

DETECCIÓN DE DOS MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES EN LA ANTITROMBINA POR MÉTODOS PROTEÓMICOS. IMPLICACIONES ESTRUCTURALES, CONFORMACIONALES Y FUNCIONALES

A. Ordóñez^a, F. Corrales F^b, A. Miñano^a, D. Hernández-Espinosa^a, R. González-Conejero^a, C. Martínez^a, V. Vicente^a, J. Corral^a

^a Universidad de Murcia. ^b Unidad de Proteómica, Centro de Investigación de Medicina Aplicada, Navarra

Fundamentos: El proteoma, a diferencia del genoma, se caracteriza por una gran variabilidad debida principalmente a modificaciones post-traduccionales. Estos cambios, que pueden tener relevancia funcional y patológica, no se han estudiado ampliamente por la dificultad técnica. La antitrombina (AT), principal anticoagulante endógeno, es una proteína estructuralmente flexible lo que la hace sensible a factores capaces de modificar sus interacciones moleculares. Hemos observado que dos modificaciones post-traduccionales implicadas en procesos fisiopatológicos, oxidación y citrulinación, afectan la conformación nativa de la AT provocando la pérdida de su función. Sin embargo, hasta el momento no se conoce la base estructural de estos efectos, ni los residuos implicados.

Objetivo: Estudiar proteómicamente la oxidación y citrulinación de la AT, y relacionar los resultados con los cambios conformacionales y funcionales.

Métodos: Oxidamos y citrulinamos *in vitro* AT purificada, en presencia o ausencia de heparina. Digerimos la AT con tripsina y los péptidos generados fueron separados por HPLC y evaluados por espectrometría de masas.

Resultados: El método proteómico identificó Arg citrulinadas por 2 evidencias consistentes: 1) cambio del patrón de digestión (citrulina no es reconocida por la tripsina), 2) masa de los péptidos generados (citrulina tiene 1U masa más que la Arg). La oxidación de residuos Cys y Met se identificó por cambio de masas (residuos oxidados tienen 16U masa más). Ambas modificaciones afectan residuos estructuralmente expuestos en la molécula de AT, algunos cruciales en la estructura de la molécula y cuya modificación podría explicar la polimerización que inducen estas modificaciones. La unión de heparina a la AT protege de forma estérica la modificación de residuos próximos al sitio de unión de heparina. Este efecto justifica el papel protector conformacional de la heparina. Sin embargo, la heparina no sólo no protege la funcionalidad de la AT ante citrulinación sino que acelera su inactivación, ya que facilita la citrulinación de la Arg localizada en P1, clave en la función inhibitoria, al exponerla a la enzima PAD.

Discusión: Empleando métodos proteómicos hemos localizado en la AT los residuos dianas de dos modificaciones post-traduccionales con relevancia funcional y conformacional (oxidación y citrulinación) que explican sus consecuencias estructurales y funcionales. Estos sistemas pueden ser empleados para estudiar otras modificaciones post-traduccionales de ésta y otras moléculas hemostáticas y pueden ser herramientas útiles en la búsqueda de nuevos marcadores con valor pronóstico.