

INESTABILIDAD CONFORMACIONAL DE LA ANTITROMBINA RELACIONADA CON MUTACIONES. RELEVANCIA DEL PLEGAMIENTO INTRACELULAR PARA LA FORMACIÓN DE OLIGÓMEROS

S. Águila, J. Navarro-Fernández, M.E. de la Morena-Barrio, N. Bohdan, J. Padilla, V. Vicente, J. Corral, I. Martínez-Martínez

Centro Regional de Hemodonación. Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital Universitario Morales Meseguer. Universidad de Murcia

Durante el plegamiento intracelular, las serpinas adquieren una conformación metaestable que les permite realizar de forma eficaz su actividad inhibitoria de serín proteasas. Agentes desnaturizantes y mutaciones pueden inducir la transición a formas más estables, polímeros o latente, que se asocian con desarrollo de diferentes enfermedades. En antitrombina (AT) el mecanismo de polimerización se realiza mediante intercambio de dominios entre monómeros, similar al de otras enfermedades conformacionales como Parkinson o Alzheimer. En este trabajo caracterizamos el efecto conformacional de la mutación S365L en el gen de AT, identificada en un paciente con clínica trombotica severa y deficiencia de AT, que presentaba una reducción significativa (52%) de niveles circulantes y dímeros unidos por puente disulfuro en el plasma. Empleamos un modelo recombinante de células HEK-EBNA transfectadas con AT silvestre (WT) o con la mutación S365L, generada mediante mutagénesis dirigida. Los niveles y características de la AT secretada al medio e intracelular se estudiaron mediante sistemas electroforéticos, inmunofluorescencia y microscopía electrónica. También evaluamos las características funcionales y sensibilidad estructural de las moléculas secretadas.

Resultados: La mutación S365L se asocia con menor secreción y mayor retención intracelular. La mayoría de la AT secretada forma dímeros cerrados (hiperestables y sin capacidad de progresar) unidos por puente disulfuro, y una pequeña proporción de monómeros. Este monómero no tiene mayor inestabilidad estructural que el WT, pero es incapaz de inhibir a la trombina y actúa como sustrato. La AT intracelular forma pequeños acúmulos asociados con retículo endoplásmico dilatado. Destacamos que la mayoría de la AT intracelular forma polímeros unidos por puente disulfuro.

Conclusiones: La mutación S365L afecta a un residuo altamente conservado en serpinas que se localiza en la hebra s5A. Este residuo es clave en la estabilidad conformacional durante el plegamiento intracelular, aunque no impide el plegamiento nativo de un monómero no funcional, favorece la formación de oligómeros por intercambio de dominio. A diferencia del resto de serpinas, todos los procesos de oligomerización de AT se estabilizan por puente disulfuro. Sólo los dímeros con una conformación cerrada son secretados, mientras que los que tienen una conformación abierta son capaces de progresar, formar polímeros que no se secretan y posiblemente tengan capacidad infectiva reclutando AT WT, que explicaría la severidad trombotica del paciente.

(SAF2009-08993, 04515/GERM 06; AP59372009, RECAVA RD06/0014/0039)