

Expresión diferencial de las cuatro isoformas de la proteína de unión a calcio S100A9 (Calgranulina B) en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con lupus eritematoso sistémico respecto a controles sanos

Pavón EJ¹, Longobardo V², Caler AJ², Lario A², Carrascal M³, Abián J³, Callejas-Rubio JL⁴, Ortego-Centeno N⁴, Zubiaur M⁵, Sancho J.¹

¹Departamento de Biología Celular e Inmunología, Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Armilla (Granada). ²Servicio de Proteómica, Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Armilla (Granada). ³Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB, IIBB-CSIC, Bellaterra (Barcelona). ⁴Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital Clínico San Cecilio, Granada. ⁵Unidad de Investigación, Centro de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid).

Introducción

La S100A8 y la S100A9 pertenecen a la familia S100 de proteínas de unión a calcio. Normalmente forman un heterodímero (S100A8/S100A9) llamado Calprotectina. Se expresan preferentemente en células de origen mieloide. Muestran capacidad de unión a calcio en estados de diferenciación temprana de monocitos y neutrófilos, donde representan aproximadamente el 40% del contenido proteico del citosol, no detectándose en macrófagos en reposo, o en linfocitos. Aunque su localización principal sea citosólica, pueden traslocarse al citoesqueleto o a la membrana celular cuando ocurren aumentos de la concentración de calcio intracelular. También pueden secretarse de forma activa al medio extracelular por neutrófilos estimulados y monocitos, o liberarse al medio externo como producto de rotura o muerte celular. Se han descrito incrementos en la expresión de S100A8 y S100A9 en procesos inflamatorios.

Material y métodos

Se analizaron 30 muestras de pacientes con lupus previamente diagnosticados según los criterios de reumatología americano, y 16 muestras de personas sanas voluntarias que sirvieron como controles. Las PBMCs se obtuvieron por centrifugación en gradiente de densidad con *Histopaque 1077* (Sigma-Aldrich química S.A Spain) de sangre periférica a la que se le ha añadido el anticoagulante K2-EDTA (BD Vacutainer). La separación de las proteínas en geles 2-DE se realizó utilizando el sistema *Protean IEF* (Bio-Rad) en la primera dimensión y el sistema

CRITERION (Bio-Rad) en la segunda (Pavón et al, 2006). Los geles se tiñeron secuencialmente con Pro-Q-Diamond, Sypro-Rubi y Bio-Safe Coomassie. La identificación de proteínas por MALDI-TOF MS o por secuenciación utilizando nano(n)ESI. IT MS/MS se realizó de forma idéntica a la de nuestro trabajo previo (Pavón et al, 2006).

Resultados

Se han identificado, por espectrometría de masas, los spots 6, 7 y 19 (Figura 1): 7 corresponde a S100A9 wild-type, 6 a S100A9 truncada en su extremo N-terminal (spot inferior) y a S100A9 wt fosforilada en la Thr C-terminal (spot superior), y 19 a S100A9 truncada y fosforilada en la Thr C-terminal. La expresión de las variantes del spot 6 está aumentada en pacientes con lupus eritematoso sistémico respecto a controles sanos.

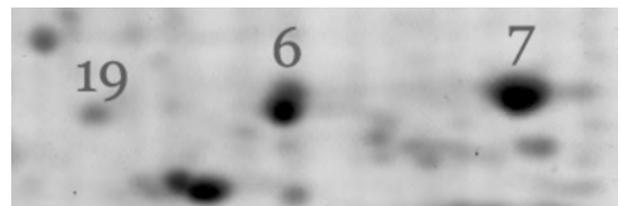


Figura 1. Spots identificados

Conclusiones

La utilización de geles 2-D, tinción secuencial con Pro-Q-Diamond y Sypro-Ruby e identificación de las proteínas por MS y posterior secuenciación de péptidos específicos por MS/MS permite identificar modificaciones postraduccionales como fosfo-

relación en treonina o truncaciones “naturales”, así como determinar cambios relativos de estas modificaciones en situaciones patológicas (enfermedad autoinmune vs controles sanos).

Bibliografía

Pavon, E.J., Munoz, P., Lario, A., Longobardo, V., et al., *Proteomics*, 2006. 6 Suppl 1: p. S282-92.

Regulación de la Metiltioadenosina Fosforilasa por oxido-reducción en células hepáticas. Mecanismo e implicaciones funcionales

Fernández-Irigoyen J, Santamaría E, Corrales F.

División de Hepatología y Terapia Génica. Laboratorio de Proteómica. CIMA. Universidad de Navarra. Pamplona. España.

La enzima 5'-metiltioadenosina fosforilasa (MTAP) cataliza de la formación de adenina y 5'-metiltioribosa 1 fosfato a partir de la 5'-metiltioadenosina (MTA). En humanos, una deficiencia en la actividad MTAPasa se ha correlacionado con diversas enfermedades, incluyendo cirrosis y hepatocarcinoma. En el presente trabajo se ha investigado la regulación de la actividad MTAPasa por especies reactivas del oxígeno. Los datos obtenidos muestran la inactivación de la enzima MTAP hepática tanto en un modelo de ratón tratado con lipopolisacárido bacteriano (LPS) como en células HepG2 incubadas con de tert-butil hidroperóxido. Por otra parte, la

MTAP recombinante purificada se inactivó de forma reversible en presencia de peróxido de hidrógeno. La pérdida de actividad de la MTAP mediada por radicales libres resulta de la reducción de la Vmax y ocurre por la oxidación específica de los residuos de cisteína 136 y 223 a ácido sulfénico, que podrían ser estabilizados mediante la formación de intermediarios sulfenil amidas. Además, identificamos un puente disulfuro entre las cisteínas 145 y 211 tras la exposición de la enzima a peróxido de hidrógeno. Sin embargo, esta modificación no participa en la inactivación de la actividad MTAPasa, como se pudo comprobar mediante experimentos de mutagénesis dirigida.

From liver tissue to phosphorylation sites

*Rodríguez-Suárez EM †, Galán Cousillas A *, Elortza F †, Castro Espido A *, Martínez-Chantar ML † and Mato JM†.*

†CIC bioGUNE (Technological Park Bizkaia, Spain). *OWL Genomics (Technological Park Bizkaia, Spain)

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a progressive disease that develops from hepatic steatosis to cirrhosis and liver failure. S-adenosylmethionine (SAME) is considered a key metabolite that regulates hepatocyte growth, death and differentiation. A chronic hepatic SAME deficiency facilitates the de-

velopment of fatty liver and its progression to NASH and hepatocellular carcinoma (HCC). Methionine adenosyltransferase 1A (MAT1A) is expressed exclusively in the liver and in the pancreas in adults and synthesizes SAME. Another key player in the metabolism of methionine is Glycine N-methyltransferase