
Q9R269	2	8,73E-05	Periplakin
P31725	2	7,48E-05	Protein S100-A9
A0A0A6YW77	2	6,86E-05	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Fragment)
G3X914	3	6,24E-05	Cullin-5
Q60963	3	6,24E-05	Platelet-activating factor acetylhydrolase
Q9QZ85	2	6,24E-05	Interferon-inducible GTPase 1
Q9CR61	2	6,24E-05	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7
A0A5F8MPE1	3	5,61E-05	Band 4.1-like protein 3
P14142	3	5,61E-05	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4
Q80SZ7	3	5,61E-05	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5
Q9Z277	2	5,61E-05	Tyrosine-protein kinase BAZ1B
A0A494BB75	3	4,99E-05	WD repeat-containing protein 26
Q80UG2	3	4,99E-05	Plexin-A4
Q9DCU6	2	4,99E-05	39S ribosomal protein L4, mitochondrial
Q9JLI8	3	4,36E-05	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3
Q8R1S0	3	4,36E-05	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6, mitochondrial
A2AN37	2	4,36E-05	Uridine-cytidine kinase
A2APM2	2	3,74E-05	CD44 antigen
A0A3Q4L347	2	3,74E-05	Cysteine dioxygenase

P32848	2	3,74E-05	Parvalbumin alpha
A0A087WQV1	2	3,74E-05	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial (Fragment)
Q99M87	2	3,12E-05	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial
Q7TNG8	2	3,12E-05	Probable D-lactate dehydrogenase, mitochondrial
Q9CQW9	2	3,12E-05	Interferon-induced transmembrane protein 3
P33434	2	3,12E-05	72 kDa type IV collagenase
P62311	2	3,12E-05	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3
O09174	2	3,12E-05	Alpha-methylacyl-CoA racemase
F6RUK9	2	3,12E-05	Pleckstrin homology-like domain family B member 1 (Fragment)
E9Q0Y4	2	2,49E-05	Signal-induced proliferation-associated protein 1
Q9DC11	2	2,49E-05	Plexin domain-containing protein 2
Q9CR51	2	2,49E-05	V-type proton ATPase subunit G 1
Q9DCG9	2	2,49E-05	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein
Q8QZZ7	2	2,49E-05	EKC/KEOPS complex subunit Tprkb
Q8BK30	2	2,49E-05	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial
Q91WA6	2	2,49E-05	Sharpin
Q7TSQ8	2	2,49E-05	Pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit, mitochondrial
Q5SVR0	2	2,49E-05	TBC1 domain family member 9B
P62309	2	2,49E-05	Small nuclear ribonucleoprotein G
C0HK80	2	2,49E-05	Adipocyte-related X-chromosome expressed sequence 2
Q9R045	2	2,49E-05	Angiopoietin-related protein 2
Q9D0T1	2	2,49E-05	NHP2-like protein 1
P03899	2	2,49E-05	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3
Q62318	2	2,49E-05	Transcription intermediary factor 1-beta
Q9CR67	2	2,49E-05	Transmembrane protein 33
Q8N7N5	2	2,49E-05	DDB1- and CUL4-associated factor 8
Q91WM2	2	2,49E-05	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing 5
O35435	2	2,49E-05	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial

<b>Proteínas detectadas exclusivamente en HFD, iWAT, p&lt;0.05. (<i>Mus musculus</i>)</b>			
<b>ID UniProt</b>	<b>Número de réplicas</b>	<b>Señal normalizada</b>	<b>Descripción</b>
Q9DBE8	3	1,01E-04	Alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase ALG2
P70387	2	8,91E-05	Hereditary hemochromatosis protein homolog
G5E8Q8	3	8,31E-05	Adhesion G protein-coupled receptor F5
A2AEX6	3	8,31E-05	Four and a half LIM domains protein 1
Q8BLN5	2	8,31E-05	Lanosterol synthase
D6RH37	3	7,72E-05	Protein kinase C
D3Z383	3	7,72E-05	Mesoderm-specific transcript protein
Q61543	3	7,13E-05	Golgi apparatus protein 1
Q8R238	3	7,13E-05	Serine dehydratase-like
Q61490	3	7,13E-05	CD166 antigen
A0A171EBL2	2	7,13E-05	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213
P19973	2	7,13E-05	Lymphocyte-specific protein 1
Q8BXC0	2	6,53E-05	Prostacyclin synthase
Q8CBC8	3	5,94E-05	Branched-chain-amino-acid aminotransferase
O70274	2	5,94E-05	Protein tyrosine phosphatase type IVA 2
P70335	3	5,35E-05	Rho-associated protein kinase 1
Q9R013	3	5,35E-05	Cathepsin F
A0A5F8MPD4	3	5,35E-05	Ribosomal protein S6 kinase-related protein
Q8K094	3	5,35E-05	Poliovirus receptor
Q9JHH9	2	5,35E-05	Coatomer subunit zeta-2
Q99K23	2	5,35E-05	Ufm1-specific protease 2
Q921K8	3	4,75E-05	TRPM8 channel-associated factor 2
P41160	2	4,75E-05	Leptin
Q9JJZ4	2	4,75E-05	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1
E9QP62	2	4,75E-05	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein
A2AFP5	3	4,16E-05	RAB9, member RAS oncogene family (Fragment)
D3Z0F6	2	4,16E-05	Serine dehydratase-like (Fragment)

---

Q9EST4	2	4,16E-05	Proteasome assembly chaperone 2
B7ZNX6	2	4,16E-05	ErbB2ip protein
Q9JJI8	2	4,16E-05	60S ribosomal protein L38
P70297	2	4,16E-05	Signal transducing adapter molecule 1
O35640	2	4,16E-05	Annexin A8
Q99LJ6	2	4,16E-05	Glutathione peroxidase 7
P18052	3	3,56E-05	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha
P49138	3	3,56E-05	MAP kinase-activated protein kinase 2
E9PXM2	3	3,56E-05	RIKEN cDNA 1700003H04 gene
Q9CQ79	3	3,56E-05	Thioredoxin domain-containing protein 9

### 7.3. Anexo 3. Proteínas diferencialmente abundantes en proteomas totales, iWAT

Proteínas con abundancia significativamente incrementada en HFD+SANA, iWAT ( <i>Mus musculus</i> )					
ID UniProt	Señal normalizada (HFD + SANA)	Señal normalizada (HFD)	Tasa de cambio	Valor p	Descripción
A0A5F8MQ58	5,69E-04	1,73E-04	3,29	4,96E-03	Periaxin (Fragment)
Q6PB66	1,94E-04	6,05E-05	3,21	2,93E-02	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial
P50172	7,09E-04	2,38E-04	2,98	9,09E-03	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1
P19246	3,67E-04	1,24E-04	2,96	1,25E-04	Neurofilament heavy polypeptide
Q8R086	2,04E-04	8,25E-05	2,47	4,66E-04	Sulfite oxidase, mitochondrial
A0A0R4J036	7,49E-04	3,19E-04	2,35	1,49E-04	160 kDa neurofilament protein
G5E846	9,49E-04	4,20E-04	2,26	6,68E-04	Peripherin
E9PWN2	2,76E-04	1,24E-04	2,23	3,06E-02	Isoleucyl-tRNA synthetase
Q9CQC7	1,72E-04	7,77E-05	2,22	1,75E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4
Q9CQB4	2,76E-04	1,25E-04	2,21	1,46E-02	Cytochrome b-c1 complex subunit 7
P08551	8,28E-04	3,78E-04	2,19	9,48E-03	Neurofilament light polypeptide
Q8K411	2,91E-04	1,40E-04	2,08	1,28E-03	Presequence protease, mitochondrial
Q8BJ64	2,81E-04	1,38E-04	2,04	2,09E-02	Choline dehydrogenase, mitochondrial
Q8R123	1,82E-04	8,92E-05	2,04	2,57E-02	FAD synthase
Q9Z1P6	2,16E-04	1,08E-04	2,00	2,09E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7
Q64521	7,33E-04	3,67E-04	2,00	1,64E-02	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial
P33267	2,86E-04	1,44E-04	1,98	4,20E-02	Cytochrome P450 2F2
Q62425	1,87E-04	9,55E-05	1,96	1,10E-02	Cytochrome c oxidase subunit NDUF44
Q9CPP6	1,83E-04	9,51E-05	1,92	4,16E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5
A0A0R4J275	1,94E-04	1,03E-04	1,89	3,16E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12
O88792	1,70E-04	9,03E-05	1,88	4,05E-02	Junctional adhesion molecule A
Q91VM9	1,68E-04	9,03E-05	1,86	1,92E-02	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial
Q9R099	1,86E-04	1,01E-04	1,85	2,92E-03	Transducin beta-like protein 2
A0A0M3HEP9	1,68E-04	9,11E-05	1,84	4,77E-02	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial

Q61029	2,70E-04	1,48E-04	1,83	1,60E-02	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma
Q9Z2I8	3,95E-04	2,17E-04	1,83	4,09E-02	Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial
P52196	2,95E-04	1,68E-04	1,76	3,79E-02	Thiosulfate sulfurtransferase
Q91ZJ5	5,39E-04	3,12E-04	1,73	2,45E-03	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
A0A1Y7VJN6	6,72E-04	3,91E-04	1,72	1,75E-02	Immunoglobulin heavy constant gamma 3 (Fragment)
Q3U3J1	4,20E-04	2,45E-04	1,72	2,45E-02	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha
P03953	5,60E-04	3,28E-04	1,71	1,56E-02	Complement factor D
Q6P3A8	2,11E-04	1,24E-04	1,70	5,11E-03	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial
Q61704	4,72E-04	2,82E-04	1,67	3,71E-02	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3
Q62165	2,06E-04	1,24E-04	1,67	7,17E-03	Dystroglycan
Q9CQJ8	2,07E-04	1,25E-04	1,66	4,40E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9
A0A087WRE7	4,61E-04	2,86E-04	1,61	1,10E-02	Alcohol dehydrogenase iron-containing protein 1 (Fragment)
P08228	6,53E-04	4,06E-04	1,61	3,07E-02	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
Q8R059	2,36E-04	1,50E-04	1,58	2,18E-02	UDP-glucose 4-epimerase
O08795	4,15E-04	2,63E-04	1,58	1,54E-02	Glucosidase 2 subunit beta
P42230	2,98E-04	1,89E-04	1,58	1,00E-05	Signal transducer and activator of transcription 5A
Q8BJ56	4,05E-04	2,58E-04	1,57	2,07E-02	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2
Q8CAY6	6,77E-04	4,33E-04	1,56	2,68E-03	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic
Q9WTM5	1,67E-04	1,07E-04	1,56	1,29E-02	RuvB-like 2
A0A5F8MPM4	4,09E-04	2,63E-04	1,56	1,42E-02	Myelin peripheral protein
P24472	2,74E-04	1,77E-04	1,55	1,58E-02	Glutathione S-transferase A4
G3XA25	6,15E-04	3,98E-04	1,55	4,35E-03	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic
Q07456	1,98E-04	1,29E-04	1,54	1,55E-02	Protein AMBP
Q9Z2A9	3,49E-04	2,27E-04	1,54	2,34E-02	Glutathione hydrolase 5 proenzyme
A0A0R4J0Q5	6,30E-04	4,16E-04	1,51	1,42E-02	Lamin-B2
Q8R164	3,17E-04	2,09E-04	1,51	2,26E-02	Valacyclovir hydrolase
Q91XL1	4,25E-04	2,82E-04	1,51	2,48E-02	Leucine-rich HEV glycoprotein
A0A498WGS3	5,45E-04	3,63E-04	1,50	1,17E-02	Myelin basic protein
Q5JC28	3,46E-04	2,31E-04	1,50	2,81E-02	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15 isoform B
E0CY49	2,48E-04	1,66E-04	1,49	1,86E-02	Argininosuccinate lyase (Fragment)
P34914	1,73E-03	1,17E-03	1,48	1,01E-02	Bifunctional epoxide hydrolase 2

Q99MN9	8,86E-04	6,12E-04	1,45	1,09E-02	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial
Q8R2P8	2,36E-04	1,67E-04	1,42	1,60E-02	Lysine--tRNA ligase
Q9Z2V4	8,35E-04	5,95E-04	1,40	4,23E-03	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP]

<b>Proteínas con abundancia significativamente disminuida en HFD+SANA, iWAT (<i>Mus musculus</i>)</b>					
<b>ID UniProt</b>	<b>Señal normalizada (HFD + SANA)</b>	<b>Señal normalizada (HFD)</b>	<b>Tasa de cambio</b>	<b>Valor p</b>	<b>Descripción</b>
A0A1Y7VJW9	7,14E-05	2,39E-04	3,34	2,73E-02	Fibulin-5
P97351	8,09E-05	2,16E-04	2,67	1,71E-02	40S ribosomal protein S3a
A0A2I3BPR9	7,32E-05	1,79E-04	2,45	3,09E-02	Atrial natriuretic peptide receptor 3
P70180	2,99E-04	6,05E-04	2,02	3,57E-02	Atrial natriuretic peptide receptor 3
Q3U9N4	9,25E-05	1,82E-04	1,96	1,32E-02	Progranulin
A0A286YD12	1,18E-04	2,26E-04	1,91	7,97E-03	Neurolysin, mitochondrial
Q9R257	1,48E-04	2,81E-04	1,90	3,39E-02	Heme-binding protein 1
A0A1W2P6L9	1,98E-04	3,61E-04	1,82	7,63E-03	Peroxidasin homolog
B1AQF4	1,71E-04	3,11E-04	1,82	4,93E-02	Dual specificity protein phosphatase
P24547	1,04E-04	1,88E-04	1,81	3,63E-02	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2
A0A140T8J4	1,48E-04	2,64E-04	1,78	4,73E-02	Heme-binding protein 1
P52430	1,10E-04	1,95E-04	1,78	2,32E-02	Serum paraoxonase/arylesterase 1
P63037	9,48E-05	1,66E-04	1,75	4,59E-02	DnaJ homolog subfamily A member 1
Q921J2	1,05E-04	1,85E-04	1,75	1,94E-02	GTP-binding protein Rheb
A0A0R4J049	9,97E-05	1,74E-04	1,75	7,22E-03	Protein arginine N-methyltransferase 5
Q9CQC9	1,73E-04	3,01E-04	1,75	3,56E-03	GTP-binding protein SAR1b
Q9WUU7	1,34E-04	2,29E-04	1,71	3,49E-02	Cathepsin Z
P61922	1,03E-04	1,77E-04	1,71	4,52E-02	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial
Q62048	1,26E-04	2,14E-04	1,69	4,98E-02	Astrocytic phosphoprotein PEA-15
A0A1L1SQ51	6,36E-04	1,07E-03	1,69	1,90E-02	Talin-2
Q8R180	1,10E-04	1,84E-04	1,67	3,37E-02	ERO1-like protein alpha

O35969	1,56E-04	2,61E-04	1,67	3,36E-02	Guanidinoacetate N-methyltransferase
P35282	1,30E-04	2,13E-04	1,65	1,34E-02	Ras-related protein Rab-21
Q61166	2,28E-04	3,73E-04	1,63	1,23E-03	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1
Q91YP2	1,68E-04	2,74E-04	1,63	9,40E-03	Neurolysin, mitochondrial
Q3UPH1	1,61E-04	2,55E-04	1,59	7,01E-03	Protein PRRC1
P82198	2,60E-04	4,09E-04	1,57	3,67E-02	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3
Q61292	6,60E-04	1,01E-03	1,54	3,61E-03	Laminin subunit beta-2
Q9CQ22	1,30E-04	1,95E-04	1,50	2,30E-03	Ragulator complex protein LAMTOR1
P01863	1,86E-04	2,78E-04	1,49	7,31E-04	Ig gamma-2A chain C region, A allele
Q9DB05	1,86E-04	2,73E-04	1,47	6,91E-03	Alpha-soluble NSF attachment protein
Q9D8W5	2,11E-04	3,07E-04	1,46	7,64E-04	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12
Q64133	1,38E-04	2,01E-04	1,45	1,99E-02	Amine oxidase [flavin-containing] A
Q8R016	2,41E-04	3,47E-04	1,44	6,12E-03	Bleomycin hydrolase
O35887	4,32E-04	5,96E-04	1,38	8,28E-03	Calumenin
P62192	1,98E-04	2,72E-04	1,37	5,02E-04	26S proteasome regulatory subunit 4

#### 7.4. Anexo 4. Proteínas exclusivamente detectadas en proteomas mitocondriales, iWAT

Proteínas detectadas exclusivamente en mitocondrias HFD + SANA de iWAT, p<0.05. ( <i>Mus musculus</i> )			
ID UniProt	Número de réplicas	Señal normalizada	Descripción
Q8K2I3	2	2,21E-04	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 2
Q9QXE0	3	1,91E-04	2-hydroxyacyl-CoA lyase 1
Q7TMR0	2	1,45E-04	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase
P35487	2	1,30E-04	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, testis-specific form, mitochondrial
P81117	2	1,30E-04	Nucleobindin-2
Q9EQI8	3	1,14E-04	39S ribosomal protein L46, mitochondrial
Q8BLF1	2	1,14E-04	Neutral cholesterol ester hydrolase 1
A0A494B909	3	1,07E-04	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase
O35490	2	1,07E-04	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1
P60904	3	9,15E-05	DnaJ homolog subfamily C member 5
P08607	2	9,15E-05	C4b-binding protein
Q9CQ00	3	8,38E-05	Distal membrane-arm assembly complex protein 1
Q921S7	3	8,38E-05	39S ribosomal protein L37, mitochondrial
Q9JKF7	3	8,38E-05	39S ribosomal protein L39, mitochondrial
A0A140LIT2	3	8,38E-05	7-dehydrocholesterol reductase
O35972	3	8,38E-05	39S ribosomal protein L23, mitochondrial
P35290	2	8,38E-05	Ras-related protein Rab-24
Q9WUQ2	2	8,38E-05	Prolactin regulatory element-binding protein
Q9DB15	2	8,38E-05	39S ribosomal protein L12, mitochondrial
P18469	3	7,62E-05	H-2 class II histocompatibility antigen, I-E beta chain
Q9DIR1	3	7,62E-05	Complex I assembly factor TMEM126B, mitochondrial
Q99KV1	3	7,62E-05	DnaJ homolog subfamily B member 11

Q80YC5	3	7,62E-05	Coagulation factor XII
E9PX89	3	7,62E-05	BolA-like protein 3
P50247	3	7,62E-05	Adenosylhomocysteinase
A2APT9	3	7,62E-05	Kelch domain-containing protein 7A
Q9D110	3	7,62E-05	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase
Q99KR3	2	7,62E-05	Endoribonuclease LACTB2
Q9CYW4	2	7,62E-05	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3
Q5SUD5	3	6,86E-05	Protein SCO1 homolog, mitochondrial
E9QN37	3	6,86E-05	Macrophage-expressed gene 1 protein
Q9DCU6	3	6,86E-05	39S ribosomal protein L4, mitochondrial
Q9DCW5	3	6,86E-05	Cytochrome c oxidase subunit
Q8BGA8	3	6,86E-05	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM5, mitochondrial
Q8R242	3	6,86E-05	Di-N-acetylchitobiase
Q9CQV5	3	6,86E-05	28S ribosomal protein S24, mitochondrial
P84309	3	6,86E-05	Adenylate cyclase type 5
Z4YK42	3	6,86E-05	NAD kinase 2, mitochondrial
O54782	2	6,86E-05	Epididymis-specific alpha-mannosidase
Q78J03	2	6,86E-05	Methionine-R-sulfoxide reductase B2, mitochondrial
Q9DC50	2	6,86E-05	Peroxisomal carnitine O-octanoyltransferase
Q9DCU9	2	6,86E-05	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase, mitochondrial
Q8C0K5	2	6,86E-05	Graves disease carrier protein homolog
S4R2K0	3	6,10E-05	Peptide deformylase
C0HK80	3	6,10E-05	Adipocyte-related X-chromosome expressed sequence 2
P61226	3	6,10E-05	Ras-related protein Rap-2b
G3UY35	3	6,10E-05	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 (Fragment)
Q3UXS0	3	5,34E-05	Secretory carrier-associated membrane protein
E9Q137	3	5,34E-05	Testis-expressed gene 264
Q99J56	3	5,34E-05	Derlin-1
A0A0X1KG67	3	5,34E-05	ER membrane protein complex subunit 10
P62305	2	5,34E-05	Small nuclear ribonucleoprotein E
Q9CQL4	2	5,34E-05	39S ribosomal protein L20, mitochondrial

E9PUQ5	2	5,34E-05	Golgin subfamily A member 2
Q99M04	2	5,34E-05	Lipoyl synthase, mitochondrial
Q9ERN0	2	5,34E-05	Secretory carrier-associated membrane protein 2
Q9QUM0	2	5,34E-05	Integrin alpha-IIb
A0A0G2JEK2	2	5,34E-05	Cysteine-rich protein 1
Q9CQU3	3	4,57E-05	Protein RER1
O89013	3	4,57E-05	Leptin receptor gene-related protein
O09043	3	4,57E-05	Napsin-A
Q8BGD8	3	4,57E-05	Cytochrome c oxidase assembly factor 6 homolog
Q9D8B6	3	4,57E-05	Protein FAM210B, mitochondrial
P70699	2	4,57E-05	Lysosomal alpha-glucosidase
Q9Z0L8	2	4,57E-05	Gamma-glutamyl hydrolase
Q5FW60	2	4,57E-05	Major urinary protein 20
P36552	2	4,57E-05	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial
Q8C7E4	2	4,57E-05	Ribonuclease 4
Q9EP72	2	4,57E-05	ER membrane protein complex subunit 7
P20917	2	4,57E-05	Myelin-associated glycoprotein
Q8R143	2	4,57E-05	Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein
O08583	2	4,57E-05	THO complex subunit 4
D6RDQ3	2	4,57E-05	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein
O70172	2	4,57E-05	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha
Q9JHJ3	2	4,57E-05	Glycosylated lysosomal membrane protein
Q8R1G2	2	3,81E-05	Carboxymethylenebutenolidase homolog
A2APM2	2	3,81E-05	CD44 antigen
Q9D7N3	2	3,81E-05	28S ribosomal protein S9, mitochondrial
Q8BJZ4	2	3,81E-05	28S ribosomal protein S35, mitochondrial
P56959	2	3,81E-05	RNA-binding protein FUS
E0CX80	2	3,81E-05	Selenoprotein P (Fragment)
J3QP41	2	3,81E-05	Protein CREG1
Q9DC37	2	3,81E-05	Major facilitator superfamily domain-containing protein 1
O88986	2	3,81E-05	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, mitochondrial

Q9ESY9	2	3,81E-05	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase
Q9D1Q4	2	3,81E-05	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 3
Q3U422	2	3,81E-05	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial
Q3TYS2	2	3,81E-05	Cytochrome b-245 chaperone 1
A0A0U1RQ61	2	3,81E-05	Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial
A0A0R4JOK1	2	3,81E-05	Selenoprotein F
E9PV38	2	3,81E-05	Carboxylic ester hydrolase
Q64442	2	3,81E-05	Sorbitol dehydrogenase
Q9D964	2	3,81E-05	Glycine amidinotransferase, mitochondrial
P01728	2	3,81E-05	Ig lambda-2 chain V region
Q91YW3	2	3,81E-05	DnaJ homolog subfamily C member 3
Q9D2R6	2	3,81E-05	Cytochrome c oxidase assembly factor 3 homolog, mitochondrial
O70252	2	3,81E-05	Heme oxygenase 2
Q9JHS3	2	3,05E-05	Ragulator complex protein LAMTOR2
B2RPU8	2	3,05E-05	SCAN domain containing 3
Q80WW9	2	3,05E-05	DDRKG domain-containing protein 1
D6RFQ2	2	3,05E-05	Predicted gene 42957
A0A0A6YXB7	2	3,05E-05	Translocon-associated protein subunit beta
O88983	2	3,05E-05	Syntaxin-8
Q8BGP6	2	3,05E-05	Solute carrier family 25 member 40
A0A5F8MPX4	2	3,05E-05	Phosphatidylglycerophosphatase and protein-tyrosine phosphatase 1
Q9JHK5	2	3,05E-05	Pleckstrin
Q99N84	2	3,05E-05	28S ribosomal protein S18b, mitochondrial
Q9CWD8	2	3,05E-05	Iron-sulfur protein NUBPL
P14901	2	3,05E-05	Heme oxygenase 1
Q9CXY1	2	3,05E-05	Endosomal/lysosomal potassium channel TMEM175
Q8C6U2	2	3,05E-05	Solute carrier family 66 member 3
Q91XH5	2	3,05E-05	Sepiapterin reductase
Q8C3X8	2	3,05E-05	Lipase maturation factor 2
Q62147	2	3,05E-05	Sarcospan
Q3TYX2	2	3,05E-05	LRRN4 C-terminal-like protein

Q8R3Q6	2	3,05E-05	Coiled-coil domain-containing protein 58
Q9D8W7	2	3,05E-05	OCIA domain-containing protein 2
Q8VEA4	2	3,05E-05	Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40

<b>Proteínas detectadas exclusivamente en mitocondrias HFD de iWAT, p&lt;0.05. (<i>Mus musculus</i>)</b>			
<b>ID UniProt</b>	<b>Número de réplicas</b>	<b>Señal normalizada</b>	<b>Descripción</b>
Q61001	3	1,72E-03	Laminin subunit alpha-5
Q02257	3	3,60E-04	Junction plakoglobin
P82198	3	2,38E-04	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3
Q9CY64	3	2,10E-04	Biliverdin reductase A
P80313	2	2,10E-04	T-complex protein 1 subunit eta
P55284	3	2,04E-04	Cadherin-5
A0A1Y7VJW9	3	2,04E-04	Fibulin-5
B7ZNH7	2	1,97E-04	Collagen alpha-1(XIV) chain
Q8JZQ9	3	1,70E-04	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B
D9J302	3	1,63E-04	ENH isoform 1e
G3X924	3	1,63E-04	Plasmalemma vesicle-associated protein
Q8R1B4	3	1,63E-04	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C
Q8QZY1	3	1,56E-04	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L
B1AQF4	2	1,56E-04	Dual specificity protein phosphatase
Q8K1M6	3	1,49E-04	Dynamin-1-like protein
A0A0R4J093	3	1,49E-04	UMP-CMP kinase
F8WJ05	3	1,49E-04	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1
P60229	2	1,49E-04	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E
Q6WIZ7	2	1,49E-04	Amine oxidase
A0A1D5RLZ3	3	1,36E-04	Dystonin (Fragment)
E9PVY8	3	1,36E-04	Microtubule-actin cross-linking factor 1

P80316	3	1,36E-04	T-complex protein 1 subunit epsilon
Q8BP47	3	1,36E-04	Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic
A0A0G2JEC4	3	1,36E-04	Endophilin-B1
A0A2U3TZ67	3	1,36E-04	Dynamin-1-like protein
P40336	2	1,36E-04	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A
Q9R0B6	3	1,29E-04	Laminin subunit gamma-3
Q8BS30	2	1,29E-04	Seminal vesicle secretory protein 2
D4AFX7	2	1,29E-04	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13
Q9R0P5	2	1,29E-04	Dextrin
Q6P069	3	1,22E-04	Sorcin
Q3U0S6	3	1,22E-04	Ras-interacting protein 1
A0A494B917	3	1,22E-04	Heat shock 70 kDa protein 12A (Fragment)
Q99JZ4	2	1,22E-04	GTP-binding protein SAR1a
Q8BYA0	3	1,15E-04	Tubulin-specific chaperone D
Q9DCH4	3	1,15E-04	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F
Q9Z1G3	3	1,15E-04	V-type proton ATPase subunit C 1
P39447	3	1,15E-04	Tight junction protein ZO-1
Q9Z0E6	3	1,15E-04	Guanylate-binding protein 2
Q8C483	3	1,09E-04	Seryl-aminoacyl-tRNA synthetase
Q8BZ98	3	1,09E-04	Dynamin-3
Q9QYJ0	3	1,09E-04	DnaJ homolog subfamily A member 2
A0A494BB89	3	1,09E-04	Asparaginyl-tRNA synthetase
Q1ERP8	3	1,09E-04	CMRF35-like molecule 9
P61222	3	1,02E-04	ATP-binding cassette sub-family E member 1
Q8R1F1	3	1,02E-04	Protein Niban 2
Z4YJF5	2	1,02E-04	Myomesin-1
Q8C166	2	1,02E-04	Copine-1
Q4ZJN1	3	9,50E-05	Complement C1q and tumor necrosis factor-related protein 9
Q9WUA2	2	9,50E-05	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit
Q3THE2	2	9,50E-05	Myosin regulatory light chain 12B
E9QNL5	2	9,50E-05	Sulfotransferase

A0A494B8Y7	3	8,82E-05	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)
A0A1B0GS58	3	8,82E-05	Glutaredoxin-3
Q91WK2	2	8,82E-05	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H
Q3UVT7	2	8,82E-05	Palmdelphin
Q9CZ30	2	8,82E-05	Obg-like ATPase 1
Q9CQW1	2	8,82E-05	Synaptobrevin homolog YKT6
P06684	2	8,82E-05	Complement C5
Q3U962	3	8,15E-05	Collagen alpha-2(V) chain
P01639	3	8,15E-05	Ig kappa chain V-V region MOPC 41
A0A075B5R1	3	8,15E-05	Immunoglobulin heavy variable 5-17 (Fragment)
G3X977	3	8,15E-05	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2
Q6P8X1	3	8,15E-05	Sorting nexin-6
B1B1A8	3	8,15E-05	Myosin light chain kinase, smooth muscle
P53996	3	8,15E-05	Cellular nucleic acid-binding protein
Q8C0C7	3	8,15E-05	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit
E9Q4K7	2	8,15E-05	Kinesin family member 13B
Q8BFY9	2	8,15E-05	Transportin-1
Q60823	2	8,15E-05	RAC-beta serine/threonine-protein kinase
Q6A0A9	2	8,15E-05	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1
Q62418	3	7,47E-05	Drebrin-like protein
Q9CXW3	3	7,47E-05	Calcyclin-binding protein
E9Q6P5	2	7,47E-05	Tetratricopeptide repeat protein 7B
Q8BND5	2	7,47E-05	Sulfhydryl oxidase 1
Q8C0E2	2	7,47E-05	Vacuolar protein sorting-associated protein 26B
A2A864	2	7,47E-05	Integrin beta
P61087	3	6,79E-05	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K
P62264	3	6,79E-05	40S ribosomal protein S14
Q8CBB7	2	6,79E-05	AP-1 complex subunit gamma
A2AH25	2	6,79E-05	Rho GTPase-activating protein 1
Q5PR72	2	6,79E-05	Phosphodiesterase
Q8BZH8	2	6,79E-05	Seminal vesicle secretory protein 3B

O35345	2	6,79E-05	Importin subunit alpha-7
Q640N1	2	6,79E-05	Adipocyte enhancer-binding protein 1
E9Q309	2	6,79E-05	Centrosome-associated protein 350
A0A5F8MP96	3	6,11E-05	Septin-4
P97379	3	6,11E-05	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2
Q8BJW6	3	6,11E-05	Eukaryotic translation initiation factor 2A
Q8CBA2	3	6,11E-05	Schlafen family member 5
B7ZNL2	2	6,11E-05	Nap114 protein
Q8C7J6	2	6,11E-05	Potassium channel tetramerisation domain-containing 12b
Q99K70	2	6,11E-05	Ras-related GTP-binding protein C
Q8BJE2	2	6,11E-05	Butyrophilin-like protein 9
P32261	2	6,11E-05	Antithrombin-III
Q8R050	2	6,11E-05	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A
O35382	2	6,11E-05	Exocyst complex component 4
A0A0R4J1B0	2	6,11E-05	Troponin T, fast skeletal muscle
P01592	3	5,43E-05	Immunoglobulin J chain
P14069	3	5,43E-05	Protein S100-A6
P61514	3	5,43E-05	60S ribosomal protein L37a
Q8K0L9	2	5,43E-05	Zinc finger and BTB domain-containing protein 20
Q6NZD2	2	5,43E-05	Sorting nexin-1
Q8BMS4	2	5,43E-05	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase, mitochondrial
A0A140T8P9	2	5,43E-05	Immunoglobulin kappa variable 14-111 (Fragment)
B2RQC6	2	5,43E-05	CAD protein
Q9WVJ2	2	5,43E-05	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13
Q9D883	2	5,43E-05	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit
G3X972	2	5,43E-05	Sec24-related gene family, member C ( <i>S. cerevisiae</i> )
A0A0R4J0B4	2	5,43E-05	N-acylneuraminate cytidyltransferase
Q9JLI2	2	5,43E-05	Collagen type V alpha 3 chain
J3QNU6	2	5,43E-05	Beta-arrestin-1
Q9CX56	2	5,43E-05	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8
P12815	2	5,43E-05	Programmed cell death protein 6

---

Q69ZX8	2	5,43E-05	Actin-binding LIM protein 3
D6RIJ2	3	4,75E-05	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit
P62334	2	4,75E-05	26S proteasome regulatory subunit 10B
Q9JL62	2	4,75E-05	Glycolipid transfer protein
Q6NXL1	2	4,75E-05	Sec24-related gene family, member D ( <i>S. cerevisiae</i> )
E9Q5H2	2	4,75E-05	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E (Fragment)
A0A0F6AIX5	2	4,75E-05	Lipid droplet-associated hydrolase
Q61133	2	4,75E-05	Glutathione S-transferase theta-2
Q6NSR8	2	4,75E-05	Probable aminopeptidase NPEPL1
Q8BHZ0	2	4,75E-05	CYFIP-related Rac1 interactor A
Q9DBB8	2	4,75E-05	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase
Q3UW53	2	4,75E-05	Protein Niban 1
P35550	2	4,75E-05	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar
Q6PDL0	3	4,07E-05	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2

### 7.5. Anexo 5. Proteínas diferencialmente abundantes en proteomas mitocondriales, iWAT

Proteínas con abundancia significativamente incrementada en mitocondrias HFD+SANA de iWAT ( <i>Mus musculus</i> )					
ID UniProt	Señal normalizada (HFD + SANA)	Señal normalizada (HFD)	Tasa de cambio	Valor p	Descripción
P09470	5,15E-04	8,69E-05	5,93	7,03E-03	Angiotensin-converting enzyme
G3X8X6	5,22E-04	9,56E-05	5,46	9,69E-03	Sialoadhesin
O08807	3,47E-04	6,90E-05	5,02	2,60E-04	Peroxiredoxin-4
Q544X6	6,35E-04	1,42E-04	4,48	4,12E-03	Ferrochelatase
Q3TCN2	4,30E-04	1,04E-04	4,15	3,55E-03	Putative phospholipase B-like 2
Q9WU79	7,53E-04	1,90E-04	3,96	1,63E-02	Proline dehydrogenase 1, mitochondrial
Q8BHC4	3,41E-04	8,95E-05	3,81	9,29E-03	Dephospho-CoA kinase domain-containing protein
Q8CJ91	4,13E-04	1,11E-04	3,74	1,38E-03	CD209 antigen-like protein B
Q9DBG1	3,06E-04	8,28E-05	3,70	7,36E-05	Sterol 26-hydroxylase, mitochondrial
Q60648	3,26E-04	1,04E-04	3,15	2,40E-02	Ganglioside GM2 activator
Q8R086	8,13E-04	2,60E-04	3,13	3,87E-03	Sulfite oxidase, mitochondrial
S4R1M0	4,98E-04	1,63E-04	3,05	2,06E-03	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C
P52196	3,58E-04	1,19E-04	3,02	9,45E-03	Thiosulfate sulfurtransferase
A2A7A7	1,12E-03	3,82E-04	2,92	6,88E-04	GDH/6PGL endoplasmic bifunctional protein
P08905	4,39E-04	1,51E-04	2,90	6,65E-03	Lysozyme C-2
A0A0A0MQ70	4,11E-04	1,43E-04	2,89	1,96E-02	Solute carrier family 25 member 35
P98192	4,32E-04	1,50E-04	2,88	3,08E-03	Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase
Q99LY9	3,83E-04	1,33E-04	2,87	5,23E-03	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5
P61022	3,52E-04	1,23E-04	2,86	1,93E-02	Calcineurin B homologous protein 1
P11835	4,98E-04	1,75E-04	2,85	2,78E-02	Integrin beta-2
Q9ESW4	5,50E-04	2,04E-04	2,70	4,42E-03	Acylglycerol kinase, mitochondrial
Q61578	3,08E-04	1,15E-04	2,68	1,36E-02	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial

Q5U458	6,65E-04	2,57E-04	2,59	1,17E-03	DnaJ homolog subfamily C member 11
A0A0A6YVR9	3,37E-04	1,31E-04	2,57	8,67E-03	SURF1-like protein (Fragment)
O88531	5,98E-04	2,37E-04	2,53	3,19E-02	Palmitoyl-protein thioesterase 1
Q80YQ1	4,67E-04	1,86E-04	2,52	4,59E-03	Thrombospondin-1
Q61586	4,78E-04	1,90E-04	2,51	2,62E-02	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, mitochondrial
P20060	6,63E-04	2,65E-04	2,51	2,56E-02	Beta-hexosaminidase subunit beta
Q60994	3,38E-04	1,36E-04	2,48	1,00E-05	Adiponectin
Q9DB73	4,13E-04	1,67E-04	2,47	1,96E-02	NADH-cytochrome b5 reductase 1
Q9DBM2	9,96E-04	4,07E-04	2,45	2,69E-03	Peroxisomal bifunctional enzyme
O08795	4,64E-04	1,91E-04	2,43	8,38E-03	Glucosidase 2 subunit beta
Q9DAM5	3,96E-04	1,65E-04	2,40	1,78E-03	Mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier
Q9DCV4	4,61E-04	1,93E-04	2,38	5,62E-04	Regulator of microtubule dynamics protein 1
Q924L1	4,11E-04	1,76E-04	2,34	6,85E-03	LETM1 domain-containing protein 1
Q99KP6	3,52E-04	1,51E-04	2,34	3,18E-02	Pre-mRNA-processing factor 19
Q99JR1	6,66E-04	2,90E-04	2,30	3,01E-04	Sideroflexin-1
P51863	3,60E-04	1,57E-04	2,29	2,09E-02	V-type proton ATPase subunit d 1
Q8K4Z3	4,66E-04	2,04E-04	2,29	3,92E-03	NAD(P)H-hydrate epimerase
Q925I1	8,80E-04	3,88E-04	2,27	1,79E-03	ATPase family AAA domain-containing protein 3
P47791	3,21E-04	1,42E-04	2,26	6,87E-04	Glutathione reductase, mitochondrial
Q8BWF0	8,15E-04	3,62E-04	2,25	3,38E-02	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial
Q8BHN3	1,74E-03	7,78E-04	2,24	1,91E-04	Neutral alpha-glucosidase AB
Q8BP40	5,78E-04	2,59E-04	2,23	1,16E-02	Lysophosphatidic acid phosphatase type 6
O88342	6,00E-04	2,72E-04	2,20	1,43E-02	WD repeat-containing protein 1
Q99KE1	5,42E-04	2,49E-04	2,18	8,45E-03	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial
Q8K370	8,91E-04	4,09E-04	2,18	1,99E-03	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10
Q9DBF1	6,01E-04	2,78E-04	2,16	3,01E-02	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase
A2AL20	1,02E-03	4,76E-04	2,14	5,40E-03	Catalase
Q80XL6	5,59E-04	2,63E-04	2,13	1,78E-03	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11
Q99LB7	1,00E-03	4,73E-04	2,12	2,54E-02	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial
Q8BJ64	1,33E-03	6,26E-04	2,12	2,52E-02	Choline dehydrogenase, mitochondrial
Q91W90	4,50E-04	2,13E-04	2,11	1,64E-02	Thioredoxin domain-containing protein 5

Q9JHW2	3,62E-04	1,72E-04	2,11	2,58E-02	Omega-amidase NIT2
Q3UJU9	3,71E-04	1,76E-04	2,10	2,42E-02	Regulator of microtubule dynamics protein 3
K9J7B2	5,58E-04	2,67E-04	2,09	1,89E-02	UDP-glucuronosyltransferase
G3XA66	6,79E-04	3,27E-04	2,08	1,08E-02	Metaxin-1 (Fragment)
P23780	7,78E-04	3,79E-04	2,05	1,19E-02	Beta-galactosidase
Q99J39	6,23E-04	3,04E-04	2,05	5,14E-03	Malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial
Q8BFZ9	3,71E-04	1,82E-04	2,04	6,70E-03	Erlin-2
P50427	3,30E-04	1,63E-04	2,03	9,50E-04	Steryl-sulfatase
Q8K411	1,65E-03	8,16E-04	2,02	7,19E-03	Presequence protease, mitochondrial
E9QL80	5,54E-04	2,74E-04	2,02	8,80E-04	Acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1
E9QPX3	5,86E-04	2,93E-04	2,00	2,55E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial
Q80U63	5,80E-04	2,92E-04	1,99	1,13E-02	Mitofusin-2
Q91ZE0	6,64E-04	3,35E-04	1,98	9,46E-03	Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial
Q62087	6,61E-04	3,36E-04	1,97	4,49E-03	Serum paraoxonase/lactonase 3
P52503	5,05E-04	2,57E-04	1,97	1,82E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial
A0A0R4J0U5	1,29E-03	6,57E-04	1,97	1,46E-03	ATP-binding cassette sub-family D member 2
Q3TL44	1,10E-03	5,71E-04	1,93	1,25E-02	NLR family member X1
Q64435	4,96E-04	2,58E-04	1,92	1,77E-02	UDP-glucuronosyltransferase 1-6
Q9QWR8	5,40E-04	2,84E-04	1,91	2,44E-02	Alpha-N-acetylgalactosaminidase
P97370	3,90E-04	2,05E-04	1,90	5,93E-03	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3
Q3UZX5	3,72E-04	1,96E-04	1,90	2,42E-02	Alpha-galactosidase
Q6GQT9	6,20E-04	3,28E-04	1,89	1,70E-04	Nodal modulator 1
O88441	5,53E-04	2,92E-04	1,89	1,60E-03	Metaxin-2
A0A0R4J094	4,21E-04	2,23E-04	1,89	1,96E-02	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing 2A
Q9CXT8	6,72E-04	3,56E-04	1,89	1,39E-02	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta
Q9D6M3	5,43E-04	2,88E-04	1,88	2,06E-02	Mitochondrial glutamate carrier 1
Q91Z53	4,26E-04	2,26E-04	1,88	3,17E-02	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase
G5E8T9	4,47E-04	2,39E-04	1,87	3,49E-02	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial
P99027	3,08E-04	1,65E-04	1,87	4,79E-03	60S acidic ribosomal protein P2
D3YZZ5	3,56E-04	1,91E-04	1,86	1,18E-02	Transmembrane p24-trafficking protein 7
P24270	2,54E-03	1,37E-03	1,86	7,21E-04	Catalase

E9Q5B5	7,98E-04	4,32E-04	1,84	2,95E-02	Hexokinase-2
Q9QZA0	8,92E-04	4,84E-04	1,84	6,80E-03	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial
G5E814	4,14E-04	2,25E-04	1,84	5,44E-04	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11
H7BX01	1,07E-03	5,81E-04	1,84	3,21E-02	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial
Q8BG51	4,12E-04	2,24E-04	1,84	8,27E-03	Mitochondrial Rho GTPase 1
D3Z7X0	8,73E-04	4,77E-04	1,83	5,05E-03	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 12
A0A0R4J0Z1	1,13E-03	6,19E-04	1,82	1,83E-02	Protein disulfide-isomerase A4
Q9DCT2	1,18E-03	6,50E-04	1,82	1,21E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial
Q9DCJ5	8,03E-04	4,43E-04	1,81	2,83E-03	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8
Q9WV54	8,46E-04	4,75E-04	1,78	2,57E-02	Acid ceramidase
P10605	1,51E-03	8,45E-04	1,78	2,22E-02	Cathepsin B
Q8BGT5	4,70E-04	2,64E-04	1,78	1,66E-02	Alanine aminotransferase 2
P55096	6,63E-04	3,73E-04	1,78	3,13E-02	ATP-binding cassette sub-family D member 3
Q9WVC3	4,00E-04	2,26E-04	1,77	4,34E-03	Caveolin-2
O35857	5,76E-04	3,26E-04	1,77	3,10E-02	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44
P17439	3,39E-04	1,92E-04	1,77	1,16E-02	Lysosomal acid glucosylceramidase
A2A848	1,73E-03	9,79E-04	1,76	1,30E-03	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (Fragment)
Q9R0H0	1,92E-03	1,10E-03	1,76	9,84E-04	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1
Q64133	9,06E-04	5,21E-04	1,74	3,46E-02	Amine oxidase [flavin-containing] A
Q8VE95	3,22E-04	1,85E-04	1,74	5,49E-03	UPF0598 protein C8orf82 homolog
Q791V5	1,01E-03	5,83E-04	1,74	2,06E-03	Mitochondrial carrier homolog 2
Q91VA6	3,39E-04	1,95E-04	1,74	2,82E-02	Polymerase delta-interacting protein 2
Q9DC61	1,07E-03	6,23E-04	1,72	4,96E-03	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha
P18572	6,07E-04	3,55E-04	1,71	9,89E-04	Basigin
Q9Z0X1	1,70E-03	9,97E-04	1,71	3,57E-03	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial
Q9CQ75	4,69E-04	2,75E-04	1,71	8,43E-03	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2
P99028	3,30E-04	1,94E-04	1,70	8,39E-03	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial
Q60931	1,01E-03	5,95E-04	1,70	1,23E-02	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3
Q9CR61	5,85E-04	3,45E-04	1,70	3,57E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7
A0A0R3P9C8	1,62E-03	9,55E-04	1,70	6,53E-03	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial

P17047	3,38E-04	2,01E-04	1,68	1,51E-02	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2
P09103	2,58E-03	1,55E-03	1,67	2,02E-02	Protein disulfide-isomerase
Q9D855	1,03E-03	6,20E-04	1,66	8,60E-03	Cytochrome b-c1 complex subunit 7
A0A0N4SUM2	4,33E-04	2,61E-04	1,66	2,75E-02	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (Fragment)
Q99P72	5,78E-04	3,48E-04	1,66	8,27E-03	Reticulon-4
Q8VCT4	2,42E-03	1,46E-03	1,66	7,70E-03	Carboxylesterase 1D
Q64521	2,48E-03	1,50E-03	1,66	2,95E-02	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial
P56391	5,39E-04	3,25E-04	1,66	8,82E-03	Cytochrome c oxidase subunit 6B1
A2AQR0	2,46E-03	1,48E-03	1,66	2,96E-02	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
Q9CZB0	3,97E-04	2,40E-04	1,66	6,62E-03	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial
A0A286YD12	1,32E-03	7,98E-04	1,65	8,27E-03	Neurolysin, mitochondrial
I7HJR3	4,28E-04	2,59E-04	1,65	4,65E-03	Beta-2-glycoprotein 1 (Fragment)
G3UX26	1,06E-03	6,40E-04	1,65	8,60E-03	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
Q8BH59	1,04E-03	6,35E-04	1,64	2,22E-02	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1
P09671	1,21E-03	7,35E-04	1,64	5,21E-03	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial
E9PWN2	1,27E-03	7,78E-04	1,63	3,09E-02	Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial
E9Q7L0	7,70E-04	4,72E-04	1,63	2,15E-02	Oxoglutarate dehydrogenase-like
Q60932	1,80E-03	1,10E-03	1,63	1,03E-02	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
P29758	1,48E-03	9,09E-04	1,63	2,72E-03	Ornithine aminotransferase, mitochondrial
Q60930	1,07E-03	6,59E-04	1,63	6,29E-03	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
Q9D0M3	1,46E-03	9,01E-04	1,62	1,07E-02	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial
Q9R0X4	7,57E-04	4,68E-04	1,62	2,36E-02	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial
O35114	5,22E-04	3,24E-04	1,61	1,00E-02	Lysosome membrane protein 2
Q8CHT0	1,00E-03	6,22E-04	1,61	1,85E-02	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial
Q8VCH0	8,11E-04	5,04E-04	1,61	2,63E-02	3-ketoacyl-CoA thiolase B, peroxisomal
F2Z471	1,60E-03	9,94E-04	1,61	1,25E-02	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
Q64433	6,15E-04	3,83E-04	1,61	1,49E-02	10 kDa heat shock protein, mitochondrial
B1AWZ5	7,67E-04	4,77E-04	1,61	3,56E-03	Protein NipSnap homolog 3B
Q9DBH5	4,79E-04	2,99E-04	1,60	1,96E-02	Vesicular integral-membrane protein VIP36
Q9WTP6	1,85E-03	1,16E-03	1,60	1,16E-02	Adenylate kinase 2, mitochondrial
P70404	1,19E-03	7,47E-04	1,60	3,30E-03	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma 1, mitochondrial

Q8BW75	1,37E-03	8,57E-04	1,60	1,40E-02	Amine oxidase [flavin-containing] B
P61922	1,24E-03	7,79E-04	1,59	1,22E-02	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial
E9Q6M6	3,36E-04	2,11E-04	1,59	1,05E-02	Mitochondrial glutamate carrier 1
Q9CPY7	1,01E-03	6,36E-04	1,59	7,83E-03	Cytosol aminopeptidase
Q9CZ13	2,76E-03	1,73E-03	1,59	5,08E-03	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial
Q9CW42	7,84E-04	4,93E-04	1,59	1,91E-02	Mitochondrial amidoxime-reducing component 1
Q99LP6	7,58E-04	4,77E-04	1,59	4,50E-03	GrpE protein homolog 1, mitochondrial
Q8K1R3	5,11E-04	3,22E-04	1,59	1,31E-02	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial
Q3U125	7,40E-04	4,66E-04	1,59	1,31E-02	Peroxiredoxin-like 2A
Q91YP2	1,32E-03	8,33E-04	1,59	1,85E-02	Neurolysin, mitochondrial
A0A0R4J275	7,22E-04	4,56E-04	1,58	3,43E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12
P16332	1,65E-03	1,04E-03	1,58	1,15E-02	Methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial
Q91YT0	1,95E-03	1,23E-03	1,58	3,08E-03	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial
Q8CGK3	1,19E-03	7,53E-04	1,57	1,98E-02	Lon protease homolog, mitochondrial
A0A0M3HEQ0	8,32E-04	5,30E-04	1,57	2,14E-02	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial
P35486	1,66E-03	1,06E-03	1,57	7,20E-04	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial
Q9CQ69	5,39E-04	3,43E-04	1,57	2,84E-02	Cytochrome b-c1 complex subunit 8
Q9CRD0	5,14E-04	3,28E-04	1,57	2,87E-02	OCIA domain-containing protein 1
Q8BGH2	1,15E-03	7,35E-04	1,56	1,86E-02	Sorting and assembly machinery component 50 homolog
Q8BIJ6	1,91E-03	1,22E-03	1,56	2,91E-02	Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial
Q8JZQ2	4,68E-04	3,00E-04	1,56	2,47E-02	AFG3-like protein 2
Q9JHI5	1,57E-03	1,01E-03	1,56	2,03E-02	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
Q8R164	9,63E-04	6,21E-04	1,55	1,29E-02	Valacyclovir hydrolase
Q9CQA3	1,41E-03	9,11E-04	1,55	8,06E-03	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial
P08228	4,05E-04	2,62E-04	1,55	1,95E-02	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
O88569	1,03E-03	6,65E-04	1,55	2,96E-02	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
P97742	1,18E-03	7,66E-04	1,54	2,31E-02	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform
O35855	1,31E-03	8,47E-04	1,54	7,30E-03	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial
P20108	1,25E-03	8,14E-04	1,53	1,38E-02	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial
E9QK82	1,38E-03	9,01E-04	1,53	9,43E-03	Myelin protein P0

Q9DCS9	6,64E-04	4,34E-04	1,53	3,36E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10
Q9DBL1	9,13E-04	5,98E-04	1,52	2,82E-02	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
Q6PB66	2,14E-03	1,40E-03	1,52	1,99E-02	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial
Q3TML0	8,50E-04	5,59E-04	1,52	2,37E-02	Protein disulfide-isomerase A6
P14483	6,63E-04	4,36E-04	1,52	1,50E-02	H-2 class II histocompatibility antigen, A beta chain
Q8K2B3	3,22E-03	2,13E-03	1,52	6,43E-03	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial
O89053	7,18E-04	4,74E-04	1,51	1,24E-02	Coronin-1A
Q5SX46	7,27E-04	4,80E-04	1,51	6,00E-03	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (Fragment)
A0A494BAZ4	4,76E-04	3,15E-04	1,51	7,16E-04	Peroxiredoxin (Fragment)
Q9CQC7	4,92E-04	3,26E-04	1,51	2,77E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4
Q3UJQ9	2,27E-03	1,50E-03	1,51	1,60E-02	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase
Q9QYA2	4,58E-04	3,05E-04	1,51	9,21E-03	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog
Q9CR62	9,88E-04	6,58E-04	1,50	4,18E-03	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein
Q9CQF9	7,66E-04	5,12E-04	1,50	3,28E-02	Prenylcysteine oxidase
Q8BMF4	1,52E-03	1,02E-03	1,49	1,14E-02	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial
Q9DCN2	1,40E-03	9,37E-04	1,49	1,12E-02	NADH-cytochrome b5 reductase 3
P51881	3,13E-03	2,10E-03	1,49	1,78E-02	ADP/ATP translocase 2
Q9D172	1,09E-03	7,35E-04	1,49	4,51E-03	Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 3A, mitochondrial
Q9CQZ5	4,98E-04	3,35E-04	1,49	5,24E-04	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6
Q9D051	9,97E-04	6,73E-04	1,48	6,12E-03	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial
Q60597	4,44E-03	3,00E-03	1,48	7,74E-03	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial
E9Q8G8	6,57E-04	4,45E-04	1,48	3,45E-02	Protein disulfide-isomerase
Q9D0K2	2,49E-03	1,69E-03	1,47	2,12E-02	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial
P48962	2,90E-03	1,97E-03	1,47	1,29E-02	ADP/ATP translocase 1
Z4YJV4	4,25E-03	2,89E-03	1,47	7,51E-03	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial
Q8K1Z0	4,13E-04	2,82E-04	1,47	2,11E-02	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial
Q9EQ20	3,27E-03	2,24E-03	1,46	7,86E-03	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial
Q01339	1,16E-03	7,93E-04	1,46	1,45E-03	Beta-2-glycoprotein 1
P17751	7,31E-04	5,02E-04	1,45	3,32E-02	Triosephosphate isomerase
P47738	3,89E-03	2,68E-03	1,45	2,89E-02	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial

O88844	7,02E-04	4,84E-04	1,45	2,31E-02	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic
Q9DB60	4,83E-04	3,34E-04	1,45	3,31E-03	Prostamide/prostaglandin F synthase
Q99KI0	4,11E-03	2,84E-03	1,45	1,90E-03	Aconitate hydratase, mitochondrial
H7BX88	1,68E-03	1,16E-03	1,45	2,82E-02	Carnitine O-acetyltransferase
Q9R257	4,13E-04	2,86E-04	1,45	5,66E-03	Heme-binding protein 1
Q8JZU2	1,21E-03	8,42E-04	1,44	2,85E-02	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial
Q99LB2	5,78E-04	4,02E-04	1,44	2,31E-02	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4
Q9D881	8,29E-04	5,76E-04	1,44	2,43E-02	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial
Q9CRB9	7,16E-04	4,99E-04	1,43	1,12E-02	MICOS complex subunit Mic19
P54071	1,80E-03	1,26E-03	1,43	8,13E-03	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial
A0A0G2JFQ0	1,69E-03	1,18E-03	1,43	2,51E-02	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (Fragment)
P52825	3,48E-03	2,44E-03	1,43	1,47E-02	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial
Q9R112	7,91E-04	5,54E-04	1,43	2,17E-02	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial
Q3ULD5	2,41E-03	1,69E-03	1,43	3,31E-02	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial
Q9ESU7	6,19E-04	4,39E-04	1,41	7,78E-03	Amino acid transporter
P56395	5,69E-04	4,04E-04	1,41	1,90E-02	Cytochrome b5
A0A140T8J4	4,22E-04	3,00E-04	1,41	1,04E-03	Heme-binding protein 1
Q9DB77	2,02E-03	1,44E-03	1,40	2,18E-03	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial
Q9CQX2	7,14E-04	5,12E-04	1,40	1,01E-03	Cytochrome b5 type B
A0A0G2JF23	1,26E-03	9,06E-04	1,40	1,42E-02	Malate dehydrogenase (Fragment)
P62897	1,56E-03	1,12E-03	1,39	1,07E-02	Cytochrome c, somatic
P10852	7,89E-04	5,66E-04	1,39	1,12E-02	4F2 cell-surface antigen heavy chain
P38647	3,87E-03	2,78E-03	1,39	6,83E-03	Stress-70 protein, mitochondrial
A0A0U1RP81	2,16E-03	1,55E-03	1,39	2,71E-02	MICOS complex subunit MIC60
Q8QZT1	1,47E-03	1,06E-03	1,39	2,35E-03	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial
Q99JI6	7,22E-04	5,20E-04	1,39	2,13E-02	Ras-related protein Rap-1b
P53395	1,39E-03	1,00E-03	1,39	4,29E-03	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial
Q921G7	2,59E-03	1,87E-03	1,38	2,71E-02	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial
Q9D023	7,74E-04	5,59E-04	1,38	1,04E-02	Mitochondrial pyruvate carrier 2
A0A0R4J083	2,47E-03	1,79E-03	1,38	1,78E-02	Long-chain-specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial

A0A1L1STE6	1,66E-03	1,20E-03	1,38	8,78E-03	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial
E9Q800	3,71E-03	2,69E-03	1,38	9,87E-03	MICOS complex subunit MIC60
Q9D2G2	8,71E-04	6,34E-04	1,37	3,07E-02	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial
O09111	3,21E-04	2,34E-04	1,37	1,82E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial
Q6PF96	2,57E-03	1,87E-03	1,37	3,13E-02	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase
P01901	6,83E-04	5,00E-04	1,37	3,57E-03	H-2 class I histocompatibility antigen, K-B alpha chain
Q91ZA3	2,64E-03	1,94E-03	1,37	5,11E-03	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial
Q9CQE1	7,89E-04	5,78E-04	1,36	1,54E-02	Protein NipSnap homolog 3B
Q8CAQ8	3,85E-03	2,83E-03	1,36	8,37E-03	MICOS complex subunit Mic60
E9Q1J7	1,75E-03	1,29E-03	1,36	4,31E-03	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial
Q9DC70	5,07E-04	3,77E-04	1,35	2,41E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial
Q9CR68	8,95E-04	6,65E-04	1,35	9,29E-03	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial
Q9CPQ8	5,16E-04	3,83E-04	1,35	1,76E-02	ATP synthase subunit g, mitochondrial
Q9QZD8	1,57E-03	1,17E-03	1,35	1,93E-02	Mitochondrial dicarboxylate carrier
Q9DBS1	8,21E-04	6,12E-04	1,34	3,09E-03	Transmembrane protein 43
A0A1W2P784	8,84E-04	6,62E-04	1,34	1,15E-02	Extended synaptotagmin-1 (Fragment)
P12787	6,52E-04	4,91E-04	1,33	5,60E-03	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial
Q78IK4	7,95E-04	6,02E-04	1,32	5,52E-03	MICOS complex subunit Mic27
Q8VEM8	1,49E-03	1,13E-03	1,32	1,78E-04	Phosphate carrier protein, mitochondrial
Q99MN9	1,85E-03	1,41E-03	1,31	5,15E-03	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial
Q99JB2	7,75E-04	5,91E-04	1,31	4,75E-03	Stomatin-like protein 2, mitochondrial
P26443	2,77E-03	2,15E-03	1,28	5,07E-03	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial
Q922Q1	1,38E-03	1,08E-03	1,27	4,44E-03	Mitochondrial amidoxime reducing component 2
A2A4I8	2,65E-03	2,09E-03	1,27	1,53E-03	Amine oxidase (Fragment)
O70423	3,86E-03	3,06E-03	1,26	5,93E-03	Membrane primary amine oxidase
P62874	9,97E-04	8,03E-04	1,24	3,07E-04	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1
G3UZP7	9,59E-04	7,96E-04	1,21	2,29E-03	H-2 class I histocompatibility antigen, D-K alpha chain

<b>Proteínas con abundancia significativamente disminuida en mitocondrias de iWAT HFD+SANA (<i>Mus musculus</i>)</b>					
<b>ID UniProt</b>	<b>Señal normalizada (HFD + SANA)</b>	<b>Señal normalizada (HFD)</b>	<b>Tasa de cambio</b>	<b>Valor p</b>	<b>Descripción</b>
O35452	1,11E-04	1,01E-03	9,06	1,74E-02	Tenascin X
A0A5F8MPH8	1,11E-04	9,84E-04	8,86	1,91E-02	Tenascin XB
Q3UQ28	8,97E-05	7,69E-04	8,56	1,87E-02	Peroxidasin homolog
A0A087WRP2	1,40E-04	1,20E-03	8,53	3,04E-03	Laminin subunit alpha-2
Q60675	3,64E-04	2,89E-03	7,93	1,03E-03	Laminin subunit alpha-2
A0A1W2P6L9	8,97E-05	6,95E-04	7,75	2,11E-02	Peroxidasin homolog
Q8BJD1	9,20E-05	5,55E-04	6,04	3,88E-04	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5
P28653	2,22E-04	1,13E-03	5,11	8,10E-03	Biglycan
A0A1W2P7N3	1,77E-04	8,89E-04	5,02	8,14E-04	Laminin subunit alpha-2 (Fragment)
Q62000	1,77E-04	8,29E-04	4,70	6,75E-03	Mimecan
A0A286YCQ5	4,06E-04	1,81E-03	4,46	2,21E-03	Nidogen-2 (Fragment)
O88322	4,59E-04	2,00E-03	4,35	1,89E-03	Nidogen-2
A0A338P6K2	8,74E-04	3,69E-03	4,22	4,25E-04	Myosin-11
P26231	1,40E-04	5,85E-04	4,17	8,05E-03	Catenin alpha-1
A0A2R8VHF9	8,75E-04	3,61E-03	4,13	6,10E-04	Myosin-11
P97298	9,96E-05	3,96E-04	3,97	4,89E-03	Pigment epithelium-derived factor
P31324	9,11E-05	3,61E-04	3,96	1,96E-02	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
Q99JR5	1,09E-04	4,26E-04	3,92	4,05E-04	Tubulointerstitial nephritis antigen-like
P11087	2,78E-04	1,02E-03	3,68	1,43E-02	Collagen alpha-1(I) chain
Q8R0Y6	1,95E-04	7,12E-04	3,64	1,70E-02	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase
Q61292	1,00E-03	3,62E-03	3,60	9,86E-04	Laminin subunit beta-2
E9QN70	8,88E-04	3,17E-03	3,57	4,94E-04	Laminin subunit beta-1
Q60710	9,80E-05	3,44E-04	3,51	2,98E-02	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1
P09405	1,37E-04	4,75E-04	3,46	5,64E-03	Nucleolin
A0A571BDN7	1,20E-04	4,11E-04	3,41	9,28E-03	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4

P11983	1,29E-04	4,40E-04	3,41	9,79E-03	T-complex protein 1 subunit alpha
P46935	1,80E-04	6,08E-04	3,37	1,26E-02	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4
P51885	1,88E-04	6,32E-04	3,36	2,45E-02	Lumican
Q8BLN5	1,08E-04	3,56E-04	3,29	3,66E-03	Lanosterol synthase
E9QPU1	1,61E-04	5,25E-04	3,27	5,59E-04	von Willebrand factor
J3QQ16	2,26E-03	7,33E-03	3,24	1,21E-03	Collagen, type VI, alpha 3
E9PZ16	3,40E-03	1,10E-02	3,24	1,41E-03	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein
E9PWQ3	2,28E-03	7,38E-03	3,23	1,14E-03	Collagen, type VI, alpha 3
Q05793	2,69E-03	8,42E-03	3,13	9,69E-04	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein
Q8BH61	2,65E-04	8,22E-04	3,10	5,96E-03	Coagulation factor XIII A chain
P21981	4,36E-04	1,30E-03	2,98	2,59E-03	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2
F8VQJ3	1,48E-03	4,35E-03	2,95	1,79E-04	Laminin subunit gamma-1
Q04857	8,46E-04	2,45E-03	2,89	2,35E-03	Collagen alpha-1(VI) chain
P97927	9,69E-04	2,80E-03	2,89	9,83E-04	Laminin subunit alpha-4
Q80X90	6,81E-04	1,95E-03	2,86	1,98E-02	Filamin-B
A0A1D5RM59	2,61E-04	7,37E-04	2,83	2,31E-02	Tensin 1
Q9WVL0	1,46E-04	4,09E-04	2,81	1,41E-02	Maleylacetoacetate isomerase
A0A1Y7VL99	2,51E-04	6,97E-04	2,78	3,32E-02	Rab GDP dissociation inhibitor (Fragment)
P80314	1,46E-04	4,03E-04	2,76	1,57E-02	T-complex protein 1 subunit beta
P10493	8,94E-04	2,46E-03	2,76	9,63E-04	Nidogen-1
G5E846	3,04E-04	8,17E-04	2,69	5,18E-03	Peripherin
Q02788	6,30E-04	1,66E-03	2,63	2,28E-03	Collagen alpha-2(VI) chain
Q9JK53	4,20E-04	1,09E-03	2,59	3,19E-03	Prolargin
Q9D7G0	1,38E-04	3,50E-04	2,55	1,34E-02	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1
Q61598	3,52E-04	8,75E-04	2,49	3,09E-02	Rab GDP dissociation inhibitor beta
Q61554	2,88E-03	7,10E-03	2,46	1,23E-03	Fibrillin-1
P28654	6,45E-04	1,55E-03	2,41	7,85E-03	Decorin
P60335	1,68E-04	3,92E-04	2,32	9,75E-03	Poly(rC)-binding protein 1
P62702	2,26E-04	5,20E-04	2,30	2,11E-02	40S ribosomal protein S4, X isoform
Q9JI91	3,56E-04	7,95E-04	2,23	5,74E-03	Alpha-actinin-2

Q7TMB8	1,85E-04	4,08E-04	2,21	2,27E-02	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1
K3W4R2	2,68E-04	5,86E-04	2,19	1,94E-04	Myosin-14
O55222	3,29E-04	7,17E-04	2,18	8,35E-03	Integrin-linked protein kinase
A0A0R4J119	1,77E-04	3,82E-04	2,16	1,47E-02	Cytoplasmic FMR1-interacting protein
O35206	4,38E-04	9,32E-04	2,13	6,68E-05	Collagen alpha-1(XV) chain
A0A1Y7VJN6	3,40E-04	7,18E-04	2,11	2,06E-02	Immunoglobulin heavy constant gamma 3 (Fragment)
A0A1B0GRC0	2,75E-04	5,74E-04	2,09	2,06E-03	Collagen alpha-1(IV) chain (Fragment)
A0A075B5P3	3,53E-04	7,18E-04	2,04	7,09E-03	Immunoglobulin heavy constant gamma 2B (Fragment)
P08122	4,15E-04	8,45E-04	2,04	4,48E-03	Collagen alpha-2(IV) chain
B1ARB3	1,59E-04	3,23E-04	2,03	1,41E-02	Platelet endothelial cell adhesion molecule
P04117	1,95E-03	3,95E-03	2,02	2,24E-02	Fatty acid-binding protein, adipocyte
E9Q3W4	1,97E-03	3,91E-03	1,98	2,80E-02	Plectin
O09164	3,81E-04	7,53E-04	1,98	1,95E-02	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]
E9Q3X0	7,18E-04	1,42E-03	1,97	1,03E-02	Major vault protein
P31001	4,23E-04	8,30E-04	1,96	5,45E-03	Desmin
F6TQW2	4,88E-04	9,55E-04	1,96	2,86E-03	Immunoglobulin heavy constant gamma 2C (Fragment)
P10107	6,60E-04	1,29E-03	1,95	1,44E-02	Annexin A1
P20152	2,70E-03	5,09E-03	1,88	5,92E-03	Vimentin
P02463	4,06E-04	7,58E-04	1,87	7,58E-03	Collagen alpha-1(IV) chain
Q3UH59	6,64E-04	1,23E-03	1,85	2,79E-02	Myosin-10
A0A1B0GSI7	2,75E-04	5,03E-04	1,83	1,83E-04	Collagen alpha-1(IV) chain
Q8C605	3,16E-04	5,72E-04	1,81	3,16E-02	ATP-dependent 6-phosphofructokinase
O08917	1,84E-04	3,30E-04	1,79	1,87E-02	Flotillin-1
A0A1B0GR11	3,11E-04	5,57E-04	1,79	2,21E-02	Transaldolase
Q8CIB5	4,73E-04	8,45E-04	1,79	3,23E-02	Fermitin family homolog 2
Q61753	3,07E-04	5,45E-04	1,77	4,61E-04	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
E9QPX1	3,44E-04	6,01E-04	1,75	8,47E-03	Collagen alpha-1(XVIII) chain
A0A087WR50	1,47E-03	2,56E-03	1,74	7,66E-03	Fibronectin
Q9QZJ6	2,66E-04	4,60E-04	1,73	2,21E-02	Microfibrillar-associated protein 5
B7ZNJ1	1,54E-03	2,62E-03	1,70	7,01E-03	Fibronectin
P13707	8,08E-04	1,35E-03	1,67	2,89E-02	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic

Q7TMM9	9,94E-04	1,66E-03	1,67	3,54E-02	Tubulin beta-2A chain
P99024	1,18E-03	1,94E-03	1,65	2,84E-02	Tubulin beta-5 chain
Q8VHX6	2,98E-04	4,92E-04	1,65	2,98E-03	Filamin-C
Q8BFR5	3,63E-04	5,88E-04	1,62	2,37E-02	Elongation factor Tu, mitochondrial
E9Q4M2	9,75E-04	1,56E-03	1,60	2,27E-02	Hormone-sensitive lipase
P57780	1,49E-03	2,37E-03	1,59	6,77E-03	Alpha-actinin-4
E9Q3B9	5,80E-04	9,03E-04	1,56	2,37E-02	Monoglyceride lipase
D3YYS6	5,80E-04	9,03E-04	1,56	2,37E-02	Monoglyceride lipase
A0A286YCI8	1,98E-04	3,08E-04	1,55	2,60E-02	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1
P68369	1,15E-03	1,77E-03	1,54	3,07E-02	Tubulin alpha-1A chain
Q9CQV8	3,90E-04	5,91E-04	1,52	3,40E-02	14-3-3 protein beta
P68373	1,15E-03	1,70E-03	1,48	3,47E-02	Tubulin alpha-1C chain
Q8VDD5	4,13E-03	6,09E-03	1,47	1,39E-02	Myosin-9
Q8K0E8	9,00E-04	1,33E-03	1,47	2,73E-02	Fibrinogen beta chain
A0A1L1SQ51	2,27E-03	3,33E-03	1,47	3,40E-02	Talin-2
Q7TPR4	1,38E-03	1,97E-03	1,43	1,15E-02	Alpha-actinin-1
A1BN54	1,37E-03	1,96E-03	1,43	1,16E-02	Alpha actinin 1a
P58252	1,46E-03	2,06E-03	1,41	2,68E-02	Elongation factor 2
Q9QXY6	4,60E-04	6,43E-04	1,40	1,99E-02	EH domain-containing protein 3
P62737	1,41E-03	1,97E-03	1,40	3,88E-03	Actin, aortic smooth muscle
contaminant_NRL_1IKFL	6,35E-04	8,81E-04	1,39	1,66E-02	Immunoglobulin igg1-kappa antibody fragment fab complexed With...
A0A2R8VKI5	5,53E-04	7,64E-04	1,38	2,04E-02	Myosin-9 (Fragment)
P68033	1,54E-03	2,04E-03	1,33	5,92E-03	Actin, alpha cardiac muscle 1

### 7.6. Anexo 6. Proteínas exclusivas proteomas mitocondriales de hígado, 4 °C vs 22 °C

ID UniProt	Réplicas	Intensidad normalizada total	Intensidad normalizada 4 ° C_1	Intensidad normalizada 4 ° C_2	Intensidad normalizada 4 ° C_3	Intensidad normalizada 4 ° C_4	Descripción
P21440	4	5,12E-05	1,24E-05	1,86E-05	1,34E-05	6,76E-06	Phosphatidylcholine translocator ABCB4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Abcb4 PE=1 SV=2
Q8VC19	4	0,0001116	1,62E-05	1,70E-06	2,99E-06	9,07E-05	5-aminolevulinate synthase, non-specific, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Alas1 PE=1 SV=2
Q9QXS1	4	1,38E-05	1,15E-05	1,00E-06	4,35E-07	8,15E-07	Plectin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Plec PE=1 SV=3
Q9DCL9	4	8,45E-06	4,57E-06	1,55E-06	1,43E-06	9,01E-07	Bifunctional phosphoribosylaminoimidazole carboxylase/phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Paics PE=1 SV=4
B2RX12	4	9,69E-06	2,37E-06	3,95E-06	2,00E-06	1,37E-06	ATP-binding cassette sub-family C member 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Abcc3 PE=1 SV=2
P52019	4	2,64E-05	1,01E-05	9,51E-06	5,69E-06	1,05E-06	Squalene monooxygenase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sqlc PE=2 SV=1
P58044	4	1,97E-05	3,79E-06	5,39E-06	4,91E-06	5,59E-06	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Idi1 PE=1 SV=1
Q64471	3	1,23E-05	6,37E-06		4,88E-06	1,07E-06	Glutathione S-transferase theta-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gstt1 PE=1 SV=4
Q5HZI9	3	6,32E-06	2,56E-06		1,14E-06	2,62E-06	Mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide transporter SLC25A51 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a51 PE=1 SV=1
Q3UTJ2	3	3,21E-05	2,39E-05	3,64E-06	4,57E-06		Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sorbs2 PE=1 SV=2
Q9JJH1	3	6,69E-06	2,33E-06	2,26E-06	2,10E-06		Ribonuclease 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rnase4 PE=1 SV=1

Q9CRA7	3	5,12E-06	1,57E-06	1,25E-06		2,30E-06	ATP synthase subunit s, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dmac2l PE=1 SV=1
O70572	3	1,17E-05		3,52E-06	4,49E-06	3,71E-06	Sphingomyelin phosphodiesterase 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Smpd2 PE=1 SV=1
Q9CQS4	2	6,27E-06	3,61E-06		2,66E-06		Mitochondrial outer membrane protein SLC25A46 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a46 PE=1 SV=1
P48776	2	1,45E-05	1,14E-05	3,15E-06			Tryptophan 2,3-dioxygenase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tdo2 PE=1 SV=2
Q8R0W0	2	7,21E-06	1,96E-06	5,25E-06			Epiplakin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eppk1 PE=1 SV=2
B2RXS4	2	7,08E-06	1,65E-06		5,43E-06		Plexin-B2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Plxnb2 PE=1 SV=1
P55264	2	6,70E-06	5,52E-06		1,18E-06		Adenosine kinase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Adk PE=1 SV=2
P49182	2	3,21E-05	3,00E-05		2,05E-06		Heparin cofactor 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Serpind1 PE=1 SV=1
P06802	2	2,96E-06	1,90E-06	1,05E-06			Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Enpp1 PE=1 SV=4
Q8VC48	2	1,21E-06	6,79E-07		5,35E-07		Peroxisome assembly protein 12 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pex12 PE=1 SV=1
P16294	2	1,46E-06	7,54E-07			7,09E-07	Coagulation factor IX OS=Mus musculus OX=10090 GN=F9 PE=2 SV=3
Q9DAS9	2	4,95E-06	3,07E-06	1,88E-06			Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gng12 PE=1 SV=3
P31649	2	4,73E-06	2,84E-06		1,89E-06		Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc6a13 PE=1 SV=1
Q8BXA1	2	1,58E-06		7,90E-07	7,87E-07		Golgi integral membrane protein 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Golim4 PE=1 SV=1
Q9ES97	2	8,46E-06		5,66E-06	2,81E-06		Reticulon-3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rtn3 PE=1 SV=2

Q61598	2	2,38E-05			6,94E-06	1,68E-05	Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gdi2 PE=1 SV=1
--------	---	----------	--	--	----------	----------	---

ID UniProt	Réplicas	Intensidad normalizada total	Intensidad normalizada 22 ° C_1	Intensidad normalizada 22 ° C_2	Intensidad normalizada 22 ° C_3	Intensidad normalizada 22 ° C_4	Descripción
Q9ET01	4	2,88E-05	5,03E-06	1,38E-05	7,61E-06	2,35E-06	Glycogen phosphorylase, liver form OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pygl PE=1 SV=4
Q9DB05	4	1,06E-05	2,32E-06	3,68E-06	1,46E-06	3,13E-06	Alpha-soluble NSF attachment protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Napa PE=1 SV=1
P13516	4	0,00013572	1,75E-05	6,67E-05	2,02E-05	3,12E-05	Acyl-CoA desaturase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Scd1 PE=1 SV=2
Q99N89	4	1,47E-05	4,24E-06	3,71E-06	3,33E-06	3,40E-06	Large ribosomal subunit protein mL43 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mrpl43 PE=1 SV=1
Q8BKX6	4	1,89E-05	4,59E-06	6,32E-06	3,93E-06	4,08E-06	Serine/threonine-protein kinase SMG1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Smg1 PE=1 SV=3
Q922Q9	4	2,54E-05	2,87E-06	2,04E-06	2,59E-06	1,79E-05	Chitinase domain-containing protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Chid1 PE=1 SV=1
Q91X78	4	1,35E-05	2,98E-06	4,23E-06	3,13E-06	3,13E-06	Erlin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Erlin1 PE=1 SV=2
Q9R0X4	3	7,62E-06	2,84E-06	3,59E-06		1,19E-06	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acot9 PE=1 SV=1
Q6ZQ58	3	2,77E-06	2,59E-07		1,75E-06	7,53E-07	La-related protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Larp1 PE=1 SV=3
Q8K182	3	9,93E-06	3,29E-06	3,19E-06	3,45E-06		Complement component C8 alpha chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=C8a PE=1 SV=1
Q9Z2G6	3	7,38E-06	3,13E-06	2,77E-06		1,48E-06	Protein sel-1 homolog 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sel1l PE=1 SV=2
Q8BP48	3	4,74E-06	1,67E-06		1,30E-06	1,77E-06	Methionine aminopeptidase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Metap1 PE=1 SV=1
Q80YT7	3	0,0001642	6,20E-05	5,45E-05		4,76E-05	Myomegalin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pde4dip PE=1 SV=2

P61750	3	4,05E-05	2,86E-05	8,31E-06	3,53E-06		ADP-ribosylation factor 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf4 PE=1 SV=2
Q80WW9	3	2,71E-06	6,91E-07		9,56E-07	1,06E-06	DDRKG domain-containing protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ddrkg1 PE=1 SV=2
P61166	3	1,95E-05		9,29E-06	5,60E-06	4,64E-06	Transmembrane protein 258 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tmem258 PE=1 SV=1
Q9D964	2	3,92E-06	1,84E-06	2,08E-06			Glycine amidinotransferase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gatm PE=1 SV=1
Q6A0A9	2	2,71E-05	2,66E-05	5,11E-07			Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=FAM120A PE=1 SV=2
P54818	2	1,76E-05	8,21E-06	9,38E-06			Galactocerebrosidase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Galc PE=1 SV=2
Q8VEH8	2	1,78E-06	6,06E-07	1,18E-06			Endoplasmic reticulum lectin 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Erlec1 PE=1 SV=1
Q8K0R6	2	0,00026425	0,000255936			8,31E-06	Glycolipid transfer protein domain-containing protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gltpd2 PE=1 SV=1
P58064	2	6,98E-06	4,15E-06			2,83E-06	Small ribosomal subunit protein bS6m OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mrps6 PE=1 SV=3
Q3TIV5	2	5,26E-06	2,85E-06	2,41E-06			Zinc finger CCCH domain-containing protein 15 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Zc3h15 PE=1 SV=2
P70122	2	4,51E-06	2,75E-06	1,76E-06			Ribosome maturation protein SBDS OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sbds PE=1 SV=4
Q3UN02	2	1,44E-05	2,46E-06	1,20E-05			Lysocardiolipin acyltransferase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lclat1 PE=1 SV=2
Q8C6I2	2	3,92E-06	2,20E-06			1,71E-06	Succinate dehydrogenase assembly factor 2, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sdhaf2 PE=1 SV=1
P08905	2	1,50E-05	4,15E-06	1,09E-05			Lysozyme C-2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lyz2 PE=1 SV=2
P59266	2	2,79E-05	1,23E-05	1,56E-05			Acyl-coenzyme A diphosphatase FITM2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Fitm2 PE=1 SV=1

Q9Z0L8	2	3,62E-06	1,59E-06	2,03E-06			Gamma-glutamyl hydrolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ggh PE=1 SV=2
Q91WT8	2	6,42E-06	4,08E-06	2,34E-06			RNA-binding protein 47 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rbm47 PE=1 SV=1
P06330	2	3,68E-05		2,07E-05		1,60E-05	Ig heavy chain V region AC38 205.12 OS=Mus musculus OX=10090 PE=1 SV=1
P70670	2	5,36E-05		2,06E-05	3,30E-05		Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form OS=Mus musculus OX=10090 GN=Naca PE=1 SV=2
Q9QX60	2	2,21E-05		1,01E-05		1,20E-05	Deoxyguanosine kinase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dguok PE=1 SV=3
Q61545	2	6,38E-06		2,85E-06		3,53E-06	RNA-binding protein EWS OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ewsr1 PE=1 SV=2
Q9DBY1	2	3,64E-06		1,80E-06	1,85E-06		E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Synv1 PE=1 SV=3

### 7.7. Anexo 7. Proteínas de unión a SANA

Proteínas exclusivamente detectadas (seleccionadas usando criterio Lenient de Patternlab) en BAT+bSANA (p<0.05)		
ID UniProt	Conteo de espectros total	Descripción
Q91ZJ5	184	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ugp2 PE=1 SV=3
P58252	117	Elongation factor 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eef2 PE=1 SV=2
Q6P8J7	77	Creatine kinase S-type, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ckmt2 PE=1 SV=1
Q9WUD0	77	Cytochrome P450 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cyp2b10 PE=1 SV=1
P68372	61	Tubulin beta-4B chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb4b PE=1 SV=1
Q8BH59	61	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a12 PE=1 SV=1
Q00612	59	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X OS=Mus musculus OX=10090 GN=G6pdx PE=1 SV=3
Q8CAQ8	59	MICOS complex subunit Mic60 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Immt PE=1 SV=1
F8VFN4	58	Glycogen debrancher OS=Mus musculus OX=10090 GN=Agl PE=1 SV=1
O55126	56	Protein NipSnap homolog 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Nipsnap2 PE=1 SV=1
Q9CR62	55	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a11 PE=1 SV=3
Q8JZU2	54	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a1 PE=1 SV=1
Q6PIE5	54	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atp1a2 PE=1 SV=1
Q14BI5	53	Myomesin 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Myom2 PE=1 SV=1
Q9D172	50	Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 3, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gatd3 PE=1 SV=1
O08709	49	Peroxiredoxin-6 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prdx6 PE=1 SV=3
Q9DC70	47	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufs7 PE=1 SV=1
Q3U367	47	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aldh9a1 PE=1 SV=1
Q6PB66	44	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lrppe PE=1 SV=2
Q8K3J1	43	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufs8 PE=1 SV=1
Q9D6F9	42	Tubulin beta-4A chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb4a PE=1 SV=3
B1AXW5	41	Peroxiredoxin-1 (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prdx1 PE=1 SV=8
A2AKU9	41	ATP synthase subunit gamma OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atp5c1 PE=1 SV=1
O70503	39	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hsd17b12 PE=1 SV=1

Q8C2Q8	39	ATP synthase subunit gamma OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atp5c1 PE=1 SV=1
P30275	38	Creatine kinase U-type, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ckmt1 PE=1 SV=1
P31324	38	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prkar2b PE=1 SV=3
Q8CHT0	38	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aldh4a1 PE=1 SV=3
Q9CQ75	37	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufa2 PE=1 SV=3
Q60936	36	Atypical kinase COQ8A, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Coq8a PE=1 SV=2
F7BME0	36	Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase B (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mgat4b PE=1 SV=1
Q05421	35	Cytochrome P450 2E1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cyp2e1 PE=1 SV=1
Q8CGK3	35	Lon protease homolog, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lonp1 PE=1 SV=2
P61982	34	14-3-3 protein gamma OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ywhag PE=1 SV=2
P63030	33	Mitochondrial pyruvate carrier 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mpc1 PE=1 SV=1
Q8BJ56	33	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pnpla2 PE=1 SV=1
Q8VCW8	33	Medium-chain acyl-CoA ligase ACSF2, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acsf2 PE=1 SV=1
Q9Z2V4	32	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP] OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pck1 PE=1 SV=1
Q99JR1	31	Sideroflexin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sfxn1 PE=1 SV=3
Q9D8N0	30	Elongation factor 1-gamma OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eef1g PE=1 SV=3
Q9CQN1	30	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Trap1 PE=1 SV=1
P10605	30	Cathepsin B OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ctsb PE=1 SV=2
Q1XH17	30	Tripartite motif-containing protein 72 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Trim72 PE=1 SV=1
Q922F4	29	Tubulin beta-6 chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb6 PE=1 SV=1
P14602	29	Heat shock protein beta-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hspb1 PE=1 SV=3
Q64516	28	Glycerol kinase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gk PE=1 SV=2
Q8R0Y6	28	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aldh1l1 PE=1 SV=1
Q9CZB0	27	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sdhc PE=1 SV=1
Q99KQ4	27	Nicotinamide phosphoribosyltransferase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Nampt PE=1 SV=1
Q76MZ3	27	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ppp2r1a PE=1 SV=3
Q04447	27	Creatine kinase B-type OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ckb PE=1 SV=1
P16332	26	Methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mmut PE=1 SV=2
Q9D6J6	26	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufv2 PE=1 SV=2
Q60930	26	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Vdac2 PE=1 SV=2
P60843	26	Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eif4a1 PE=1 SV=1
Q01853	25	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Vcp PE=1 SV=4
A0A140LI U4	25	Cytochrome c oxidase subunit 7A1, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cox7a1 PE=1 SV=1
P58281	25	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Opa1 PE=1 SV=1
A0A1B0GT 92	24	Glycogen [starch] synthase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gys1 PE=1 SV=1

A0A0R4J0 P1	24	Isobutyryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acad8 PE=1 SV=1
Q9Z2I8	24	Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Suclg2 PE=1 SV=3
Q9D881	23	Cytochrome c oxidase polypeptide Vb OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cox5b-ps PE=1 SV=1
P09528	23	Ferritin heavy chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Fth1 PE=1 SV=2
Q3U125	23	Peroxiredoxin-like 2 activated in M-CSF stimulated monocytes OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prx12a PE=1 SV=1
P63101	23	14-3-3 protein zeta/delta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ywhaz PE=1 SV=1
O70423	23	Membrane primary amine oxidase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aoc3 PE=1 SV=3
A0A494BA W2	23	GST class-pi OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gstp1 PE=1 SV=1
P00329	23	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Adh1 PE=1 SV=2
P62827	22	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ran PE=1 SV=3
Q9CQQ7	22	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atp5pb PE=1 SV=1
Q00623	22	Apolipoprotein A-I OS=Mus musculus OX=10090 GN=Apoa1 PE=1 SV=2
P68040	22	Receptor of activated protein C kinase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rack1 PE=1 SV=3
P63330	22	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ppp2ca PE=1 SV=1
Q9CQJ8	22	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufb9 PE=1 SV=3
Q9D819	22	Inorganic pyrophosphatase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ppa1 PE=1 SV=1
O54724	21	Caveolae-associated protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cavin1 PE=1 SV=1
Q9D517	21	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gamma OS=Mus musculus OX=10090 GN=Agpat3 PE=1 SV=2
P14824	21	Annexin A6 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Anxa6 PE=1 SV=3
P50171	20	(3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hsd17b8 PE=1 SV=2
Q8VHX6	20	Filamin-C OS=Mus musculus OX=10090 GN=Flnc PE=1 SV=3
Q9DCS9	20	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufb10 PE=1 SV=3
P55258	19	Ras-related protein Rab-8A OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rab8a PE=1 SV=2
Q8K010	19	5-oxoprolinase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Oplah PE=1 SV=1
Q61171	19	Peroxiredoxin-2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prdx2 PE=1 SV=3
Q9D6Y9	19	1,4-alpha-glucan-branching enzyme OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gbe1 PE=1 SV=1
A0A1B0G X27	19	Branched-chain-amino-acid aminotransferase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Bcat2 PE=1 SV=1
P50637	19	Translocator protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tspo PE=1 SV=1
P45376	19	Aldo-keto reductase family 1 member B1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Akr1b1 PE=1 SV=3
Q9DBB8	19	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dhdh PE=1 SV=1
P68181	19	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prkacb PE=1 SV=2
Q8CC88	19	von Willebrand factor A domain-containing protein 8 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Vwa8 PE=1 SV=2
G5E8R7	19	Histone-lysine N-methyltransferase Smyd1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Smyd1 PE=1 SV=1
Q02053	19	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Uba1 PE=1 SV=1
A2AE89	19	Glutathione transferase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gstm1 PE=1 SV=2
O35459	19	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ech1 PE=1 SV=1

P26039	19	Talin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tln1 PE=1 SV=2
P35979	18	60S ribosomal protein L12 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rpl12 PE=1 SV=2
A0A0A6YXF6	18	Transforming protein RhoA (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rhoa PE=1 SV=1
Q8VHQ9	18	Acyl-coenzyme A thioesterase 11 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acot11 PE=1 SV=1
Q9DBL1	18	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acadsb PE=1 SV=1
Z4YJF5	18	Myomesin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Myom1 PE=1 SV=1
P05132	18	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prkaca PE=1 SV=3
Q08857	18	Platelet glycoprotein 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cd36 PE=1 SV=2
Q9CQV8	18	14-3-3 protein beta/alpha OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ywhab PE=1 SV=3
P20108	17	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prdx3 PE=1 SV=1
Q6PHN9	17	Ras-related protein Rab-35 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rab35 PE=1 SV=1
J3QMG3	17	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Vdac3 PE=1 SV=1
A3KGU7	17	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sptan1 PE=1 SV=1
E9QJW0	16	Glutathione transferase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mgst1 PE=1 SV=1
Q8K3K7	16	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase beta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Agpat2 PE=1 SV=1
A0A0R4J140	16	Clustered mitochondria protein homolog OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cluh PE=1 SV=1
P28650	16	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Adss1 PE=1 SV=2
Q8BW75	16	Amine oxidase [flavin-containing] B OS=Mus musculus OX=10090 GN=Maob PE=1 SV=4
P11983	16	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tcp1 PE=1 SV=3
Q8R4N0	16	Citramalyl-CoA lyase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Clybl PE=1 SV=2
Q8JZQ2	16	AFG3-like protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Afg3l2 PE=1 SV=1
Q8R2H9	15	Phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Phospho1 PE=1 SV=1
P42932	15	T-complex protein 1 subunit theta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cct8 PE=1 SV=3
F8WIV2	15	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6a OS=Mus musculus OX=10090 GN=Serpib6a PE=1 SV=1
Q9CR61	15	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufb7 PE=1 SV=3
Q6R0H7	15	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gnas PE=1 SV=1
Q99NB1	15	Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acss1 PE=1 SV=1
Q9EP69	15	Phosphatidylinositol-3-phosphatase SAC1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sacm1l PE=1 SV=1
Q8QZS1	15	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hibch PE=1 SV=1
Q9EQH3	15	Vacuolar protein sorting-associated protein 35 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Vps35 PE=1 SV=1
P34914	15	Bifunctional epoxide hydrolase 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ephx2 PE=1 SV=2
Q8CBB6	14	Histone H2B OS=Mus musculus OX=10090 GN=H2bc24 PE=2 SV=1
Q6ZWN5	14	40S ribosomal protein S9 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rps9 PE=1 SV=3
D3YVP6	14	Glutathione S-transferase Mu 7 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gstm7 PE=1 SV=2
G3X8R0	14	Receptor expression-enhancing protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Reep5 PE=1 SV=1
A0A0R4J094	14	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing 2A OS=Mus musculus OX=10090 GN=Fahd2a PE=1 SV=1

P08113	14	Endoplasmin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hsp90b1 PE=1 SV=2
P62259	14	14-3-3 protein epsilon OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ywhae PE=1 SV=1
Q9D6J5	14	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufb8 PE=1 SV=1
P09103	14	Protein disulfide-isomerase OS=Mus musculus OX=10090 GN=P4hb PE=1 SV=2
B7FAU9	14	Filamin, alpha OS=Mus musculus OX=10090 GN=Flna PE=1 SV=1
Q62261	14	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sptbn1 PE=1 SV=2
Q9CQH3	14	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufb5 PE=1 SV=1
Q9QYG0	13	Protein NDRG2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndr2 PE=1 SV=1
P14148	13	60S ribosomal protein L7 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rpl7 PE=1 SV=2
Q8BUE4	13	Ferroptosis suppressor protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aifm2 PE=1 SV=1
P50172	13	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hsd11b1 PE=1 SV=3
O08529	13	Calpain-2 catalytic subunit OS=Mus musculus OX=10090 GN=Capn2 PE=1 SV=4
P50516	13	V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atp6v1a PE=1 SV=2
P06801	12	NADP-dependent malic enzyme OS=Mus musculus OX=10090 GN=Me1 PE=1 SV=2
Z4YKT6	12	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dhrs7b PE=1 SV=1
Q9D880	12	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Timm50 PE=1 SV=1
Q9D9V3	12	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Echdc1 PE=1 SV=2
Q9CXZ1	12	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufs4 PE=1 SV=3
Q9WTP6	12	Adenylate kinase 2, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ak2 PE=1 SV=5
P62301	12	40S ribosomal protein S13 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rps13 PE=1 SV=2
Q9CZD3	12	Glycine--tRNA ligase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gars1 PE=1 SV=1
P27773	12	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pdia3 PE=1 SV=2
Q9CQZ6	12	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufb3 PE=1 SV=1
Q9QZD8	12	Mitochondrial dicarboxylate carrier OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a10 PE=1 SV=2
Q9DCZ1	12	GMP reductase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gmpr PE=1 SV=1
O70571	12	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 4, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pdk4 PE=1 SV=1
Q8BFP9	12	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 1, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pdk1 PE=1 SV=2
Q08642	12	Protein-arginine deiminase type-2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Padi2 PE=1 SV=2
Q9WVK4	12	EH domain-containing protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ehd1 PE=1 SV=1
Q9R0H0	12	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acox1 PE=1 SV=5
Q91V55	11	40S ribosomal protein S5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rps5 PE=1 SV=1
Q91V41	11	Ras-related protein Rab-14 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rab14 PE=1 SV=3
Q62087	11	Serum paraoxonase/lactonase 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pon3 PE=1 SV=2
H3BKH6	11	S-formylglutathione hydrolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Esd PE=1 SV=1
F7DBQ0	11	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pdia6 PE=1 SV=1

P14685	11	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Psmc3 PE=1 SV=3
P54822	11	Adenylosuccinate lyase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Adsl PE=1 SV=2
P04919	11	Band 3 anion transport protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc4a1 PE=1 SV=1
P28271	11	Cytoplasmic aconitate hydratase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aco1 PE=1 SV=3
Q8JZN5	11	Complex I assembly factor ACAD9, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acad9 PE=1 SV=2
O35945	11	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aldh1a7 PE=1 SV=1
P50462	11	Cysteine and glycine-rich protein 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Csrp3 PE=1 SV=1
P80318	11	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cct3 PE=1 SV=1
D3Z7X0	11	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 12 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acad12 PE=1 SV=1
Q8VEE1	11	LIM and cysteine-rich domains protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lmed1 PE=1 SV=1
Q9DCX2	11	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atp5pd PE=1 SV=3
Q60714	11	Long-chain fatty acid transport protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc27a1 PE=1 SV=1
O35488	11	Very long-chain acyl-CoA synthetase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc27a2 PE=1 SV=2
O55222	11	Integrin-linked protein kinase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ilk PE=1 SV=2
Q99L04	11	Dehydrogenase/reductase SDR family member 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dhrs1 PE=1 SV=1
Q8R0Y8	11	Mitochondrial coenzyme A transporter SLC25A42 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a42 PE=1 SV=1
B1AR13	11	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 3, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cisd3 PE=1 SV=1
J3QP71	10	Basigin (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Bsg PE=1 SV=1
Q62264	10	Thyroid hormone-inducible hepatic protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Thrsp PE=1 SV=1
Q9D6M3	10	Mitochondrial glutamate carrier 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a22 PE=1 SV=1
Q8CG76	10	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Akr7a2 PE=1 SV=3
Q8VE95	10	UPF0598 protein C8orf82 homolog OS=Mus musculus OX=10090 PE=1 SV=1
Q9D8B4	10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufa11 PE=1 SV=2
P80316	10	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cct5 PE=1 SV=1
P50285	10	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Fmo1 PE=1 SV=1
S4R1E5	9	Glutathione peroxidase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gpx4 PE=1 SV=1
P62267	9	40S ribosomal protein S23 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rps23 PE=1 SV=3
Q9CPQ8	9	ATP synthase subunit g, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atp5mg PE=1 SV=1
P16045	9	Galectin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lgals1 PE=1 SV=3
Q922B2	9	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dars1 PE=1 SV=2
Q9DBL9	9	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase ABHD5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Abhd5 PE=1 SV=1
P84078	9	ADP-ribosylation factor 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf1 PE=1 SV=2
P85094	9	Isochorismatase domain-containing protein 2A OS=Mus musculus OX=10090 GN=Isoc2a PE=1 SV=1
O54734	8	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ddost PE=1 SV=2
A2A815	8	Maillard deglycase (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Park7 PE=1 SV=8
Q925N0	8	Sideroflexin-5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sfxn5 PE=1 SV=2
Q9CXT8	8	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pmpcb PE=1 SV=1
Q9Z2X1	8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hnrnpf PE=1 SV=3

O35683	8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufa1 PE=1 SV=1
A2AKW0	7	Mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide transporter SLC25A51 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a51 PE=1 SV=1
P80317	7	T-complex protein 1 subunit zeta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cct6a PE=1 SV=3
Q52L67	7	Gpsn2 protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tecr PE=1 SV=1
Q8BG05	7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hnrnpa3 PE=1 SV=1
Q9QYB1	7	Chloride intracellular channel protein 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Clic4 PE=1 SV=3
A0A1B0GR11	7	Transaldolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Taldo1 PE=1 SV=1
Q3TLP8	7	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rac1 PE=1 SV=1
A0A0A6YVV2	7	Glutathione peroxidase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gpx1 PE=1 SV=1
Q811J3	7	Iron-responsive element-binding protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ireb2 PE=1 SV=2
Q925I1	7	ATPase family AAA domain-containing protein 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atad3 PE=1 SV=1
Q8R164	7	Valacyclovir hydrolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Bphl PE=1 SV=1
A2A6J8	7	Troponin I, fast skeletal muscle (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tnni2 PE=1 SV=1
Q64433	7	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hspe1 PE=1 SV=2
P84084	7	ADP-ribosylation factor 5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf5 PE=1 SV=2
D3Z670	7	Complex I-B9 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufa3 PE=1 SV=1
Q9CQR4	7	Acyl-coenzyme A thioesterase 13 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acot13 PE=1 SV=1
Q8VDM4	7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Psm2 PE=1 SV=1
Q99J39	7	Malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mlycd PE=1 SV=1
O08553	7	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dpysl2 PE=1 SV=2
Q91VT4	7	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cbr4 PE=1 SV=2
Q922Q1	7	Mitochondrial amidoxime reducing component 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mtarc2 PE=1 SV=1
P35293	6	Ras-related protein Rab-18 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rab18 PE=1 SV=2
Q91VI7	6	Ribonuclease inhibitor OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rnh1 PE=1 SV=1
G3UY29	6	Ras-related protein Rab-11B OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rab11b PE=4 SV=1
Q9DCM2	6	Glutathione S-transferase kappa 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gstk1 PE=1 SV=3
P46412	6	Glutathione peroxidase 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gpx3 PE=1 SV=2
E9Q039	6	Aminopeptidase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Npepps PE=1 SV=1
P11152	6	Lipoprotein lipase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lpl PE=1 SV=3
Q9CRB9	6	MICOS complex subunit Mic19 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Chchd3 PE=1 SV=1
P62918	6	60S ribosomal protein L8 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rpl8 PE=1 SV=2

<b>Proteínas con abundancia significativamente incrementada en BAT+bSANA</b>			
<b>ID UniProt</b>	<b>Tasa de cambio</b>	<b>Valor p</b>	<b>Descripción</b>
Q3V117	14,3696914	1,04E-05	ATP-citrate synthase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acly PE=1 SV=1
Q91WD5	4,67098184	1,00E-05	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufs2 PE=1 SV=1
O08528	4,20953852	1,00E-05	Hexokinase-2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hk2 PE=1 SV=1
Q5XKE0	3,97002849	0,000911	Myosin-binding protein C, fast-type OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mybpc2 PE=1 SV=1
P15105	3,8807171	2,89E-05	Glutamine synthetase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Glul PE=1 SV=6
Q7TQ48	3,72839998	1,00E-05	Sarcalumenin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Srl PE=1 SV=2
P47738	3,59899813	3,93E-05	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aldh2 PE=1 SV=1
Q91VD9	3,55154779	2,51E-05	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufs1 PE=1 SV=2
Q924X2	3,47554115	0,000865	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cpt1b PE=1 SV=1
P19096	3,43380976	3,19E-05	Fatty acid synthase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Fasn PE=1 SV=2
Q8VEM8	3,22770314	0,008848	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a3 PE=1 SV=1
Q9Z2Z6	3,21430409	1,17E-05	Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a20 PE=1 SV=1
Q8BFR5	3,04862645	0,00041	Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tufm PE=1 SV=1
Q9DC69	2,85496902	0,001461	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufa9 PE=1 SV=2
O88844	2,84084433	0,00019	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic OS=Mus musculus OX=10090 GN=Idh1 PE=1 SV=2
D3Z041	2,70173207	1,00E-05	Arachidonate--CoA ligase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acs11 PE=1 SV=1
P47857	2,66751764	0,001276	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pfkm PE=1 SV=3
Q9DCT2	2,65043147	0,000159	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufs3 PE=1 SV=2
P12382	2,57983609	0,000275	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pfkl PE=1 SV=4
Q64521	2,56037658	5,39E-05	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gpd2 PE=1 SV=2
P11499	2,43546367	1,00E-05	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=3
Q8JZR0	2,37038638	0,000307	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acs15 PE=1 SV=1
Q9D6R2	2,36821323	4,33E-05	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Idh3a PE=1 SV=1
P05213	2,35293472	0,001722	Tubulin alpha-1B chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tuba1b PE=1 SV=2
E9Q4M2	2,32261532	0,000241	Hormone-sensitive lipase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lipe PE=1 SV=1
P68369	2,31706474	0,001587	Tubulin alpha-1A chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tuba1a PE=1 SV=1
P68368	2,31207374	0,001082	Tubulin alpha-4A chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tuba4a PE=1 SV=1

Q99LC3	2,29664178	1,28E-05	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufa10 PE=1 SV=1
Q8R429	2,28693298	1,76E-05	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atp2a1 PE=1 SV=1
Q8BH64	2,18434382	0,001717	EH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ehd2 PE=1 SV=1
P51881	2,13814879	9,11E-05	ADP/ATP translocase 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a5 PE=1 SV=3
Q8K2B3	2,07649301	5,17E-05	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sdha PE=1 SV=1
Q91YT0	2,00274405	0,001064	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufv1 PE=1 SV=1
P13707	1,99992301	1,00E-05	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gpd1 PE=1 SV=3
P63038	1,99895144	2,33E-05	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hspd1 PE=1 SV=1
Q5SX39	1,9887108	0,003341	Myosin-4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Myh4 PE=1 SV=1
Q8BH95	1,9802811	0,014551	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Echs1 PE=1 SV=1
P68033	1,97603973	1,00E-05	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Actc1 PE=1 SV=1
O55143	1,97053495	0,000136	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atp2a2 PE=1 SV=2
P23927	1,96921249	0,004116	Alpha-crystallin B chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cryab PE=1 SV=2
Q8CGN5	1,85682167	9,55E-05	Perilipin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Plin1 PE=1 SV=2
P63260	1,82792744	1,00E-05	Actin, cytoplasmic 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Actg1 PE=1 SV=1
Q9D051	1,8007823	0,000162	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pdhb PE=1 SV=1
Q9CQA3	1,80041773	0,000754	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sdhb PE=1 SV=1
Q8QZT1	1,79973847	0,000157	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acat1 PE=1 SV=1
Q9Z219	1,79577575	0,000133	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sucla2 PE=1 SV=2
P48962	1,79558877	7,70E-05	ADP/ATP translocase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Slc25a4 PE=1 SV=4
Q91VA7	1,77040944	0,000139	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Idh3b PE=1 SV=1
Q5SX40	1,76898087	0,004701	Myosin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Myh1 PE=1 SV=1
O09165	1,74821953	0,033433	Calsequestrin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Casq1 PE=1 SV=3
B1AR69	1,7443839	0,008892	Myosin, heavy polypeptide 13, skeletal muscle OS=Mus musculus OX=10090 GN=Myh13 PE=1 SV=1
P70404	1,73059189	0,001871	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma 1, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Idh3g PE=1 SV=1
B0QZL1	1,7199675	0,000111	2-phospho-D-glycerate hydro-lyase (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eno1 PE=1 SV=1
Q9CZ13	1,71200223	0,008003	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Uqcrc1 PE=1 SV=2
Q9CQ62	1,64820718	2,07E-05	2,4-dienoyl-CoA reductase [(3E)-enoyl-CoA-producing], mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Decr1 PE=1 SV=1
O35129	1,64706506	0,001632	Prohibitin-2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Phb2 PE=1 SV=1
Q61425	1,62846815	0,002727	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hadh PE=1 SV=2
Q9D0M3	1,60960467	0,019888	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cyc1 PE=1 SV=1

Anexos

---

A0A0A0MQF6	1,59073134	1,67E-05	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gapdh PE=1 SV=1
Q9ERS2	1,54565845	0,011641	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufa13 PE=1 SV=3