

Interacción y actividad de la fosfatasa PtpA de *Mycobacterium tuberculosis* con la proteína trifuncional humana, una enzima clave en la oxidación de los lípidos en la mitocondria

Herrera Fernando¹; Margenat Mariana²; Irving Vivian²; García Tania²; Betancour Gabriela²; Villarino Andrea²

¹ Departamento de Física, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. ² Instituto de Biología, Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

ANTECEDENTES

Proteínas de macrófagos humanos identificadas como potenciales interactores de PtpA:

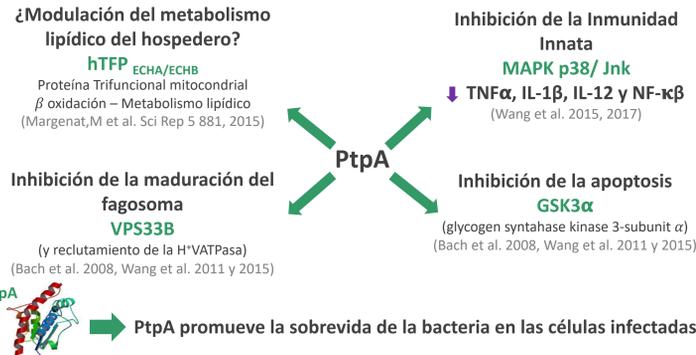
Biological process*	Protein accession	Protein name	Mascot score ^b	Mass (Da)	No. of matched ions ^b	No. of peptide sequences ^b
Lipid metabolism, fatty acid beta-oxidation	human TFP ^{ECHA}	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	2422	82947	63	23
Sulfide oxidation, using sulfide: quinone oxidoreductase	SQRD_HUMAN	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	705	49929	28	10
Respiratory electron transport chain	ATPA_HUMAN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	531	59714	16	7
Glycolysis	K6PP_HUMAN	6-phosphofruktokinase, platelet type	922	85542	47	15

* Only the main biological processes with traceable author statement are shown. from UniProt (http://www.uniprot.org) database (released on January 2014)¹⁸.
^b The value of score, number of matched ions and peptide sequences is the best value obtained. Margenat, M. et al. Sci Rep 5, 8819 (2015)

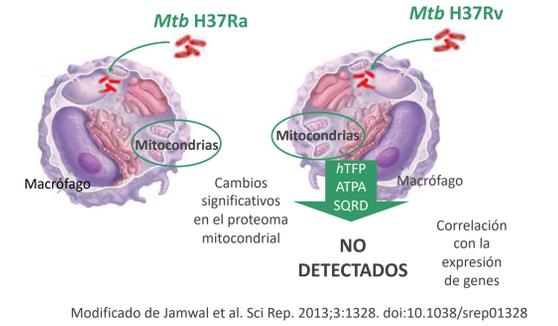
Proteína Trifuncional Humana: hTFP^{ECHA/ECHB}

La β oxidación de ácidos grasos es la principal vía de obtención de energía en los organismos, desde bacterias a humanos.

PtpA actúa sobre varias proteínas eucariotas regulando diferentes vías de señalización

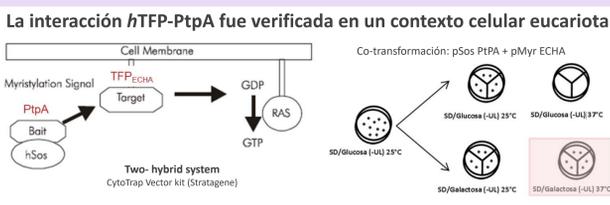


¿Qué sabemos de hTFP durante la infección con Mtb?

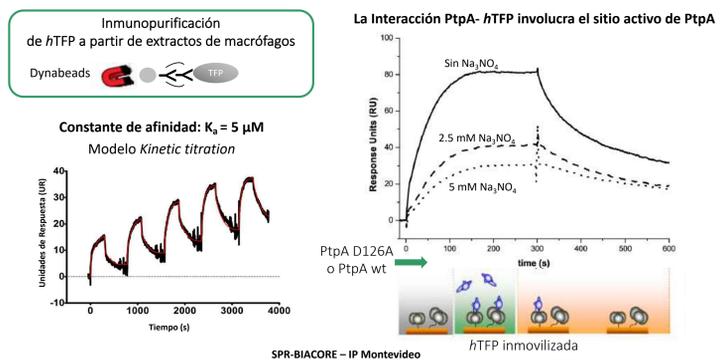


RESULTADOS

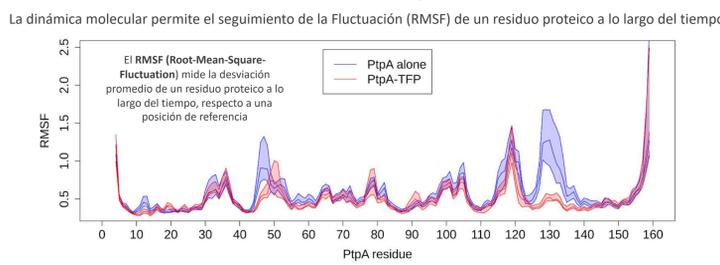
La PtpA micobacteriana y la hTFP α forman un complejo estable que involucra el sitio activo de PtpA



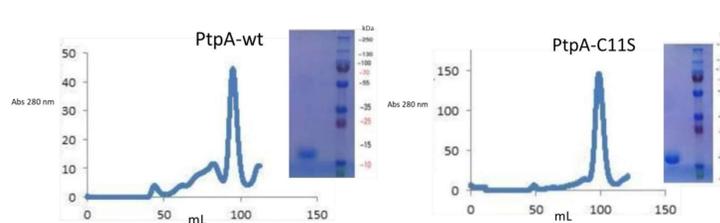
PtpA-hTFP interactúan a través del sitio activo de PtpA (constante de afinidad 5 μ M)



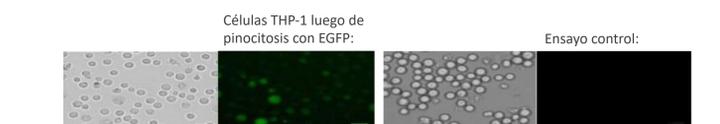
El complejo PtpA-hTFP es estable, detectando una estabilización debida a un D-loop catalítico en PtpA



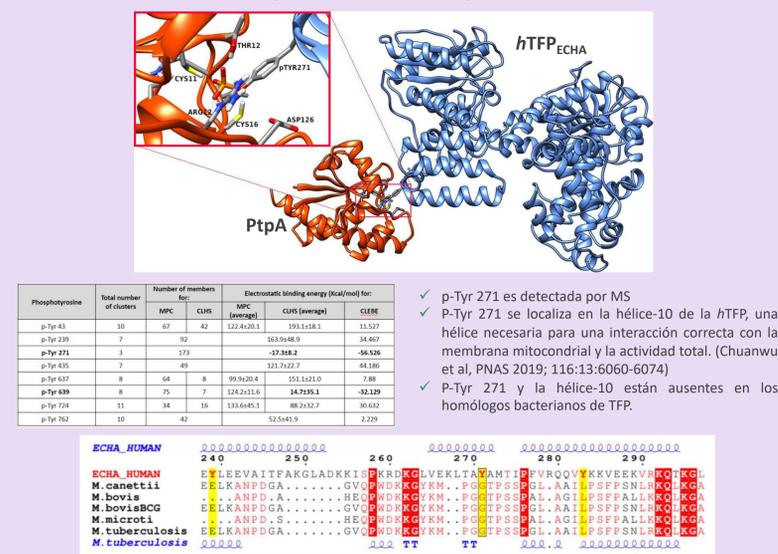
Producción de proteínas recombinantes



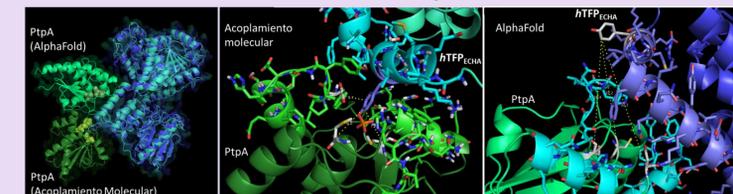
Ensayos de pinocitosis



La P-Tyr 271 es el blanco potencial de la PtpA micobacteriana y está localizada en una hélice relevante para la localización y actividad de la TFP humana

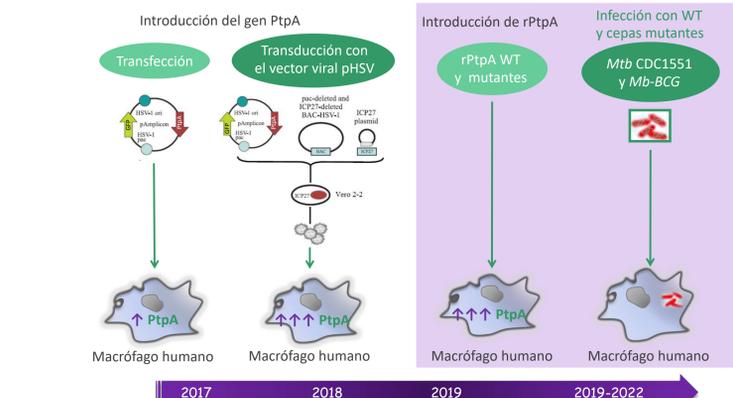


El complejo obtenido por acoplamiento molecular se comparó con el obtenido con AlphaFold

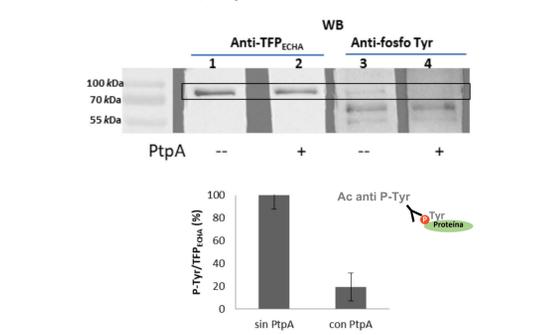


Resultados preliminares utilizando la herramienta AlphaFold:
→ Los complejos obtenidos al resolver por AlphaFold o Acoplamiento Molecular fueron distintos.
→ Las distancias entre los carbonos α de los residuos catalíticos de PtpA y el carbono más cercano del residuo de Tyr-271 de hTFP^{ECHA} se triplican, dando cuenta de la lejanía del residuo de interés del sitio catalítico.
→ Cabe destacar que utilizando AlphaFold no se pueden indicar los residuos catalíticos, así como tampoco fosforilar los residuos de interés, siendo el estudio menos dirigido que al utilizar Acoplamiento Molecular.

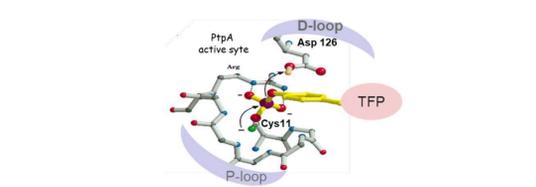
¿Qué ocurre en los macrófagos?



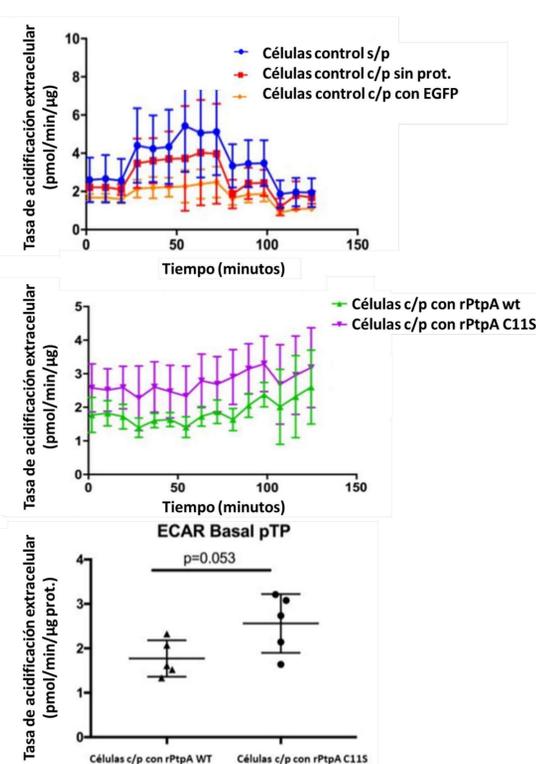
In vitro, PtpA defosforila la hTFP



La defosforilación de hTFP es dependiente de la dosis de PtpA



En las células THP1 que contenían PtpA-wt pero no el mutante inactivo PtpA-C11S, observamos una disminución en la tasa de acidificación extracelular



DESAFÍOS

Utilizando el modelo de infección, intentamos responder a estas preguntas:

- ¿La actividad o localización de hTFP se ve afectada por PtpA?
- ¿PtpA se correlaciona con la acumulación de ácidos grasos/triacilglicéridos en el citosol?
- ¿La actividad de PtpA se correlaciona con la inhibición de la glicólisis mediante su interacción con el potencial sustrato PFK (K6PP)?

Difusión:

→ Continuar con diversas tareas de difusión de nuestro trabajo de investigación.



AGRADECIMIENTOS

