



Curriculum Vitae

Mariana MARGENAT ARRAMBIDE



Actualizado: 23/10/2017

Publicado: 23/10/2017

Sistema Nacional de Investigadores

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas

Categorización actual: Iniciación

Ingreso al SNI: Activo(01/06/2016)

Datos generales

Información de contacto

E-mail: mariana.margenat@gmail.com

Teléfono: 27106761

Institución principal

Sección Bioquímica y Biología Molecular / Facultad de Ciencias - UDeLaR / Universidad de la República / Uruguay

Dirección institucional

Dirección: Institut Pasteur de Montevideo / Laboratorio de Inmunovirología. Mataojo 2020 / 11400 / Montevideo / Montevideo / Uruguay

Teléfono: (+00598) 25220910

E-mail/Web: mariana.margenat@gmail.com

Formación

Formación concluida

Formación académica/Titulación

Posgrado

2010 - 2016

Doctorado

Doctorado en Ciencias Biológicas (UDELAR-PEDECIBA)

Facultad de Ciencias - UDeLaR, Universidad de la República , Uruguay

Título: Fosfatasa en tirosina de Mycobacterium tuberculosis: avances en la identificación de sustratos y posible rol en la adaptación de la bacteria al macrófago.

Tutor/es: Dra. Andrea Villarino y cotutora Dra. Ana María Ferreira

Obtención del título: 2016

Becario de: Agencia Nacional de Investigación e Innovación , Uruguay

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis; fosfatasa en fosfotirosina; señalización celular

Áreas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Fosfatasa en tirosina bacterianas/ Señalización celular

1996 - 1999

Maestría

Magister en Química

Facultad de Química - UDeLaR, Universidad de la República , Uruguay

Título: Estudio de la ciclofilina de Echinococcus granulosus

Tutor/es: Dra. Cecilia Fernández y Dra. Mónica Marín

Obtención del título: 2003

Palabras clave: E.granulosus; Ciclofilina; PPIasas

Áreas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Grado

1990 - 1996

Grado

Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias - UDeLaR, Universidad de la República , Uruguay

Título: Estudio de proteasas en taquizoitos de Toxoplasma gondii

Tutor/es: Julio Battistoni

Obtención del título: 1996

Palabras clave: proteasas

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Formación complementaria

Cursos corta duración

03 / 2014 - 04 / 2014

Curso de Gestión de calidad en los laboratorios, dictado por Dra Pilar Rodriguez (Skaphia)

Facultad de Ciencias - UDeLaR, Universidad de la República , Uruguay

06 / 2011 - 06 / 2011

Introducción a la citometría de flujo y manejo del equipo CyAn. UBP

Institut Pasteur de Montevideo, Institut Pasteur de Montevideo , Uruguay

03 / 2010 - 03 / 2010

Producción de Proteínas recombinantes

Facultad de Ciencias - UDeLaR, Universidad de la República , Uruguay

Palabras clave: proteínas recombinantes

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Producción de proteínas recombinantes

11 / 1996 - 11 / 1996

Utilización de emisores beta como trazadores en sistemas biológicos: seguridad en la manipulación y correcta medición

Facultad de Química - UDeLaR, Universidad de la República , Uruguay

10 / 1996 - 11 / 1996

Caracterización, estructura y función de macromoléculas de parásitos

Instituto Nacional De Investigaci3n de Enfermedad de Chagas , Argentina

04 / 1995 - 04 / 1995

Estructura y Modelización de Proteínas; dictado por Prof. Pedro Alzari, G. Pérez y E. Osinaga

Facultad de Ciencias - UDeLaR, Universidad de la República , Uruguay

Otras instancias

2017

Congresos

Nombre del evento: XVI Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias

Institución organizadora: SUB , Uruguay

2014

Congresos

Nombre del evento: XV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias

Institución organizadora: SUB , Uruguay

2013

Congresos

Nombre del evento: Autophagy: Molecular Mechanisms in Biology and Diseases

Institución organizadora: Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA , Uruguay

2012

Congresos

Nombre del evento: Tuberculosis 2012: Biology, pathogenesis, intervention strategies. EMBO Conference.

Institución organizadora: Institut Pasteur, Paris, France. , Francia

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis

2012

Congresos

Nombre del evento: XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias

Institución organizadora: Sociedad Uruguaya de Biociencias , Uruguay

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis; tirosin-fosfatasa

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

2011	<p>Congresos</p> <p><i>Nombre del evento:</i> Séptimas Jornadas de la SBBM</p> <p><i>Institución organizadora:</i> SBBM, Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. , Uruguay</p> <p><i>Palabras clave:</i> Mycobacterium tuberculosis; fosfatasas en tirosina</p> <p><i>Areas del conocimiento:</i> Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular</p>
2010	<p>Congresos</p> <p><i>Nombre del evento:</i> XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias</p> <p><i>Institución organizadora:</i> Sociedad Uruguaya de Biociencias , Uruguay</p>
2009	<p>Congresos</p> <p><i>Nombre del evento:</i> Sextas jornadas de Bioquímica y Biología Molecular</p> <p><i>Institución organizadora:</i> SBBM , Uruguay</p>
2009	<p>Congresos</p> <p><i>Nombre del evento:</i> XXIII Congreso Mundial de Hidatidología</p> <p><i>Institución organizadora:</i> Uruguay</p>
2008	<p>Congresos</p> <p><i>Nombre del evento:</i> XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology</p> <p><i>Institución organizadora:</i> SBBq , Brasil</p>
2007	<p>Congresos</p> <p><i>Nombre del evento:</i> XII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias</p> <p><i>Institución organizadora:</i> SUB , Uruguay</p>
1993	<p>Congresos</p> <p><i>Nombre del evento:</i> III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología</p> <p><i>Institución organizadora:</i> ALAI , Chile</p>
2011	<p>Simposios</p> <p><i>Nombre del evento:</i> Thiol metabolism and redox regulation of cellular functions</p> <p><i>Institución organizadora:</i> Lab. Enzimología, Fac de Ciencias; Inst. Pasteur , Uruguay</p>
1997	<p>Simposios</p> <p><i>Nombre del evento:</i> Regional Workshop of the Southern Cone of Latin America; Molecular and Epidemiological aspects of Echinococcus and hydatid disease</p> <p><i>Institución organizadora:</i> Brasil</p>
1994	<p>Simposios</p> <p><i>Nombre del evento:</i> Molecular, Biochemical and Immunological Aproxaches to Parasitic diseases</p> <p><i>Institución organizadora:</i> Uruguay</p>
1993	<p>Simposios</p> <p><i>Nombre del evento:</i> International Workshop on Biology of Parasitism. Molecular Biology and Immunology of the Adaptation and Development of Parasites</p> <p><i>Institución organizadora:</i> Uruguay</p>
2012	<p>Otros</p> <p><i>Nombre del evento:</i> Pasantía de entrenamiento en espectrometría de masa MALDI-TOF. Identificación de proteínas por MALDI-TOF MS/MS (huella peptídica, MS/MS) y búsqueda en bases de datos, dirigida por la Dra. Rosario Durán y Madelón Portela.</p> <p><i>Institución organizadora:</i> UByPA-Instituto Pasteur Montevideo , Uruguay</p> <p><i>Palabras clave:</i> espectrometría de masa</p> <p><i>Areas del conocimiento:</i> Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Proteómica</p>
1996	<p>Otros</p> <p><i>Nombre del evento:</i> Pasantía en el tema Síntesis química de péptidos</p> <p><i>Institución organizadora:</i> Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca , México</p> <p><i>Palabras clave:</i> péptidos sintéticos</p> <p><i>Areas del conocimiento:</i> Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Orgánica / Síntesis química de péptidos</p>

Idiomas

Español
Entiende (Muy Bien) / Habla (Muy Bien) / Lee (Muy Bien) / Escribe (Muy Bien)

Francés
Entiende (Bien) / Habla (Bien) / Lee (Muy Bien) / Escribe (Bien)

Inglés
Entiende (Muy Bien) / Habla (Bien) / Lee (Muy Bien) / Escribe (Muy Bien)

Portugués
Entiende (Bien) / Lee (Bien)

Áreas de actuación

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Virología

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de ADN, proteínas y enzimas / Proteómica, búsqueda de blancos terapéuticos

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Genética Humana / Citogenética

Actuación Profesional

Cargos desempeñados actualmente

Desde: 03/2017
Cargo financiado por PEDECIBA , (30 horas semanales) , Institut Pasteur de Montevideo , Uruguay

Empresa Privada , Asociación Española Primera de Socorros Mutuos , Uruguay

Vínculos con la institución

11/1999 - 08/2006, *Vínculo:* Bioquímica. Laboratorio de Análisis Clínicos., (40 horas semanales)

Universidad de la República , Facultad de Química - UDeLaR , Uruguay

Vínculos con la institución

09/1993 - 12/1993, *Vínculo:* Ayudante de Inmunología, Docente Grado 1 Interino, (40 horas semanales)

01/1994 - 12/1994, *Vínculo:* Beca de Iniciación en Investigación. CONICYT, Docente Grado 1 Interino, (30 horas semanales)

05/1995 - 10/1999, *Vínculo:* , Docente Grado 1 Interino, (40 horas semanales)

03/1992 - 08/1993, *Vínculo:* , No docente (25 horas semanales)

09/2007 - 06/2010, *Vínculo:* , Docente Grado 2 Interino, (25 horas semanales)

Actividades

07/2007 - 06/2010

Líneas de Investigación , Facultad de Química , Cátedra de Inmunología

Estudio de una familia de inhibidores tipo Kunitz de Echinococcus granulosus , Integrante del Equipo

03/1995 - 12/1997

Docencia , Grado

Curso práctico de Introducción a la Inmunología , Responsable , Carreras de Facultad de Química

11/1995 - 12/1995

Docencia , Perfeccionamiento

Actualización en técnicas de inmunodiagnóstico , Responsable , Educación Permanente

06/1996 - 07/1996

Otra actividad técnico-científica relevante , Universidad Nacional Autónoma de México , Instituto de Biotecnología. Lab. de Dr. Lourival Possani

Pasantía en síntesis química de péptidos

03/1997 - 05/1998

Gestión Académica

Representante del orden Egresados en la Comisión Asesora de Bioquímica

01/2009 - 06/2010

Proyectos de Investigación y Desarrollo , Facultad de Química , Cátedra de Inmunología

“Estudios de la divergencia funcional de una familia de inhibidores Kunitz involucrados en la instalación de Echinococcus granulosus en su hospedero definitivo” , Integrante del Equipo

06/2007 - 10/2008

Proyectos de Investigación y Desarrollo , Facultad de Química , Cátedra de Inmunología

Funciones de una familia de inhibidores tipo Kunitz en la instalación de Echinococcus granulosus en su hospedero definitivo , Integrante del Equipo

04/2000 - 04/2000

Proyectos de Investigación y Desarrollo , Facultad de Química , Cátedra de Inmunología

Estudio de las bases moleculares de la toxicidad de la ciclosporina A sobre protoescoléces de Echinococcus granulosus , Coordinador o Responsable

01/1998 - 12/1999

Proyectos de Investigación y Desarrollo , Facultad de Química , Cátedra de Inmunología

Estudio de la ciclofilina de Echinococcus granulosus , Integrante del Equipo

Universidad de la República , Facultad de Ciencias - UDeLaR , Uruguay

[Vínculos con la institución](#)

08/2010 - 02/2011, *Vínculo:* , No docente (40 horas semanales)

03/2011 - 02/2012, *Vínculo:* Ayudante, Docente Grado 1 Interino, (20 horas semanales)

03/2012 - 08/2013, *Vínculo:* , No docente (35 horas semanales)

09/2013 - 02/2014, *Vínculo:* Cargo por Proyecto CSIC de la Dra. Villarino, Docente Grado 1 Interino, (20 horas semanales)

03/2014 - 06/2016, *Vínculo:* , No docente (35 horas semanales)

07/2016 - 12/2016, *Vínculo:* , No docente (20 horas semanales)

[Actividades](#)

08/2010 - Actual

Líneas de Investigación , Facultad de Ciencias , Sección Bioquímica y Biología Molecular

Estudio de fosfatasa implicadas en la señalización celular de Mycobacterium tuberculosis , Integrante del Equipo

03/2011 - 06/2011

Docencia , Grado

Curso de Bioquímica , Asistente , Licenciatura en Bioquímica/Ciencias Biológicas

05/2013 - 05/2013

Docencia , Maestría

Modificaciones Postraduccionales de Proteínas: Ampliando el Código Genético, coordinado por la Dra. Leonor Thomson y Dr José Tort. , Asistente , PEDECIBA-Biología

05/2013 - 07/2015

Proyectos de Investigación y Desarrollo , Facultad de Ciencias. UDELAR , Sección Bioquímica y Biología Molecular

Chalconas como potentes inhibidores de las dos únicas fosfatasa en tirosina de Mycobacterium tuberculosis: síntesis, diseño racional y caracterización de nuevos compuestos., Tipo de participación , Integrante del Equipo

02/2011 - 08/2013

Proyectos de Investigación y Desarrollo , Facultad de Ciencias , Sección Bioquímica y Biología Molecular

Identificación de sustratos y mecanismos de regulación de las dos únicas tirosina fosfatasa, PtpA y PtpB de Mycobacterium tuberculosis. , Integrante del Equipo

Institut Pasteur de Montevideo , Institut Pasteur de Montevideo , Uruguay

[Vínculos con la institución](#)

03/2017 - Actual, *Vínculo:* Cargo financiado por PEDECIBA, (30 horas semanales)

[Actividades](#)

03/2017 - Actual

Líneas de Investigación , Laboratorio de Inmunovirología

Búsqueda de interactores intracelulares de la proteína de cápside del virus de la leucemia bovina. , Integrante del Equipo

Líneas de investigación

Título: Búsqueda de interactores intracelulares de la proteína de cápside del virus de la leucemia bovina.

Tipo de participación: Integrante del Equipo

Objetivo: El virus de la leucemia bovina (VLB), del género Deltaretrovirus, causa una enfermedad linfoproliferativa denominada Leucosis Enzoótica Bovina (LEB), afectando principalmente a los linfocitos B bovinos y ocasionando linfocitosis y/o tumores malignos. De hecho, es la enfermedad neoplásica más frecuente del ganado bovino lechero y causa importantes pérdidas económicas en el sector agropecuario. En el virión maduro de VLB, su genoma se encuentra protegido dentro de la cápside viral construida a partir de la proteína de cápside (CA), que lo protege durante su tránsito hacia el núcleo. En otros retrovirus, se ha reportado que la proteína CA interacciona con múltiples proteínas celulares que posibilitan la replicación del genoma, el desensamblado de la cápside, el pasaje al núcleo y la integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera. Sin embargo, en VLB todavía no se conocen cuales son los factores celulares que interaccionan con la proteína CA. El objetivo de este proyecto es identificar algunas de las moléculas con las cuales interacciona la proteína CA durante su tránsito hacia el núcleo.

Equipos: Otto Pritsch(Integrante); Natalia Ibañez(Integrante)

Palabras clave: cápside; Virus leucosis bovina

Áreas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Virología

Título: Estudio de fosfatasa implicadas en la señalización celular de *Mycobacterium tuberculosis*

Tipo de participación: Integrante del Equipo

Objetivo: Esta línea de investigación es dirigida por la Dra. Andrea Villarino, y el objetivo central es encontrar sustratos de las dos únicas fosfatasa de tirosina de *M. tuberculosis* (PtpA y PtpB). Las fosfatasa actúan generalmente sobre numerosos sustratos, regulando la función de diversas vías de señalización intracelular, proporcionando al patógeno un mecanismo versátil para interferir con las vías de señalización celular que se activan en respuesta a la infección. PtpA y PtpB han sido caracterizadas estructuralmente y son consideradas factores de virulencia y potenciales blancos de nuevos fármacos. Yo comencé en agosto del 2010 mi tesis de Doctorado en su laboratorio, y mi trabajo de tesis se enmarcó en esta línea de investigación. El título de la Tesis fue "Fosfatasa en tirosina de *Mycobacterium tuberculosis*: avances en la identificación de sustratos y posible rol en la adaptación de la bacteria al macrófago" El objetivo general de la tesis fue avanzar en el conocimiento de las vías de señalización moduladas por tirosina- fosfatasa de *Mycobacterium tuberculosis* que están implicadas en la comunicación bacteria-hospedero. La defensa de tesis fue en junio de 2016 Hemos logrado identificar 4 potenciales sustratos eucariotas de PtpA, todos ellos relacionados a la producción de energía celular, validando uno de ellos como sustrato in vitro de la fosfatasa. Los resultados obtenidos hasta ahora fueron publicados en una revista de alto impacto en 2015, han sido recientemente citados por un grupo de reconocida trayectoria mundial en esta área y han abierto nuevas hipótesis de trabajo que esperamos explorar.

Equipos: Andrea Villarino(Integrante); Margenat Mariana(Integrante); Ferreira AM(Integrante); Durán R(Integrante)

Palabras clave: fosfatasa; *Mycobacterium tuberculosis*; interacción bacteria - hospedero

Áreas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Fosfatasa en tirosina bacterianas/ Señalización celular

Título: Estudio de una familia de inhibidores tipo Kunitz de *Echinococcus granulosus*

Tipo de participación: Integrante del Equipo

Objetivo: Participé en esta línea de Investigación dirigida por la Dra Cecilia Fernández, que estudia una familia de inhibidores de serina proteasas, tipo Kunitz, que están presentes en el transcriptoma de *E. granulosus*, y cuya síntesis se induce cuando el gusano larvario es expuesto a las condiciones del tracto digestivo del perro y serían secretadas al duodeno. Esta familia de inhibidores actuaría en la interfase entre el parásito - huésped definitivo, interfiriendo con los procesos fisiológicos que desarrolla el hospedero en las etapas iniciales de la infección. Para ello, se planteó el estudio de: i) la actividad de cada inhibidor frente a blancos potenciales (enzimas digestivas caninas y proteasas de serina asociadas con la inflamación; y canales de K⁺), ii) el perfil de la síntesis y secreción de estos inhibidores, mediante espectrometría de masa y sondas de ARN.

Equipos: Mariana Margenat(Integrante); Martín Fló(Integrante); Leonardo Pelliza(Integrante); Cecilia Fernández (Integrante)

Palabras clave: *Echinococcus granulosus*; Kunitz

Áreas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular

Proyectos

1998 - 1999

Título: Estudio de la ciclofilina de *Echinococcus granulosus*, *Tipo de participación:* Integrante del Equipo, *Descripción:* Personalmente llevé a cabo todas las actividades experimentales planteadas en el proyecto. Se caracterizó una ciclofilina del parásito cuyo ADNc había sido aislado previamente (se purificó la proteína nativa, se analizó su actividad isomerasa de prolinas y su expresión en distintos materiales parasitarios); y se estudió el efecto de su inhibición con la droga ciclosporina A sobre la vitalidad y el metabolismo del parásito. En el marco de este proyecto yo realicé mi tesis de Maestría, bajo la orientación de la Dra Cecilia Fernández, y la Dra M Marín. Lamentablemente, la tesis fue interrumpida dado que, al finalizar la ejecución financiera del proyecto, me quedé sin cargo. La defensa de la tesis la realicé en el año 2003. El alejamiento de la UDELAR a fines de 1999 y la realización de una pasantía por parte de la Dra Cecilia Fernández en Edimburgo (2000-2002) demoraron la publicación de un manuscrito que reunía los resultados principales de este estudio. Desafortunadamente, un trabajo similar fue publicado por otros investigadores (Colebrook AL et al (2002) Anti-parasitic effect of cyclosporin-A on *E. granulosus* and characterization of its associated cyclophilin gene. *Parasitology* 125, 485-493).

Tipo: Investigación

Alumnos: 1 (Maestría/Magister),

Equipo: Mariana Margenat (Integrante); Mónica Marín (Integrante); Cecilia Fernández (Responsable)

Financiadores: Comisión Sectorial de Investigación Científica - UDeLaR / Apoyo financiero
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas / Apoyo financiero

Palabras clave: *Echinococcus granulosus*; ciclofilina; PPIasas

Áreas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular

Sistema Nacional de Investigadores

2000 - 2000

Título: Estudio de las bases moleculares de la toxicidad de la ciclosporina A sobre protoesclócecos de *Echinococcus granulosus*, *Tipo de participación:* Coordinador o Responsable, *Descripción:* La elaboración de este proyecto estuvo a mi cargo, y se presentó como Proyecto de Iniciación en Investigación. Sin embargo, este proyecto aprobado por CSIC, no pudo ser llevado a cabo, debido a que en el momento en que fue aprobado, yo me encontraba trabajando en el área privada por haberme quedado sin cargo en la Universidad.

Tipo: Investigación

Alumnos: 1 (Maestría/Magister),

Equipo: Mariana Margenat (Responsable); Cecilia Fernández (Integrante)

Financiadores: Comisión Sectorial de Investigación Científica - UDeLaR / Apoyo financiero

Palabras clave: ciclofilina; ciclosporina A

Áreas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

2007 - 2008

Título: Funciones de una familia de inhibidores tipo Kunitz en la instalación de *Echinococcus granulosus* en su hospedero definitivo, *Tipo de participación:* Integrante del Equipo, *Descripción:* Este proyecto aportó financiación para el estudio de los inhibidores tipo Kunitz identificados en el transcriptoma de la larva. Las proteínas tipo Kunitz son generalmente inhibidoras de proteasas de serina. Sin embargo, existen integrantes de la familia que bloquean canales iónicos. Ambos tipos de moléculas estarían presentes en *E. granulosus*. Como los inhibidores se secretarían cuando la larva ingresa a su hospedero definitivo, se buscó caracterizar la actividad de cada uno frente a blancos potenciales, es decir frente a moléculas presentes en el escenario de la instalación del parásito (proteasas de serina - tanto digestivas como asociadas con la inflamación; y canales de K⁺). Personalmente, caractericé uno de los integrantes de la familia (EgKU-3), lo cual implicó la preparación de una forma recombinante del inhibidor maduro, y el estudio detallado de su actividad inhibidora de proteasas de serina. Parte de los resultados obtenidos han sido reunidos en el manuscrito (publicado en PLoS One): González S, Fló M, Margenat M, Durán R, Graña M, González-Sapienza G, Parkinson J, Maizels RM, Salinas G, Álvarez B y Fernández C. 'A diverse family of Kunitz inhibitors from *Echinococcus granulosus* potentially involved in host-parasite cross-talk'.

Sistema Nacional de Investigadores

Tipo: Investigación

Alumnos: 2 (Pregrado), 1 (Maestría/Magister),

Equipo: Mariana Margenat (Integrante); Cecilia Fernández Granja (Responsable); Martín Fló (Integrante); Gustavo Salinas (Integrante); Rosario Durán (Integrante); Beatriz Alvarez (Integrante); Silvia González (Integrante)

Financiadores: DINACYT/DICYT/CONICYT / Apoyo financiero

Palabras clave: *Echinococcus granulosus*; Kunitz

Áreas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular

2009 - 2010

Título: "Estudios de la divergencia funcional de una familia de inhibidores Kunitz involucrados en la instalación de *Echinococcus granulosus* en su hospedero definitivo", *Tipo de participación:* Integrante del Equipo, *Descripción:* En los últimos años la Dra. Cecilia Fernández, responsable del proyecto, ha llevado adelante una línea de investigación enfocada a la caracterización de una familia multigénica de inhibidores tipo Kunitz de *E. granulosus*. Se identificaron ocho integrantes de la familia (EgKU-1 a EgKU-8) al analizar el transcriptoma de la larva y se purificaron a homogeneidad a dos de ellos (EgKU-1 y EgKU-8) de un homogeneizado del parásito. El análisis de sus secuencias predichas y ensayos in vitro de la capacidad inhibidora de proteasas de serina de los componentes purificados indican que esta familia de *E. granulosus* incluye tanto inhibidores de proteasas de alta afinidad (EgKU-8) como integrantes del grupo de inhibidores Kunitz que no presentan esa actividad y, en cambio, bloquearían canales de tipo Kv (EgKU-1). El objetivo del proyecto es confirmar esta diversidad funcional y caracterizarla. Personalmente, en este proyecto trabajé hasta julio del 2007, y

realicé un estudio de expresión de los inhibidores Kunitz en los distintos estadios del parásito. Mediante una estrategia de purificación de los inhibidores, y posterior espectrometría de masa y digestión triptica se confirmó la secreción de por lo menos dos de estos inhibidores (KU-3 y KU-8) en el líquido hidático que correspondería a la secreción in vivo de los parásitos. Los resultados obtenidos en este proyecto han sido presentados en congresos internacionales, parte de ellos fueron incluidos en el manuscrito 'Tuned Escherichia coli as a host for the expression of disulfide-rich proteins'. Salinas G, Pellizza L, Margenat M, Fló M, Fernández C., Biotechnology Journal, 2011.

Tipo: Investigación

Alumnos: 1(Pregrado), 1(Maestría/Magister),

Equipo: Mariana Margenat(Integrante); Cecilia Fernández Granja(Responsable); Martín Fló(Integrante); Leonardo Pelliza(Integrante); Gustavo Salinas(Integrante); Rosario Durán(Integrante); Beatriz Alvarez(Integrante)

Financiadores: Comisión Sectorial de Investigación Científica - UDeLaR / Apoyo financiero

Palabras clave: Echinococcus granulosus; Inhibidores Kunitz

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular

2011 - 2013

Título: Identificación de sustratos y mecanismos de regulación de las dos únicas tirosina fosfatasa, PtpA y PtpB de Mycobacterium tuberculosis., *Tipo de participación:* Integrante del Equipo, *Descripción:* El proyecto estudió dos enzimas con actividad fosfatasa secretadas por la bacteria Mycobacterium tuberculosis. Dicha bacteria, causal de la tuberculosis, produce en el mundo más de 2 millones de muertes por año y en Uruguay continúa siendo un problema de salud nacional. Este tipo de bacterias patógenas liberan dentro de las células del organismo infectado diferentes enzimas efectoras cuya finalidad es interferir con el mecanismo de defensa del hospedero. Una vez dentro del mismo estas enzimas actúan sobre sustratos eucariotas interfiriendo y frenando de alguna manera las vías de defensa del hospedero, que de otra forma darían lugar a la destrucción de la bacteria. Entre las enzimas efectoras implicadas en la comunicación entre la bacteria con el hospedero se encuentran las dos únicas tirosina fosfatasas de M. tuberculosis, PtpA y PtpB. Ambas fosfatasas son consideradas como posibles blancos en el desarrollo de nuevas drogas contra la tuberculosis pues existen evidencias de su rol en la propagación de la infección. *Objetivo General:* Avanzar en el conocimiento de vías de señalización dirigidas por las dos únicas tirosinas fosfatasas de Mycobacterium tuberculosis, PtpA y PtpB. *Objetivos específicos:* i) Identificar los sustratos de PtpA y PtpB aislados mediante una nueva metodología que combina la utilización del BIAcore y mutantes puntuales de las fosfatasas. ii) Caracterizar in vitro la interacción enzima-sustrato utilizando PtpA y PtpB y sustratos puros. En este proyecto se enmarcó parte de mi tesis de Doctorado. La principal contribución como consecuencia del desarrollo del Proyecto es el avance en el conocimiento de los sustratos de PtpA y la vías de señalización eucariotas que parecen ser el blanco de esta fosfatasa bacteriana. Asimismo, se difundieron los resultados en varios congresos y en una publicación científica de alto impacto internacional.

Tipo: Investigación

Alumnos: 1(Pregrado), 1(Doctorado)

Equipo: Mariana Margenat(Integrante); Andrea Villarino(Responsable); Gerardo Ferrer(Integrante); Madia Trujillo(Integrante); Ana María Ferreira(Integrante); Ana Ramón(Integrante); Lucía Rodríguez(Integrante)

Financiadores: Agencia Nacional de Investigación e Innovación / Apoyo financiero

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas / Apoyo financiero

Palabras clave: fosfatasas; Mycobacterium tuberculosis

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Fosfatasas en tirosina bacterianas/ Señalización celular

2013 - 2015

Título: Chalconas como potentes inhibidores de las dos únicas fosfatasas en tirosina de Mycobacterium tuberculosis: síntesis, diseño racional y caracterización de nuevos compuestos., *Tipo de participación:* Integrante del Equipo, *Descripción:* A lo largo del proyecto se sintetizaron cuarenta chalconas, algunas de ellas no reportadas aún y se evaluaron sesenta en su poder inhibitorio de la actividad fosfatasa de PtpB y PtpA de M. tuberculosis. Las fosfatasas fueron producidas como proteínas recombinantes y el ensayo de actividad optimizado para la evaluación los compuestos. De la evaluación de las sesenta moléculas detectamos dos que inhiben exclusivamente a PtpB, una que inhibe a PtpA y una capaz de inhibir a ambas. El poder inhibitorio de estas moléculas es aún leve si se compara con los mejores inhibidores reportados. El ensayo de actividad incluye un control negativo y positivo de inhibición que funcionaron correctamente. Sintetizamos también una chalcona reportada como inhibidor de PtpB y otra reportada como inhibidor de PtpA. En la evaluación de los mismos observamos que el inhibidor reportado de PtpB inhibe unas tres veces menos que lo reportado y el de PtpA no inhibe. La información in silico obtenida del acoplamiento molecular fosfatasa-chalcona la utilizamos para definir el lugar más favorable de un sustituyente a ser agregado en el proceso de síntesis orgánica, para analizar las energías de interacción y detalles moleculares y para definir mejoras en la chalconas. En el proyecto logramos realmente la interacción de las tres disciplinas implicadas con éxito y esperamos continuar en el futuro, evaluando moléculas de otra naturaleza o compuestos híbridos aprovechando también que disponemos no sólo de ensayo de actividad fosfatasa optimizado sino también de fosfatasas de otros patógenos intracelulares.

Tipo: Investigación

Alumnos: 2(Pregrado), 1(Doctorado)

Equipo: Andrea Villarino(Responsable); Lucía Rodríguez(Integrante); Gustavo Seoane(Integrante); Fernando Herrera(Integrante); Daniel Rodrigues(Integrante); Gabriel Sagrera(Integrante); Matías Maidana(Integrante); Florencia Ravel(Integrante)

Financiadores: Comisión Sectorial de Investigación Científica - UDeLaR / Apoyo financiero

Palabras clave: inhibidores; chalconas; fosfatasas en tirosina

Areas del conocimiento: Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Farmacología y Farmacia / Drogas para la tuberculosis

Producción científica/tecnológica

Durante mi tesis de Maestría, purifiqué una ciclofilina A de *E. granulosus* (EgCyP-A) a partir de extractos de varios estadios del parásito. Caractericé su actividad peptidil-prolil-cis/trans-isomerasa así como su inhibición por la ciclosporina-A. Demostré la toxicidad de ciclosporina-A sobre el protoescoléx, y estudié la expresión de EgCyP-A en los diferentes estadios: protoescoléx y gusanos adultos, mediante hibridación "in situ", detectando aumento de la expresión en los tipos celulares que están en activa proliferación. Los resultados no fueron publicados dado que otro grupo publicó gran parte del trabajo (Colebrook, 2002) Trabajé en la caracterización de una familia multigénica de inhibidores tipo Kunitz de *E. granulosus*. Caractericé EgKU-3 (clonado, expresión y purificación, y actividad inhibidora) y estudié la expresión de estos inhibidores en los distintos estadios del parásito. Mediante purificación a partir de líquido hidático, y MS se confirmó la presencia de KU-3 y KU-8 en líquido, sugiriendo que serían secretados in vivo por el parásito. Esta familia de inhibidores actuaría en la interfase huésped-parásito interfiriendo con los procesos fisiológicos que desarrolla el hospedero en las etapas iniciales de la infección (Publicación PloS One, Set 2009). Durante mi tesis de doctorado "Fosfatasa de tirosina de *Mycobacterium tuberculosis*: avances en la identificación de sustratos y posible rol en la adaptación de la bacteria al macrófago", mejoramos la estrategia clásica de Substrate trapping para identificar sustratos de Tyr-fosfatasa a partir de extractos de macrófagos, utilizando el mutante PtpA D126A. Aislamos e identificamos cuatro nuevos posibles sustratos de PtpA mediante MALDI-TOF-MS y nano LC-MS: tres proteínas mitocondriales (ECHA o Trifunctional protein subunit-alpha, ATPA o ATP synthase subunit-alpha y SQRD o Sulfide quinone oxidoreductase) y la proteína citosólica K6PP (6-phosphofruktokinase). Todas juegan un rol importante en el metabolismo energético celular. Utilizando resonancia plasmónica de superficie encontramos que PtpA se une a la Trifunctional protein (TFP) inmunopurificada, a través de su sitio catalítico ya que la unión fue inhibida por un inhibidor específico de fosfatasa. Además, PtpA fue capaz de defosforilar in vitro la TFP inmunopurificada, lo cual indica que TFP podría ser un buen sustrato de PtpA. La defosforilación mediada por PtpA podría afectar vías involucradas en el metabolismo energético celular, particularmente la beta oxidación de ácidos grasos mediante la modulación de la actividad y/o localización de la TFP. Pusimos a punto un modelo celular eucariota donde se expresa la PtpA de *M. tuberculosis* para evaluar el efecto de la actividad PtpA en los macrófagos humanos, mediante la utilización de un vector viral (VHS-1 tipo amplicón). Realizamos ensayos preliminares buscando evaluar ciertos parámetros metabólicos de interés como glucosa y lactato luego de la transfección. Los resultados son preliminares, pero el modelo de transfección de los macrófagos con este vector viral ya está puesto a punto como para continuar los experimentos. La defensa de tesis fue realizada en junio 2016 y los resultados obtenidos durante la misma ya fueron publicados en una revista internacional (New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state, 2015).

Producción bibliográfica

Artículos publicados

Arbitrados

Completo

MARGENAT M.; FLÓ M.; PELLIZA L.; GRAÑA M.; DURÁN R.; BÁEZ A.; SALCEDA E.; SOTO E.; ALVAREZ B.; FERNÁNDEZ C. Functional Diversity of Secreted Cestode Kunitz Proteins: Inhibition of Serine Peptidases and Blockade of Cation Channels. PLOS Pathogens, v.: 13(2), 2017

Palabras clave: Kunitz; serine peptidases; cestodes

Áreas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Medio de divulgación: Internet ; ISSN: 15537366 ; DOI: 10.1371

[journal.ppat.1006169](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006169)

We previously reported a multigene family of monodomain Kunitz proteins from *Echinococcus granulosus* (EgKU-1-EgKU-8), and provided evidence that some EgKUs are secreted by larval worms to the host interface. In addition, functional studies and homology modeling suggested that, similar to monodomain Kunitz families present in animal venoms, the *E. granulosus* family could include peptidase inhibitors as well as channel blockers. Using enzyme kinetics and whole-cell patch-clamp, we now demonstrate that the EgKUs are indeed functionally diverse. In fact, most of them behaved as high affinity inhibitors of either chymotrypsin (EgKU-2-EgKU-3) or trypsin (EgKU-5-EgKU-8). In contrast, the close paralogs EgKU-1 and EgKU-4 blocked voltage-dependent potassium channels (Kv); and also pH-dependent sodium channels (ASICs), while showing null (EgKU-1) or marginal (EgKU-4) peptidase inhibitory activity. We also confirmed the presence of EgKUs in secretions from other parasite stages, notably from adult worms and metacestodes. Interestingly, data from genome projects reveal that at least eight additional monodomain Kunitz proteins are encoded in the genome; that particular EgKUs are up-regulated in various stages; and that analogous Kunitz families exist in other medically

Sistema Nacional de Investigadores

important cestodes, but not in trematodes. Members of this expanded family of secreted cestode proteins thus have the potential to block, through high affinity interactions, the function of host counterparts (either peptidases or cation channels) and contribute to the establishment and persistence of infection. From a more general perspective, our results confirm that multigene families of Kunitz inhibitors from parasite secretions and animal venoms display a similar functional diversity and thus, that host-parasite co-evolution may also drive the emergence of a new function associated with the Kunitz scaffold.



SCOPUS



Completo

MARGENAT M.; LABANDERA AM.; GIL M.; CARRIÓN F.; PURIFICAÇÃO M.; RAZZERA G.; PORTELA M.; OBAL G.; TERENZI H.; PRITSCH O.; DURÁN R.; FERREIRA A.; VILLARINO A.

New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state. *Nature Scientific Reports*, v.: 5 8819, p.: 1 - 11, 2015

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*; fosfatasa en tirosina

Áreas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Fosfatasa en tirosina bacterianas/ Señalización celular

Medio de divulgación: Internet; Lugar de publicación: UK; ISSN: 20452322; DOI: 10.1038/srep08819

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25743628>

ABSTRACT The bacterial protein tyrosine phosphatase PtpA is a key virulence factor released by *Mycobacterium tuberculosis* in the cytosol of infected macrophages. So far only two unrelated macrophage components (VPS33B, GSK3a) have been identified as PtpA substrates. As tyrosine phosphatases are capable of using multiple substrates, we developed an improved methodology to pull down novel PtpA substrates from an enriched P-Y macrophage extract using the mutant PtpA D126A. This methodology reduced non-specific protein interactions allowing the identification of four novel putative PtpA substrates by MALDI-TOF-MS and nano LC-MS: three mitochondrial proteins - the trifunctional enzyme (TFP), the ATP synthase, and the sulfide quinone oxidoreductase - and the cytosolic 6-phosphofructokinase. All these proteins play a relevant role in cell energy metabolism. Using surface plasmon resonance, PtpA was found to bind immunopurified human TFP through its catalytic site since TFP-PtpA association was inhibited by a specific phosphatase inhibitor. Moreover, PtpA wt was capable of dephosphorylating immunopurified human TFP in vitro supporting that TFP may be a bona fide PtpA substrate. Overall, these results suggest a novel scenario where PtpA-mediated dephosphorylation may affect pathways involved in cell energy metabolism, particularly the beta oxidation of fatty acids through modulation of TFP activity and/or cell distribution.



SCOPUS



Completo

SALINAS G.; PELLIZA L.; MARGENAT M.; FLÓ M.; FERNÁNDEZ C.

Tuned Escherichia coli as a host for the expression of disulfide-rich proteins. *Biotechnology Journal*, v.: 6 6, p.: 686 - 699, 2011

Palabras clave: recombinant proteins; cysteine; thiol; oxidative folding

Áreas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Medio de divulgación: Papel; ISSN: 18606768; DOI: 10.1002/biot.201000335

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21567960>

Disulfide-bond formation is a major post-translational modification and is essential for protein folding, stability, and function. This is especially true for secreted proteins, many of which possess great potential for biotechnological applications. Focusing on the use of *Escherichia coli* for the production of this class of proteins, we describe the mechanisms that maintain redox compartmentalization in the cell, with an emphasis on those that promote the formation and isomerization of disulfide bonds in the bacterial periplasm, while presenting parallel pathways in the eukaryotic endoplasmic reticulum. Based on these concepts, we review the use of *E. coli* as a cell factory for the production of heterologous disulfide-containing proteins using either peri- or cytoplasmic expression and, in particular, how these compartments can be tuned to improve the yield of correctly folded recombinant proteins. Finally, we describe a few examples of the production of small disulfide-rich proteins (protease inhibitors) to illustrate how soluble, active, and fully oxidized recombinants may be successfully obtained upon peri- or cytoplasmic expression in *E. coli*.



SCOPUS



Completo

GONZÁLEZ S.; FLÓ M.; MARGENAT M.; DURÁN R.; GONZALEZ-SAPIENZA G.; GRAÑA M.; PARKINSON J.; MAIZELS R.M.; SALINAS G.; ALVAREZ B.; FERNÁNDEZ C.

A family of diverse kunitz inhibitors from Echinococcus granulosus potentially involved in host-parasite cross-talk. *PLoS ONE*, v.: 4(9), 2009

Palabras clave: kunitz inhibitors; host-parasite cross-talk; parasite secretions

Áreas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular

Medio de divulgación: Internet; ISSN: 19326203; DOI: 10.1371

journal.pone.007009

The cestode *Echinococcus granulosus*, the agent of hydatidosis/echinococcosis, is remarkably well adapted to its definitive host. However, the molecular mechanisms underlying the successful establishment of larval worms (protoscoleces) in the dog duodenum are unknown. With the aim of identifying molecules participating in the E.

granulosus-dog cross-talk, we surveyed the transcriptomes of protoscoleces and protoscoleces treated with pepsin at pH 2. This analysis identified a multigene family of secreted monodomain Kunitz proteins associated mostly with pepsin/H+-treated worms, suggesting that they play a role at the onset of infection. We present the relevant molecular features of eight members of the E. granulosus Kunitz family (EgKU-1 – EgKU-8). Although diverse, the family includes three pairs of close paralogs (EgKU-1/ EgKU-4; EgKU-3/EgKU-8; EgKU-6/EgKU-7), which would be the products of recent gene duplications. In addition, we describe the purification of EgKU-1 and EgKU-8 from larval worms, and provide data indicating that some members of the family (notably, EgKU-3 and EgKU-8) are secreted by protoscoleces. Detailed kinetic studies with native EgKU-1 and EgKU-8 highlighted their functional diversity. Like most monodomain Kunitz proteins, EgKU-8 behaved as a slow, tight-binding inhibitor of serine proteases, with global inhibition constants (KI^) versus trypsins in the picomolar range. In sharp contrast, EgKU-1 did not inhibit any of the assayed peptidases. Interestingly, molecular modeling revealed structural elements associated with activity in Kunitz cation-channel blockers. We propose that this family of inhibitors has the potential to act at the E. granulosus-dog interface and interfere with host physiological processes at the initial stages of infection*



SCOPUS



Artículos aceptados

Trabajos en eventos

Resumen

MARGENAT M.; SEGOVIA D; PORLEY D; IRVING V; RAMÓN A.; ANDRÉ-LEROUX G; FERREIRA A.; BEROIS M.; VILLARINO A.

Decoding the signaling pathways modulated by phosphatases of intracellular pathogens, 2015

Evento: Internacional , Europhosphatase 2015: Phosphorylation switches and cellular homeostasis , Turku, Finlandia , 2015

Anales/Proceedings: Phosphorylation switches and cellular homeostasis , 107Arbitrado: SI

Editorial: Turku

Palabras clave: tyrosine phosphatase

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Señalización celular

Medio de divulgación: Internet;

Financiación/Cooperación: Facultad de Ciencias - UDeLaR / Apoyo financiero

events.embo.org/15-europhosphatase

events.embo.org/15-europhosphatase Several evidences show that bacterial and viral PTPs act as virulence factors dephosphorylating eukaryotic proteins critical to cell cycle, altering metabolic and/or inflammatory responses of cells. Our interest is focused on the functional characterization of two PTPs of intracellular pathogens: PtpA of Mycobacterium tuberculosis, and the only PTP of the Orf virus. The Orf virus is responsible for contagious pustular dermatitis disease of sheep, goats and humans. The viral PTP Orf has a 40% sequence homology with the VH1 phosphatase of Vaccinia virus, crucial for the viability and replication of the viral particle, and the blocking of interferon gamma signaling in the host. Our work seeks to characterize the Orf virus phosphatase to go through elucidate its role during the viral infection. By an in silico and experimental approach we demonstrated that the Orf phosphatase is a dimer in solution involving the amino terminal region, and the essentiality of the Cys 112 for the activity. The bacterial PtpA is a key virulence factor released by Mycobacterium tuberculosis in the cytosol of infected macrophages. PtpA shows 37% of sequence identity and high structural similarity to its human orthologue HCPTPB. Our group recently identified four novel putative PtpA substrates, all related to energy metabolism: three mitochondrial proteins - the trifunctional enzyme, the ATP synthase, and the sulfide quinone oxidoreductase - and the cytosolic 6 phosphofructokinase. These substrates were isolated by an improved methodology to pull down novel PtpA substrates from an enriched P-Y macrophage extract, using the mutant PtpA D126A. By different approaches we are addressing the validation of these proteins candidates as PtpA substrates. We believe that our work may contribute to understanding which is the role of PTP in pathogen adaptation to host macrophages, and at the same time, it sheds light into novel targets of eukaryotic orthologue phosphatases, as HCPTPB.

Sistema Nacional de Investigadores

Resumen

MARGENAT M.; GIL M.; DURÁN R.; BEROIS M.; FERREIRA A.; VILLARINO A.

Nuevos potenciales sustratos eucariotas de la fosfatasa en tirosina de *Mycobacterium tuberculosis* PtpA: indicios de una modulación bacteriana del estado bionérgico del macrófago , 2014

Evento: Nacional , XV JORNADAS DE LA SOCIEDAD URUGUAYA DE BIOCIENCIAS , Maldonado , 2014

Anales/Proceedings: XV JORNADAS DE LA SOCIEDAD URUGUAYA DE BIOCIENCIAS Arbitrado: SI

Palabras clave: fosfatasas de tirosina

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Señalización celular

Medio de divulgación: Internet;

Agencia Nacional de Investigación e Innovación / Apoyo financiero; Facultad de Ciencias - UDeLaR / Apoyo

financiero

<http://sub.fcien.edu.uy/>

PtpA es un factor de virulencia de *M. tuberculosis* importante para la supervivencia de la bacteria durante la infección del macrófago. Hemos logrado aislar e identificar varios candidatos a sustratos de PtpA, entre ellos tres proteínas mitocondriales (la ECHA o Trifunctional protein subunit-alpha, la ATPA o ATP synthase subunit-alpha y la SQRD o Sulfide quinone oxidoreductase) y la K6PP (6-phosphofructokinase), todas ellas relacionadas directamente o indirectamente con la producción de ATP. Curiosamente ha sido reportado recientemente que las tres proteínas mitocondriales identificadas dejan de ser detectadas en la mitocondria de macrófagos infectados con una cepa virulenta de TB y no en aquellos infectados con una cepa avirulenta. Por lo tanto PtpA podría constituir el factor de virulencia responsable de este efecto. Todos nuestros esfuerzos apuntan a validar estos posibles candidatos como sustratos de PtpA. Hemos comenzado en estudiar la interacción/actividad de PtpA con la TFP, proteína identificada con el mejor score y clave en la beta-oxidación de los lípidos. En paralelo, buscamos poner a punto un modelo celular eucariota donde se exprese la PtpA de TB para poder estudiar si se alteran las vías metabólicas asociadas a la producción de ATP. Las diferentes herramientas que están siendo abordadas apuntan a demostrar si los candidatos identificados son sustratos fisiológicos de PtpA, cuál es el efecto de la actividad de PtpA sobre la localización/funcionalidad de los mismos y en especial sobre el metabolismo energético de los macrófagos.

Resumen

MARGENAT M.; LABANDERA AM; PORTELA M; DURÁN R.; FERREIRA A.; VILLARINO A.

New putative eukaryotic substrates of mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hint of a bacterial modulation of macrophage mitochondrial functions , 2013

Evento: Internacional , AUTOPHAGY: Molecular Mechanisms in Biology and Diseases , Buenos Aires , 2013

Anales/Proceedings: AUTOPHAGY: Molecular Mechanisms in Biology and Diseases Arbitrado: SI

Palabras clave: tirosin fosfatasas; macrófago

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Búsqueda de sustratos fosfatasa

Medio de divulgación: Internet;

Financiación/Cooperación: Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas / Apoyo financiero

Introduction Protein tyrosine phosphatases (PTPs) PtpA and PtpB from *M. tuberculosis* are key virulence factors that play important roles in bacterial survival during macrophage infection. The aim of the present work was the isolation and identification of new eukaryotic PtpA substrates. Methods We used the "Substrate trapping" methodology, which is based on the use of a PTP mutant in which the affinity for the substrate remained similar to that of the wild-type enzyme but in which catalytic activity had been reduced, to such an extent that an enzyme-substrate complex, once formed, would be stable enough to withstand isolation. We perform the following strategy: (i) the characterization, by Surface Plasma Resonance (SPR), of the interaction between a substrate trapping mutant of mycobacterial PtpA and protein extracts of activated and non-activated macrophages; (ii) the scaling up of the process and isolation and identification of putative substrates by mass spectrometry. Results and Conclusions We isolated and identified by LTQ mass spectrometry a group of proteins among which the majority are mitochondrial proteins related directly or indirectly with the ATP synthesis.

Resumen

MARGENAT M.; LABANDERA A.; PORTELA M; DURÁN R.; FERREIRA A.; VILLARINO A.

New putative eukaryotic substrates of the tyrosine phosphatase PtpA from *Mycobacterium tuberculosis* , 2012

Evento: Internacional , Tuberculosis 2012: Biology, pathogenesis, intervention strategies. EMBO Conference , Paris , 2012

Anales/Proceedings: Arbitrado: SI

Palabras clave: tyrosine phosphatases; *Mycobacterium tuberculosis*

Areas del conocimiento: Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de ADN, proteínas y enzimas / Proteómica, búsqueda de blancos terapéuticos

Medio de divulgación: Internet;

<http://www.pasteur.fr/infosci/conf/sb/tuberculosis2012/>

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) PtpA and PtpB from *M. tuberculosis* are attractive targets for anti-TB drug development, however little is known about their possible mycobacterial and/or eukaryotic protein substrates. Our goal is to isolate PtpA eukaryotic substrates using a substrate trapping mutant of the phosphatase in which the affinity for the substrate remained similar to that of the wild-type enzyme but in which catalytic activity had been reduced, to such an

extent that an enzyme-substrate complex, once formed, would be stable enough to withstand isolation. We perform the following strategy: (i) the characterization, by Surface Plasma Resonance (SPR), of the interaction between a substrate trapping mutant of mycobacterial PtpA and protein extracts of activated and non-activated macrophages; (ii) the scaling up of the process and isolation and identification of putative substrates by mass spectrometry. By SPR we detected an interaction between the PtpAD126A with macrophages protein extracts which occurs through the phosphatase active site (binding altered by a competitive inhibitor) and is stable to high ionic strength. By scaling up the process we isolated and identify by mass spectrometry (MS) a total of ten proteins, among which there are five proteins that are frequently detected in proteomic studies or proteins that bind non-specifically to Sepharose and must be regarded as potential nonspecific contaminants. However, we identified five related proteins which could be putative substrates of PtpA, all of them related to the oxidative metabolism of the macrophage. These were detected as Tyr phosphorylated proteins and have known Tyr-phosphorylated sites and are now under study for the validation as putative substrates of the mycobacterial Tyr-phosphatase PtpA.

Resumen

MARGENAT M.; LABANDERA A.; PORTELA M; DURÁN R.; FERREIRA A.; VILLARINO A.

Potenciales sustratos de la fosfatasa en tirosina de Mycobacterium tuberculosis, PtpA. , 2012

Evento: Nacional , XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias , Piriápolis , 2012

Anales/Proceedings: Arbitrado: SI

Palabras clave: tirosin-fosfatasas; Mycobacterium tuberculosis

Areas del conocimiento: Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de ADN, proteínas y enzimas / Proteómica, búsqueda de blancos terapéuticos

Medio de divulgación: Papel;

Mycobacterium tuberculosis posee dos tirosin-fosfatasas, PtpA y PtpB, implicadas en la virulencia de la bacteria y consideradas potenciales blancos para el desarrollo de drogas anti-TB. El objetivo del trabajo es el aislamiento de sustratos eucariotas de PtpA mediante la metodología "substrate trapping", basada en el uso de mutantes puntuales en el sitio activo que tendrían similar afinidad por el sustrato respecto a la enzima salvaje, pero menor actividad catalítica que ésta, lo que permitiría aislar el complejo enzima-sustrato. La estrategia seguida consistió en i) la caracterización, por Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR), de la interacción entre el mutante de la PtpA y extractos proteicos de macrófagos; ii) el escalado del proceso para el aislamiento e identificación de posibles sustratos. De esta forma, se detectó que existe interacción entre el mutante PtpA-D126A y los extractos de macrófagos; estable a alta fuerza iónica, y a través del sitio activo de la fosfatasa, ya que disminuye en presencia de un inhibidor competitivo. Mediante el escalado, aislamos e identificamos por espectrometría de masa un total de diez proteínas; cinco corresponden a proteínas frecuentemente detectadas en estudios de proteómica o que se unen no específicamente a la sefariosa y deben ser considerados como posibles contaminantes. Sin embargo, identificamos cinco proteínas que podrían ser posibles sustratos de PtpA, todas ellas relacionadas con el metabolismo oxidativo del macrófago. Estas proteínas fueron detectadas como proteínas fosforiladas en Tyr, poseen sitios conocidos de fosforilación en Tyr, y están actualmente en estudio para su validación como posibles sustratos de PtpA.

Resumen

LABANDERA A.; MARGENAT M.; TRUJILLO M.; FERRER G.; FERREIRA A.; RODRÍGUEZ L.; VILLARINO A.

Characterization of tyrosine phosphatase mutants used in substrate-trapping strategy , 2011

Evento: Regional , Free Radicals VII Meeting of the SFRBM South American Group 2011, Brasil. , 2011

Anales/Proceedings: Arbitrado: SI

Palabras clave: tirosin phosphatasas; Mycobacterium tuberculosis

Areas del conocimiento: Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de ADN, proteínas y enzimas / Proteómica, búsqueda de blancos terapéuticos

Resumen

MARGENAT M.; LABANDERA A.; CORBO M.; RIVAS C.; RODRIGUEZ L.; FERREIRA A.; VILLARINO A.

Búsqueda de sustratos de las dos únicas fosfatasas de proteínas en tirosina de Mycobacterium, PtpA y PtpB, utilizando mutantes en el sitio activo. , 2011

Evento: Nacional , Séptimas Jornadas de la SBBM, Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Uruguay , Montevideo , 2011

Anales/Proceedings: Arbitrado: SI

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis; tirosin-fosfatasas

Areas del conocimiento: Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de ADN, proteínas y enzimas / Proteómica, búsqueda de blancos terapéuticos

Medio de divulgación: CD-Rom;

Mycobacterium tuberculosis posee dos tirosin-fosfatasas, PtpA y PtpB, las cuales están implicadas en la virulencia de la bacteria y sus sustratos podían ser tanto proteínas de la bacteria como del macrófago infectado. El objetivo del presente estudio es utilizar la metodología de "substrate trapping" para el aislamiento de potenciales sustratos de PtpA y PtpB, basada en el uso de mutantes puntuales en residuos conservados del sitio activo. Se obtuvieron los mutantes PtpA-Cys11Ser, PtpA- Asp126Ala, PtpA-Arg17Ala y PtpB-Cys160Ser y PtpB-Asp82Ala por mutagénesis sitio dirigida, los que están siendo producidos en forma recombinante y purificadas por cromatografía de afinidad y gel filtración. En paralelo, se obtuvieron extractos de proteínas de macrófagos enriquecidos en fosfotirosin-proteínas a partir del cultivo de la línea premonocítica humana THP1 diferenciados a macrófagos mediante incubación con acetato de forbol miristato. Se

prepararon tres extractos de proteínas de macrófagos: 1) activados con lipopolisacáridos, 2) activados con lipopolisacáridos e interferón gamma y 3) sin activar. Para la obtención de extractos de M. tuberculosis se realizó el cultivo en medio mínimo Sauton y en medio enriquecido (7H9). Utilizando como herramienta la Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR), hemos definido las características de la interacción del mutante PtpA D126A y los extractos proteicos de macrófagos, encontrándonos actualmente en condiciones de realizar el escalado de dicho proceso. Para ello, utilizando la misma química usada en el ensayo de SPR, se inmovilizó la proteína mutante PtpA D126A a la resina N-hidroxisuccinimida-sefarosa, la cual se utilizará para el aislamiento de posibles sustratos de PtpA.

Resumen

MARGENAT M.; LABANDERA A.; OLIVERO N.; FERREIRA A.; TRUJILLO M.; FERRER G.; BEROIS M.; VILLARINO A.

A global study of the two unique tyrosine phosphatases from Mycobacterium Tuberculosis , 2011

Evento: Regional , Thiol metabolism and redox regulation of cellular functions , Punta del Este, Uruguay , 2011

Anales/Proceedings: Arbitrado: SI

Palabras clave: tyrosine phosphatases; Mycobacterium tuberculosis

Areas del conocimiento: Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de ADN, proteínas y enzimas

Medio de divulgación: Papel;

Protein tyrosine phosphatases PtpA and PtpB from M. tuberculosis are attractive targets for anti-TB drug development. Our goal is to isolate substrates of these phosphatase by: (i) characterization by Surface Plasma Resonance (SPR) of the interaction between substrate trapping mutants of PtpA and PtpB and protein extracts of mycobacteria and activated macrophages, (ii) scaling up of the process and identification of putative substrates. We produced the PtpA mutant D126A and detected an interaction with protein extracts from activated macrophages stable to high ionic strength that seems to occur through the active site (assays with competitive inhibitor). By scaling up the process we isolated a single protein whose sequence is at present under study. To validate our strategy we are designing other mutants in conserved catalytic residues. We are extending our study also to uncharacterized homologues of mycobacterial PTPs, specifically cloning the gene of a putative PTP from the Orf virus and from the Listeria monocitogenes. Evidence that certain eukaryotic PTPs may be susceptible to oxidation and inactivation has introduced an additional level to possible regulation, however, nothing is known about bacterial PTPs. We are investigating the potential of reversible oxidation of the N-terminal active-site cysteine of PtpA (Cys11) and PtpB (CysX) by determination of their pka by monobromobimane alkylation and the second-order rate constants of the oxidation with peroxide and peroxinitrite. Information on the possible involvement of PtpA and PtpB in redox signaling networks through regulatory cysteine switches and identification of their substrates may open new perspectives in the design of specific inhibitors.

Resumen

GIL M.; MARGENAT M.; DURÁN R.; BATTHYÁNY C.; VILLARINO A.

Caracterización molecular de la inhibición de la fosfatasa en tirosina de Mycobacterium tuberculosis PtpB por el ácido nitro-oleico. , 2011

Evento: Nacional , Séptimas Jornadas de la SBBM, Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Uruguay , Montevideo , 2011

Anales/Proceedings: Arbitrado: SI

Palabras clave: fosfatasas

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

La fosfatasa en tirosina de M.tuberculosis PtpB no posee homólogo eucariota y actuaría tanto dentro de la bacteria como en las células infectadas, existiendo evidencias que la supresión de su gen disminuye la supervivencia de la bacteria en los macrófagos. In vitro, PtpB defosforila proteínas (en Ser/Thr y Tyr) y fosfoinosítoles. Su actividad reside en la capacidad de la Cys160 en realizar el ataque nucleofílico al sustrato, la cual presenta un bajo pka favorecido por la presencia de la His159 en el sitio activo. La regulación redox mediante una modificación reversible de la cisteína catalítica podría ser un mecanismo clave en la regulación de las fosfatasas eucariotas. Diferentes especies reactivas de oxígeno y nitrógeno modulan la actividad de estas fosfatasas y recientemente se demostró que lípidos oxidados son también potentes inhibidores. Los ácidos grasos insaturados nitrados en un doble enlace constituyen una familia de potentes electrófilos formados durante situaciones de estrés oxidativo y que median acciones anti-inflamatorias en las células a través de la modificación reversible de los residuos nucleofílicos Cys e His de diferentes blancos moleculares, incluyendo enzimas y los receptores PPAR α 947. En el presente trabajo estudiamos la inhibición de la PtpB por el ácido nitro-oleico (ácido 9- y 10-nitro-9-cis-octadecenoico; OA-NO₂). Determinamos el IC₅₀ de la inhibición e identificamos el sitio de la reacción que media la inhibición enzimática. Dada la ausencia de homólogos de estas fosfatasas en eucariotas, la potente inhibición descrita presenta una interesante perspectiva farmacológica para el diseño de inhibidores específicos de esta enzima.

Resumen

PELLIZA L.; FLÓ M.; MARGENAT M.; SALINAS G.; FERNÁNDEZ C.

Expresión recombinante de inhibidores Kunitz en un sistema procariota , 2010

Evento: Nacional , XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias , Piriápolis, Uruguay , 2010

Anales/Proceedings: Arbitrado: SI

Palabras clave: Kunitz; proteínas recombinantes

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Medio de divulgación: Internet;

Resumen

PELLIZA L.; FLÓ M.; MARGENAT M.; SALINAS G.; ALVAREZ B.; FERNÁNDEZ C.

Estudio de la inhibición de tripsina con la proteína kunitz EgKU-7. , 2010

Evento: Nacional , Sextas Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular , Montevideo , 2010

Anales/Proceedings: Arbitrado: SI

Palabras clave: kunitz inhibitors

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Resumen

FLÓ M.; MARGENAT M.; PELLIZA L.; PÉREZ G.; DURÁN R.; SALINAS G.; ALVAREZ B.; FERNÁNDEZ C.

Functional diversity of a family of kunitz inhibitors potentially involved in host-parasite cross-talk in echinococcosis , 2009

Evento: Internacional , XXIII Congreso Mundial de Hidatidosis , Colonia del Sacramento , 2009

Anales/Proceedings: Arbitrado: SI

Palabras clave: Kunitz; Echinococcus granulosus

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular

Medio de divulgación: Papel;

Resumen

MARGENAT M.; FLÓ M.; GONZÁLEZ S.; DURÁN R.; SALINAS G.; ALVAREZ B.; FERNÁNDEZ C.

Studies on two members of a family of kunitz inhibitors from Echinococcus granulosus larvae , 2008

Evento: Regional , XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) , Aguas de Lindoia, San Pablo. , 2008

Anales/Proceedings: Arbitrado: SI

Palabras clave: Echinococcus granulosus; kunitz inhibitors

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular

Medio de divulgación: Papel;

Resumen

MARGENAT M.; MARÍN M.; FERNÁNDEZ C.

Biochemical characterization of Echinococcus granulosus cyclophilins , 1997

Evento: Regional , Regional Workshop of the Southern Cone of Latin America; Molecular and Epidemiological aspects of Echinococcus and hidatid disease , Porto Alegre, Brasil , 1997

Palabras clave: Cyclophilins; Echinococcus granulosus

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular

Medio de divulgación: Papel;

Resumen

MARGENAT M.; MARCO M.; J. BATTISTONI

Proteinases in Tachyzoites of *Toxoplasma gondii* , 1993

Evento: Internacional , International Workshop on Biology of Parasitism. Molecular Biology and Immunology of the Adaptation and Development of Parasites , Solís, Uruguay , 1993

Palabras clave: Proteinases; *Toxoplasma gondii*

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Medio de divulgación: Papel;

Otros datos relevantes

Premios y títulos

2008 Beca otorgada para asistir al XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). en Aguas de Lindoia, Brasil (Internacional) PABMB

Obtuve una beca para cubrir gastos de pasaje y alojamiento para asistir al Congreso de la SBBq y presentar un trabajo en el mismo.

1996 Beca otorgada para asistir al curso Caracterización de macromoléculas en parásitos (Internacional) Red de entrenamiento de enfermedades parasitarias del cono sur

La obtención de la beca implicó la selección como estudiante del curso, así como el pago de pasaje y estadía en Buenos Aires durante los 15 días que se realizó el curso.

1994 Beca de Iniciación en Investigación (Nacional) CONICYT

Obtuve una Beca de Iniciación en Investigación, por un año de duración, que fue realizada en la Cátedra de Inmunología de Facultad de Química, en el tema 'Producción de anticuerpos policlonales contra péptidos de la hormona gonadotrofina coriónica humana', bajo la dirección del Prof. Julio Battistoni.

1996 Beca otorgada por CONICYT para realizar una pasantía en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, México (Nacional) CONICYT

La beca otorgada consistió en apoyo financiero para realizar una pasantía durante un mes en el laboratorio del Dr. Possani, Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, México.

2014 Beca de Postgrado - Doctorado (Nacional) ANII

Beca otorgada para finalizar el Doctorado en el tema ' Identificación de sustratos de la tirosina-fosfatasa PtpA de *Mycobacterium tuberculosis*, considerada potencial blanco terapéutico", con código de beca POS_NAC_2013_1_11977, otorgada por 15 meses de duración a partir del 1/03/2014.

2016 Beca Post Doc otorgada en el llamado Uruguay Retiene, realizado por PEDECIBA (Nacional) PEDECIBA

El proyecto de Post Doc se titula Búsqueda de interactores intracelulares de la proteína de cápside del virus de la leucemia bovina, está siendo llevado a cabo en el Laboratorio de Inmunovirología del Instituto Pasteur de Montevideo, bajo la dirección del Dr. Otto Pritsch.

2000 Proyecto de Iniciación en Investigación (Nacional) CSIC

El título del proyecto financiado fue Estudio de las bases moleculares de la toxicidad de la CsA sobre protoescoléces de *E. granulosus*. El proyecto no pudo ejecutarse ya que en el momento en que fue otorgado no tenía cargo en la Universidad, y ya me encontraba trabajando en el área privada.

Presentaciones en eventos

Congreso

Decoding the signaling pathways modulated by phosphatases of intracellular pathogens. M. Margenat; D Segovia; D Porley; V Irving; A Ramón; G André-Leroux; A.M. Ferreira; Berois M; A Villarino , 2015

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 40

Referencias adicionales: Finlandia; *Nombre del evento:* Europhosphatase 2015: Phosphorylation switches and cellular homeostasis , Turku Finlandia , 2015; *Nombre de la institución promotora:* EMBO

Palabras clave: tyrosine phosphatase

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Señalización celular

events.embo.org/15-europhosphatase Several evidences show that bacterial and viral PTPs act as virulence factors dephosphorylating eukaryotic proteins critical to cell cycle, altering metabolic and/or inflammatory responses of cells. Our interest is focused on the functional characterization of two PTPs of intracellular pathogens: PtpA of *Mycobacterium tuberculosis*, and the only PTP of the Orf virus. The Orf virus is responsible for contagious pustular dermatitis disease of sheep, goats and humans. The viral PTP Orf has a 40% sequence homology with the VH1 phosphatase of Vaccinia virus, crucial for the viability and replication of the viral particle, and the blocking of interferon gamma signaling in the host. Our work seeks to characterize the Orf virus phosphatase to go through elucidate its role during the viral infection. By an in silico and experimental approach we demonstrated that the Orf phosphatase is a dimer in solution involving the amino

terminal region, and the essentiality of the Cys 112 for the activity. The bacterial PtpA is a key virulence factor released by Mycobacterium tuberculosis in the cytosol of infected macrophages. PtpA shows 37% of sequence identity and high structural similarity to its human orthologue HCPTPB. Our group recently identified four novel putative PtpA substrates, all related to energy metabolism: three mitochondrial proteins - the trifunctional enzyme, the ATP synthase, and the sulfide quinone oxidoreductase - and the cytosolic 6-phosphofructokinase. These substrates were isolated by an improved methodology to pull down novel PtpA substrates from an enriched P-Y macrophage extract, using the mutant PtpA D126A. By different approaches we are addressing the validation of these proteins candidates as PtpA substrates. We believe that our work may contribute to understanding which is the role of PTP in pathogen adaptation to host macrophages, and at the same time, it sheds light into novel targets of eukaryotic orthologue phosphatases, as HCPTPB.

Congreso

Nuevos potenciales sustratos eucariotas de la fosfatasa en tirosina de Mycobacterium tuberculosis PtpA: indicios de una modulación bacteriana del estado bionergético del macrófago. Mariana Margenat, Magdalena Gil, Rosario Durán, Mabel Berois, Ana Ferreira y Andrea Villarino. , 2014

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 24

Referencias adicionales: Uruguay; *Nombre del evento:* XV congreso de la SUB.; *Nombre de la institución promotora:* SUB , Sociedad Uruguaya de Biociencias.

Palabras clave: fosfatasas de tirosina

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Señalización celular

PtpA es un factor de virulencia de M. tuberculosis importante para la sobrevivencia de la bacteria durante la infección del macrófago. Hemos logrado aislar e identificar varios candidatos a sustratos de PtpA, entre ellos tres proteínas mitocondriales (la ECHA o Trifunctional protein subunit-alpha, la ATPA o ATP synthase subunit-alpha y la SQRD o Sulfide quinone oxidoreductase) y la K6PP (6-phosphofructokinase), todas ellas relacionadas directamente o indirectamente con la producción de ATP. Curiosamente ha sido reportado recientemente que las tres proteínas mitocondriales identificadas dejan de ser detectadas en la mitocondria de macrófagos infectados con una cepa virulenta de TB y no en aquellos infectados con una cepa avirulenta. Por lo tanto PtpA podría constituir el factor de virulencia responsable de este efecto. Todos nuestros esfuerzos apuntan a validar estos posibles candidatos como sustratos de PtpA. Hemos comenzado en estudiar la interacción/actividad de PtpA con la TFP, proteína identificada con el mejor score y clave en la beta-oxidación de los lípidos. En paralelo, buscamos poner a punto un modelo celular eucariota donde se exprese la PtpA de TB para poder estudiar si se alteran las vías metabólicas asociadas a la producción de ATP. Las diferentes herramientas que están siendo abordadas apuntan a demostrar si los candidatos identificados son sustratos fisiológicos de PtpA, cuál es el efecto de la actividad de PtpA sobre la localización/funcionalidad de los mismos y en especial sobre el metabolismo energético de los macrófagos.

Congreso

New putative eukaryotic substrates of mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hint of a bacterial modulation of macrophage mitochondrial functions. Mariana Margenat, Anne-Marie Labandera, Madelón Portela, Rosario Durán, Ana María Ferreira, Andrea Villarino , 2013

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 24

Referencias adicionales: Argentina; *Nombre del evento:* New putative eukaryotic substrates of mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hint of a bacterial modulation of macrophage mitochondrial functions; *Nombre de la institución promotora:* Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

Palabras clave: tirosin fosfatasas; tuberculosis; macrófagos; mitocondria

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Señalización celular

Introduction Protein tyrosine phosphatases (PTPs) PtpA and PtpB from M. tuberculosis are key virulence factors that play important roles in bacterial survival during macrophage infection. The aim of the present work was the isolation and identification of new eukaryotic PtpA substrates. Methods We used the "Substrate trapping" methodology, which is based on the use of a PTP mutant in which the affinity for the substrate remained similar to that of the wild-type enzyme but in which catalytic activity had been reduced, to such an extent that an enzyme-substrate complex, once formed, would be stable enough to withstand isolation. We perform the following strategy: (i) the characterization, by Surface Plasma Resonance (SPR), of the interaction between a substrate trapping mutant of mycobacterial PtpA and protein extracts of activated and non-activated macrophages; (ii) the scaling up of the process and isolation and identification of putative substrates by mass spectrometry. Results and Conclusions We isolated and identified by LTQ mass spectrometry a group of proteins among which the majority are mitochondrial proteins related directly or indirectly with the ATP synthesis.

Congreso

Potenciales sustratos de la fosfatasa en tirosina de Mycobacterium tuberculosis, PtpA. M. Margenat, A.M. Labandera, M. Portela, R. Durán, A.M. Ferreira y A. Villarino , 2012

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 24

Referencias adicionales: Uruguay; *Nombre del evento:* XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias; *Nombre de la institución promotora:* SUB, Sociedad Uruguaya de Biociencias

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis; tirosin fosfatasas

Areas del conocimiento: Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de ADN, proteínas y enzimas

Congreso

New putative eukaryotic substrates of the tyrosine phosphatase PtpA from *M. tuberculosis*. M. Margenat, A.M. Labandera, M. Portela, R. Durán, A.M. Ferreira y A. Villarino. , 2012

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 36

Referencias adicionales: Francia; *Nombre del evento:* Tuberculosis 2012: Biology, pathogenesis, intervention strategies. EMBO Conference.; *Nombre de la institución promotora:* Institut Pasteur, Paris, France.

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis; tyrosin phosphatases

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de

ADN, proteínas y enzimas

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) PtpA and PtpB from *M. tuberculosis* are attractive targets for anti-TB drug development, however little is known about their possible mycobacterial and/or eukaryotic protein substrates. Our goal is to isolate PtpA eukaryotic substrates using a substrate trapping mutant of the phosphatase in which the affinity for the substrate remained similar to that of the wild-type enzyme but in which catalytic activity had been reduced, to such an extent that an enzyme–substrate complex, once formed, would be stable enough to withstand isolation. We perform the following strategy: (i) the characterization, by Surface Plasma Resonance (SPR), of the interaction between a substrate trapping mutant of mycobacterial PtpA and protein extracts of activated and non-activated macrophages; (ii) the scaling up of the process and isolation and identification of putative substrates by mass spectrometry. By SPR we detected an interaction between the PtpAD126A with macrophages protein extracts which occurs through the phosphatase active site (binding altered by a competitive inhibitor) and is stable to high ionic strength. By scaling up the process we isolated and identify by mass spectrometry (MS) a total of ten proteins, among which there are five proteins that are frequently detected in proteomic studies or proteins that bind non-specifically to Sepharose and must be regarded as potential nonspecific contaminants. However, we identified five related proteins which could be putative substrates of PtpA, all of them related to the oxidative metabolism of the macrophage. These were detected as Tyr-phosphorylated proteins and have known Tyr-phosphorylated sites and are now under study for the validation as putative substrates of the mycobacterial Tyr-phosphatase PtpA.

Congreso

A study of the two unique tyrosine phosphatases from *M. tuberculosis*. Mariana Margenat, Anne-Marie Labandera, Natalia Olivero, Ana Ferreira, Madia Trujillo, Gerardo Ferrer, Mabel Berois and Andrea Villarino , 2011

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 32

Referencias adicionales: Italia; *Nombre del evento:* Gordon Research Conferences, Tuberculosis Drug Development; *Nombre de la institución promotora:* Gordon Research

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis; tyrosine phosphatases

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Congreso

Characterization of tyrosine phosphatase mutants used in substrate-trapping strategy. Anne-Marie Labandera, Mariana Margenat, Madia Trujillo, Gerardo Ferrer, Ana Ferreira, Lucía Rodríguez and Andrea Villarino , 2011

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 25

Referencias adicionales: Brasil; *Nombre del evento:* Free Radicals VII Meeting of the SFRBM South American Group; *Nombre de la institución promotora:* SFRBM South American Group

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis; tyrosine phosphatases

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Congreso

Búsqueda de sustratos de la dos únicas fosfatasa de proteínas en tirosina de *Mycobacterium tuberculosis*, PtpA y PtpB, utilizando mutantes en el sitio activo. M. Margenat, A.M. Labandera, M. Corbo , C. Rivas, L. Rodríguez, A.M. Ferreira y A. Villarino , 2011

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 20

Referencias adicionales: Uruguay; *Nombre del evento:* Séptimas Jornadas de la SBBM; *Nombre de la institución promotora:* SBBM, Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular.

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis; tirosin-fosfatasa

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Congreso

Caracterización molecular de la inhibición de la fosfatasa en tirosina de *Mycobacterium tuberculosis* PtpB por el ácido nitro-oleico. M. Gil, M. Margenat, R. Durán, C. Batthyány y A. Villarino. , 2011

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 20

Referencias adicionales: Uruguay; *Nombre del evento:* Séptimas Jornadas de la SBBM; *Nombre de la institución promotora:* SBBM, Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular.

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis; fosfatasa en tirosina

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Congreso

Expresión recombinante de inhibidores Kunitz en un sistema procariota. Leonardo Pellizza, Martín Fló, Mariana Margenat, Gustavo Salinas, Cecilia Fernández. , 2010

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 24

Referencias adicionales: Uruguay; *Nombre del evento:* XXIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB); *Nombre de la institución promotora:* SUB

Palabras clave: proteínas recombinantes; Kunitz

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Congreso

Functional diversity of a family of kunitz inhibitors potentially involved in host-parasite cross-talk in echinococcosis. Fló, M., Margenat, M. Pellizza, L, Perez, G, Durán, R., Salinas, G. Alvarez, B. and Fernández, C. , 2009

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 16

Referencias adicionales: Uruguay; *Nombre del evento:* XXIII Congreso Mundial de Hidatidología;

Palabras clave: Echinococcus granulosus; kunitz inhibitors

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular

Congreso

Estudio de la inhibición de tripsina con la proteína kunitz EgKU-7. Pellizza, L. , Fló, M. Margenat, M. , Salinas, G. , Alvarez, B., Fernández, C. , 2009

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 24

Referencias adicionales: Uruguay; *Nombre del evento:* 6° Jornadas de la Sociedad de Biología Molecular y Biología Molecular ; *Nombre de la institución promotora:* SBBM

Palabras clave: kunitz inhibitors

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Congreso

Studies on two members of a family of kunitz inhibitors from Echinococcus granulosus larvae , 2008

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 40

Referencias adicionales: Brasil; *Nombre del evento:* XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) ; *Nombre de la institución promotora:* SBBq

Palabras clave: Echinococcus granulosus; kunitz inhibitors

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular

Congreso

Limb-body wall complex & trombophilia: causal or casual relationship?. Reyno, S.; Bruzzone, R.; Margenat, M.; Bagnasco P.; Bianchi, A.; Barillaro, S; Capurro, A.; Gutierrez, Ma. Del C. , 2007

Tipo de participación: Poster,

Referencias adicionales: Brasil; *Nombre del evento:* 3rd International Conference on Birth Defects Disabilities in the developing world;

Palabras clave: limb-body wall complex

Areas del conocimiento: Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Genética Humana / Citogenética

Congreso

A case of partial trisomy 11 inherited from the mother. Reyno, S.; Bruzzone, R.; Bagnasco P.; Margenat, M; De Barbieri, M; Gutierrez, Ma. Del C, Beltramo P. , 2005

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 24

Referencias adicionales: Argentina; *Nombre del evento:* XXI International Congress of the Society "The fetus as a Patient 2005" ; *Nombre de la institución promotora:* Society The Fetus as a Patient

Palabras clave: Trisomy 11

Areas del conocimiento: Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Genética Humana / Citogenética

Congreso

Limb-body wall complex and trombophilic state: causal or casual relation?. Reyno, S.; Bruzzone, R.; Margenat, M.; Bagnasco P.; Bianchi, A.; Barillaro, S; Capurro, A.; Gutierrez, Ma. Del C. , 2005

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 24

Referencias adicionales: Argentina; *Nombre del evento:* XXI International Congress of the Society "The fetus as a Patient 2005"; *Nombre de la institución promotora:* Society The Fetus as a Patient

Areas del conocimiento: Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Genética Humana / Citogenética

Congreso

Estudio de proteasas involucradas en la degradación de antígenos de Toxoplasma gondii utilizados en inmunodiagnóstico. Mariana Margenat, Marta Marco, Julio Battistoni. , 1993

Tipo de participación: Poster,

Referencias adicionales: Chile; *Nombre del evento:* III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI); *Nombre de la institución promotora:* ALAI

Palabras clave: Toxoplasma gondii; proteasas

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Simposio

A global study of the two unique tyrosine phosphatases from *M. tuberculosis*. Mariana Margenat, Anne-Marie Labandera, Natalia Olivero, Ana Ferreira, Madia Trujillo, Gerardo Ferrer, Mabel Berois and Andrea Villarino , 2011

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 16

Referencias adicionales: Uruguay; *Nombre del evento:* Thiol metabolism and redox regulation of cellular functions;

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis; tyrosine phosphatases

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Encuentro

Biochemical characterization of *Echinococcus granulosus* cyclophilins; Mariana Margenat, Mónica Marín , Cecilia Fernández. , 1997

Tipo de participación: Poster, *Carga horaria:* 25

Referencias adicionales: Brasil; *Nombre del evento:* Regional Workshop of the Southern Cone of Latin America; Molecular and Epidemiological aspects of *Echinococcus* and hidatid disease;

Palabras clave: *Echinococcus granulosus*; Cyclophilins

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular

Encuentro

Proteinases in Tachyzoites of *Toxoplasma gondii*, Mariana Margenat, Marta Marco, Julio Battistoni. , 1993

Tipo de participación: Poster,

Referencias adicionales: Uruguay; *Nombre del evento:* International Workshop on Biology of Parasitism. Molecular Biology and Immunology of the Adaptation and Development of Parasites,

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*; proteases

Areas del conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular

Indicadores de producción

<i>Producción bibliográfica</i>	19
<i>Artículos publicados en revistas científicas</i>	4
Completo (Arbitrada)	4
<i>Artículos aceptados para publicación en revistas científicas</i>	0
<i>Trabajos en eventos</i>	15
Resumen (Arbitrada)	13
Resumen (No Arbitrada)	2
<i>Libros y capítulos de libros publicados</i>	0
<i>Textos en periódicos</i>	0
<i>Documentos de trabajo</i>	0
<i>Producción técnica</i>	0
<i>Productos tecnológicos</i>	0
<i>Procesos o técnicas</i>	0
<i>Trabajos técnicos</i>	0
<i>Otros tipos</i>	0
<i>Evaluaciones</i>	0
<i>Formación de RRHH</i>	0
<i>Tutorías/Orientaciones/Supervisiones concluidas</i>	0
<i>Tutorías/Orientaciones/Supervisiones en marcha</i>	0