

13 Producción de la proteína p67^{phox} recombinante del sistema NADPH oxidasa mediante el sistema baculovirus

Andrés Arias¹, María Teresa Rugeles², Juan Matute³, Pablo Patiño²

PALABRAS CLAVE

NADPH OXIDASA
BACULOVIRUS
PROTEÍNA P67^{PHOX}

INTRODUCCIÓN

La destrucción de microorganismos fagocitados por los neutrófilos (PMN) mediante la generación de oxidantes microbicidas ocurre gracias a la acción del sistema NADPH oxidasa. Este sistema se encuentra ubicado en la membrana de las células fagocíticas y cataliza la producción de anión superóxido (O₂⁻). Este sistema está formado por cinco proteínas: gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox}, y mutaciones en cuatro de estas proteínas (gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}) conducen a una inmunodeficiencia primaria conocida como Enfermedad Granulomatosa Crónica.

OBJETIVO

Expresar el gen normal (*wf*) y mutado (*m*) de la proteína p67^{phox} en forma recombinante en el sistema Baculovirus.

METODOLOGÍA

Subclonación del gen de p67^{phox} en plásmido donador pFastBac.

Los primers *EcoR*p67^{phox}-reverse y *EcoR*p67^{phox}-forward se utilizaron para amplificar el gen de p67^{phox} mediante PCR a partir del vector pBphox67. Posteriormente se subclonó en el plásmido donador pFastBac. Se transformaron bacterias DH5α y se cultivaron en platos de agar con ampicilina. Se verificó la correcta inserción del inserto por endonucleasas de restricción y PCR.

Transposición

Bacterias DH10Bac fueron utilizadas para ser transformadas con 1 ng del vector pFastBac-p67^{phox} recombinante. Se incubaron a 37°C/24horas en medio suplementado con 50 µg/mL de kanamicina,

7 µg/mL de gentamicina, 10 µg/mL de tetraciclina, 100 µg/mL de X-gal y 40 µg/mL de IPTG.

Aislamiento del Bámido Recombinante

Las colonias blancas que contienen el bámido recombinante se seleccionaron para el aislamiento del DNA bacmídico recombinante.

Transfección de células Sf9 con el bámido recombinante

Células de insecto Sf9 y H5 fueron utilizadas para su transformación con el bámido recombinante mediante la utilización de liposomas catiónicos.

Western Blot

Con el fin de confirmar la expresión de la p67^{phox} recombinante en las células de insecto se realizó una inmunodetección con anticuerpos monoclonales en los lisados de células sf9 y H5.

RESULTADOS

1. El gen de la proteína p67^{phox} se subclonó satisfactoriamente en el plásmido donador pFastBac.
2. Se produjo en forma recombinante p67^{phox} humana en el sistema baculovirus.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La producción de la proteína recombinante p67^{phox} en nuestro laboratorio abre el camino para desarrollar estudios moleculares de los fenómenos que ocurren en la activación del sistema NADPH oxidasa. De esta manera esperamos obtener información acerca de algunos dominios importantes en las proteínas del sistema oxidasa, con el fin de construir un modelo donde se postulen las posibles interacciones, formas de regulación y activación de este sistema enzimático, que redunden en un futuro en la posibilidad de modular negativamente la producción de radicales del O₂.

BIBLIOGRAFÍA

1. BABIOR BM. NADPH Oxidase: An Update. *Blood* 1999; 93: 1464-1476.
2. WINKELSTEIN JA, MARINO MC, JOHNSTON RB, BOYLE J, CURNUTTE J, GALLIN JI, et al. Chronic granulomatous disease. *Medicine* 2000; 79: 155-169.
3. DELEO F, QUINN M. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukocyte Biol* 1996; 60: 677-691

.....
¹ Estudiante de Maestría, Posgrado en Ciencias Básicas Biomédicas
² Profesor, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.
³ Estudiante de Medicina, Joven Investigador, Universidad de Antioquia.
Grupo Inmunodeficiencias Primarias, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín
aarias@catios.udea.edu.co