

MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTITROMBINA PLASMÁTICOS POR LARGE, UNA N-ACETILGLUCOSAMINILTRANSFERASA IMPLICADA EN O-GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS

M.E. de la Morena-Barrio¹, I. Martínez-Martínez¹, R. Gutiérrez-Gallego², A. Miñano¹, A.I. Antón¹, J. Navarro-Fernández¹, S. Águila¹, N. Bohdan¹, V. Vicente¹, J. Corral¹

¹Centro Regional de Hemodonación. Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital Universitario Morales Meseguer. Universidad de Murcia. ²Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad Pompeu Fabra. Barcelona

Nuestro grupo demostró la poca variabilidad del gen que codifica la antitrombina (AT) y su escasa asociación con los niveles de AT en población sana, sugiriendo la existencia de genes moduladores. Mediante un estudio GWAS asociamos el gen LARGE, que codifica una N-acetilglucosaminiltransferasa (NAcG-T) implicada en O-glicosilación de proteínas, con los niveles de AT.

Objetivo: Validar y caracterizar el efecto modulador de LARGE sobre los niveles plasmáticos de AT.

Métodos: En 10 sujetos sanos cuantificamos la expresión de LARGE en células mononucleadas mediante qRT-PCR, así como los niveles de AT en plasma mediante sistemas cromogénicos. Mediante análisis glicómico de alta resolución analizamos la AT plasmática purificada de los sujetos con mayor y menor expresión de LARGE. El efecto del silenciamiento de LARGE, realizado con siRNA, se evaluó en 2 líneas celulares, HepG2 (con expresión constitutiva de AT) y HEK-EBNA transfectada con cDNA de AT humana. Los niveles de expresión extracelular e intracelular de AT se estudiaron mediante ELISA, Western Blot, microscopía confocal y analizando la actividad anti-coagulante. Además, en HepG2 evaluamos la expresión de otras glicoproteínas con N-glicosilación (antitripsina, protrombina y transferrina).

Resultados: Observamos una correlación significativa entre la expresión de LARGE y la actividad anti-FXa en sujetos sanos ($r^2=0.8$). Sin embargo, el análisis glicómico de la AT purificada de 2 sujetos con alta y baja expresión de LARGE no mostró diferencias significativas en cuanto a niveles y características de los componentes glucídicos de AT. Específicamente, el contenido de N-acetilglucosamina era similar. Por otro lado, el silenciamiento de LARGE (en los dos tipos celulares fue del 50%) redujo 4 veces los niveles extracelulares de AT. La proteína secretada tenía el mismo tamaño y funcionalidad que la generada por células no silenciadas. Así mismo, se observó un aumento de los niveles intracelulares de AT en las células silenciadas. El mismo efecto, pero menos intenso, se objetivó para las otras glicoproteínas hepáticas evaluadas.

Conclusión: Nuestro estudio valida de forma experimental el papel del gen LARGE como modulador de los niveles de AT. La reducción de niveles de LARGE provoca una reducción en la secreción de AT y su retención intracelular. El efecto se extrapola a otras glicoproteínas, lo que sugiere que esta NAcG-T, implicada previamente sólo en O-glicosilación, participa de forma directa o indirecta en la secreción de N-glicoproteínas. Defectos funcionales o reducción de niveles de LARGE podrían incrementar el riesgo trombótico.

(SAF2009-08993, 04515/GERM06, AP59372009, RECAVA RD06/0014/0039)