

EXPRESIÓN DE LA LACTADHERINA RECOMBINANTE HUMANA EN EL SISTEMA CELULAS DE INSECTO-BACULOVIRUS Y DETERMINACIÓN DE SU PERFIL DE GLICOSILACION

Sandino Estrada Mondaca y Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich

Instituto de Biotecnología, UNAM. Departamento de Bioingeniería. Av. Universidad 2001, Colonia Chamilpa. 62250 Cuernavaca, Morelos. Fax. (7) 313 88 11. Email: sandino@ibt.unam.mx

Palabras clave: glicosilación, baculovirus, recombinante.

Introducción. La glicosilación de las proteínas es una de las etapas críticas que determinan en parte la actividad de algunas proteínas de interés terapéutico (1). Una glicoproteína con posible interés para la industria farmacéutica es la lactadherina, una proteína del glóbulo graso de la leche materna (2), que de acuerdo con algunos reportes inhibe las manifestaciones sintomáticas de infección por rotavirus (3) a través de los ácidos siálicos presentes en su glico estructura compleja (4).

El objetivo del presente trabajo es expresar la lactadherina humana en células de insecto con el fin de estudiar el potencial de glicosilación de este sistema de expresión.

Metodología. El baculovirus recombinante fue construido usando el kit Bacto Bac (Gibco Life Technologies) en cuyo vector de transferencia se insertó el cDNA de la lactadherina humana (Invitrogen). Este baculovirus fue usado para infectar la línea celular de insecto H5 a una multiplicidad de infección de 0.1 unidades formadoras de placa por célula. Las células se cultivaron en medio SF900 II libre de suero adicionado con 0.1% Plurónico F68, a 27°C y con una agitación de 100 rpm. Producciones típicas de la glicoproteína recombinante se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de trabajo de 60 ml con 1×10^6 células/ml durante 120 horas. La proteína se solubilizó del pellet celular después de sonicación del mismo en 25 mM Tris pH 7.0, con posterior adición de TX-100 al 1.25%. Determinaciones de la cantidad de proteína se realizaron por el método de Bradford y por densitometría usando el programa NIH 1.61. La descripción del perfil de glicosilación se realizó separando los carbohidratos asociados a las asparaginas con ayuda de la endoglicosidasa PNGasaF. Los carbohidratos así liberados fueron marcados con un fluoróforo, sometidos a electroforesis (FACE) y visualizados por excitación con luz UV.

Resultados y Discusión. La lactadherina recombinante se expresa a partir de las 24 horas aumentando progresivamente hasta las 120 horas (Fig. 1). Se obtiene una proteína de un tamaño aproximado de 56 kDa en gel desnaturalizante que se tiñe tenuemente con el reactivo de Schiff (Fig. 2), reflejo del bajo contenido de carbohidratos (10 a 11%) que constituye su glicosilación. En una producción no optimizada de lactadherina recombinante humana en células H5 se obtienen alrededor de 10 µg/ml. La determinación de la composición de los carbohidratos asociados a la cadena peptídica se realiza por digestión en el gel de la banda proteica para posteriormente realizar una electroforesis de los carbohidratos previamente marcados con ANTS.

Fig. 1. Cinética de producción de la lactadherina recombinante humana. La flecha indica la posición de la lactadherina.

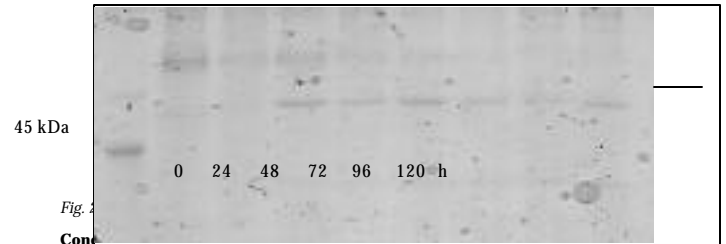


Fig. 2

Con

capacidad de una línea de células de insecto para glicosilar una proteína recombinante humana. La posibilidad de que células de insecto glicosilen con un patrón similar al de células humanas determinará la utilización mas extensa de este sistema de expresión en el ámbito industrial.

Agradecimientos. CONACyT I33104-B, 33348-B, DGAPA IN216100.

Bibliografía.

1. Jenkins, N, Parekh, R.B, James, D.C. (1996). Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nature Biotechnology* 14: 975-981.
2. Giuffrida, M. G., Cavalletto, M., Giunta, C., Corti, A., Godovac-Zimmermann, J. (1998). Isolation and characterization of full and truncated forms of human breast carcinoma protein BA46 from human milk fat globule membranes. *J Protein Chem* 17(2): 143-148.
3. Newburg, D.S., Peterson, J.A., Ruiz-Palacios, G.M., Matson, D.O., Morrow, A.L., Shultz, I., Guerrero, M. de L., Chaturvedi, P., Newburg, S.O., Scallan, C.D., Taylor, M.R., Ceriani, R.L., Pickering, L.K. (1998). Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *The Lancet* 351: 1160-1164.
4. Peterson, J.A., Patton, S., Hamosh, M. (1998). Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections. *Biol. Neonate* 74: 143-162.

