

06 Análisis de la localización, dinámica intracelular y producción de O_2^- por el sistema NADPH oxidasa de las células fagocíticas

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

PALABRAS CLAVE

NADPH OXIDASA

GFP ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

INTRODUCCIÓN

El sistema NADPH oxidasa, un sistema encargado de producir anión superóxido (O_2^-) en las células fagocíticas, está formado por las proteínas: gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y la proteína Rac. Las células COS-7, una línea celular de riñón de simio, que expresa endógenamente Rac1, y que por transfección estable expresan gp91^{phox}, p47^{phox} y p22^{phox}, pueden ser cotransfectadas adicionalmente con vectores episomales pGFP-N3, pEGFP-C1 y pcDNA3.1/zeo(+) que contengan el cDNA tipo silvestre y mutante de la proteína p67^{phox} obtenidos por mutagénesis sitio-dirigida. Estos vectores contienen el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), útil para explorar la localización intracelular y la dinámica de los componentes del sistema oxidasa. Después de la cotransfección, se estimulan las células con PMA y se determina la producción de O_2^- y la señal de fluorescencia generada por GFP de forma directa en células vivas por microscopía confocal.

OBJETIVOS

- Modificar por medio de la mutagénesis sitio-dirigida el gen que codifica para la proteína p67^{phox}.
- Subclonar el gen de la proteína p67^{phox} tipo silvestre y el gen mutante en los vectores pGFP-N3, pEGFP-C1 y pcDNA3.1/zeo(+).
- Expresar el gen de la proteína p67^{phox} tipo silvestre y el gen mutante en células COS-7 y determinar su actividad mediante la producción de anión superóxido y su localización por microscopía confocal.

METODOLOGÍA

Mutagénesis sitio dirigida. Se realizó por el método *geneeditor in vitro site-directed mutagenesis system*, promega.

Reacción de secuenciación. Se secuenciaron las regiones de interés en ambos genes a partir del producto generado de la reacción de mutagénesis sitio-dirigida.

Subclonación del gen de p67^{phox} en los plásmidos pcDNA3.1/zeo(+), pGFP-N3, pEGFP-C1. Una digestión parcial del vector pBfox67

en los sitios *PstI* y *BamHI* se utilizó para liberar el gen de la proteína p67^{phox} tipo silvestre y los mutantes. El vector pcDNA3.1/zeo(+) se preparó con las mismas enzimas. La subclonación en los vectores pGFP-N3 y pEGFP-C1 se realizó por PCR. Los vectores se defosforilaron y se ligaron con T4 DNA ligasa, Promega. Con el producto de ligación se transformaron bacterias DH5a y se cultivaron platos de agar con ampicilina y kanamicina. Se verificó la correcta inserción del inserto por endonucleasas de restricción y PCR.

Transfección de células COS-7. La Transfección de las células COS-7 se realizará con Lipofectamina Plus, Life technology.

Inmunoblot. La presencia de las proteínas p67^{phox} de las células transfectadas se determinará mediante electroforesis en gel SDS-polyacrylamida al 8% y posterior transferencia a membranas PVDF. Se utilizarán anticuerpos monoclonales específicos para esta proteína y se detectará por quimioluminiscencia.

Actividad NADPH oxidasa y localización celular. La producción de anión superóxido se determinará en un ensayo de cinética cuantitativa basada en la reducción del citocromo c. La localización celular de la proteína p67^{phox}/GFP será excitada a 488nm con un laser de kriptón-argón y observado utilizando un filtro de 515-540nm en microscopía confocal.

RESULTADOS ESPERADOS

En este trabajo esperamos determinar el efecto que tienen algunas mutaciones y polimorfismos en el gen de la proteína p67^{phox} en la producción de anión superóxido y la interacción de esta proteína con las demás subunidades del sistema, bajo la activación con PMA.

DISCUSIÓN

Con este trabajo pretendemos aportar al esclarecimiento de los mecanismos que regulan la producción de radicales libres del oxígeno por el sistema NADPH oxidasa. Así mismo, aportar la descripción de algunos dominios importantes en la proteína p67^{phox}, con el fin de construir un modelo donde se postulen las posibles interacciones, formas de regulación y activación de este sistema enzimático, que busquen la posibilidad de modular la producción de O_2^- en aquellas condiciones asociadas con daño tisular o en los pacientes afectados con Enfermedad Granulomatosa Crónica.

BIBLIOGRAFÍA

1. WINKELSTEIN JA, MARINO MC, JOHNSTON RB, BOYLE J, CURNUTTE J, GALLIN JI, et al. Chronic granulomatous disease. *Medicine* 2000; 79: 155-169.
2. MARTIN C, KAIN S. Green fluorescent protein: properties, applications and protocols. 1998.
3. BABIOR BM. NADPH Oxidase: An Update. *Blood* 1999; 93: 1.464-1.476.

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