

## EFFECTO DE LA TRANSICIÓN A–G EN LA POSICIÓN –21 DEL INTRÓN 10 DEL GEN *NCF-2* SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p67-phox

EFFECT OF A–G TRANSITION AT POSITION –21 OF INTRON 10 OF *NCF-2* GEN ON P67-phox EXPRESSION

Idalid Ruiz<sup>1</sup> y Pablo Javier Patiño<sup>2</sup>

### Resumen

Las células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos monocitos y macrófagos) producen moléculas reactivas de oxígeno que tienen una importante acción microbicida. La generación de estas moléculas ocurre durante el fenómeno de explosión respiratoria, el cual depende de la activación de un sistema enzimático conocido como NADPH oxidasa. La importancia de este sistema se ha evidenciado gracias al estudio de la enfermedad granulomatosa crónica, pues en esta enfermedad se produce un trastorno de este complejo enzimático, lo cual altera los mecanismos microbicidas y conduce a la aparición de infecciones recurrentes. Este defecto es causado por una mutación en alguno de los genes que codifican para los componentes del sistema NADPH oxidasa. Además de estas mutaciones, se han descrito varios polimorfismos en dichos genes. Sin embargo, estos cambios nucleotídicos no se han asociado con mayor susceptibilidad a infecciones. Recientemente describimos la transición A–G en la posición –21 en el extremo 3' del intrón 10 del gen *NCF-2* como un posible polimorfismo. Puesto que esta región es necesaria para el procesamiento del pre-mRNA y en un trabajo previo se observó que la presencia de dicha transición se asociaba con la presencia de moléculas de mRNA del gen *NCF-2* en las que estaba ausente el exón 11, se analizó la expresión de la proteína de 67 KDa del sistema NADPH oxidasa en individuos que tenían diferentes genotipos (A/A, G/G y A/G) en la posición –21 en el extremo 3' del intrón 10.

*Palabras clave:* células fagocíticas, NADPH oxidasa, p67-phox, enfermedad granulomatosa crónica (EGC).

### Abstract

Phagocytic cells (neutrophils, eosinophils, monocytes and macrophages) produce reactive oxygen species (ROS) which have important microbicidal activity. The generation of these molecules occurs during the respiratory burst phenomenon, which depends upon the activation of an enzymatic system known as NADPH oxidase. The importance of this system has been shown through the study of chronic granulomatous disease, because with this disease the enzymatic complex is disrupted, which alters microbicidal mechanisms and leads to recurrent infections. This disorder is caused by mutations in any of the genes encoding the components of the NADPH oxidase complex. In addition to these mutations, several polymorphisms have been described for these genes. However, these nucleotide changes have not been associated with a greater susceptibility to infections. Recently, we described the A–G substitution at position –21 in the extreme 3' end of intron 10 of the *NCF-2* gene as a possible polymorphism. Because this sequence belongs to the branch point sequence necessary for pre-mRNA splicing and a previous study showed skipping of exon 11 of the p67-phox mRNA, we analyzed the protein p67-phox expression in subjects carrying the different genotypes (A/A, A/G and G/G) in the position –21 of the 3' end of intron 10.

*Key words:* phagocytic cells, NADPH oxidase, p67-phox, chronic granulomatous disease (EGC).

## INTRODUCCIÓN

Los fagocitos tanto polimorfonucleares, en particular neutrófilos (PMN), como mononucleares,

cumplen un papel fundamental en la defensa innata del organismo ante la infección gracias a la utilización del mecanismo conocido como fagocitosis (Roos y Curnutte, 1999). Cuando la fago-

Recibido: junio de 2002; aprobado para publicación: septiembre de 2002.

<sup>1</sup> Estudiante de Biología, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín. E-mail: idalid18@eudoramail.com.

<sup>2</sup> Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Facultad de Medicina, Corporación Biogénesis, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín. E-mail: ppatino@carios.udea.edu.co.

citosis se pone en marcha, ocurre un incremento en el consumo de oxígeno, fenómeno conocido como *explosión respiratoria*, que se acompaña por la generación de diversos intermediarios reactivos de oxígeno, incluyendo el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y los hipohalógenos. Varias de estas moléculas pueden tener acción microbicida y constituyen los mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno (Chanock *et al.*, 1994; Roos y Curnutte, 1999; Leto 1999).

El complejo enzimático responsable de la explosión respiratoria está compuesto de varios elementos, tanto de membrana como de citoplasma, los cuales constituyen el sistema NADPH oxidasa de las células fagocíticas (De Méndez *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1997). Este es un sistema enzimático que se encarga de transportar electrones desde el NADPH citosólico al O<sub>2</sub> en el fagolisosoma. El componente de membrana es un heterodímero conformado por una glicoproteína de 91 KDa (gp91-phox) y una proteína de 22 KDa (p22-phox), llamado flavocitocromo b<sub>558</sub>. En el citoplasma de estas células se encuentran proteínas de 47 KDa (p47-phox), 67 KDa (p67-phox) y otra de 40 KDa (p40-phox) (Ross *et al.*, 1996; Deleo y Quinn, 1996; Leto, 1999), las cuales están formando un complejo citosólico que se transloca a la membrana cuando ocurre la activación de la fagocitosis. Además de estas proteínas existen otras moléculas esenciales para la activación del sistema oxidasa; una de ellas pertenece a la familia de proteínas pequeñas que unen GTP, dentro de las cuales la más sobresaliente es la proteína Rac.

La importancia biológica de los mecanismos microbicidas dependientes de oxígeno se ha evidenciado por el estudio de la *enfermedad granulomatosa crónica* (EGC). La EGC es una inmunodeficiencia primaria caracterizada por la presencia de infecciones severas y recurrentes por microorganismos catalasa positivos, muchos de los cuales normalmente son de baja virulencia, como *Staphylococcus epidermis*, *Serratia marcescens* y *Aspergillus spp* (Curnutte, 1993). Las personas con EGC no presentan la explosión

respiratoria después de la fagocitosis y por tanto son incapaces de eliminar eficientemente dichos microorganismos. Hasta el presente todos los pacientes con EGC presentan una alteración en uno de los genes que codifican para las proteínas gp91-phox, p22-phox, p47-phox o p67-phox (Curnutte, 1993, De Boer *et al.*, 1994; Grizot *et al.*, 2001).

Mientras p47-phox parece cumplir un papel crítico en la iniciación del ensamblaje y activación del sistema NADPH oxidasa, se piensa que p67-phox tiene un papel directo en la regulación del flujo de electrones gracias a la interacción directa con el flavocitocromo b<sub>558</sub>. Además, se cree que p67-phox o Rac inducen cambios en el flavocitocromo b<sub>558</sub> que permiten la unión al NADPH. Muchas de las mutaciones en p67-phox responsables de EGC están localizadas en la región N-terminal de la proteína (residuos 1-213) y este dominio de p67-phox es esencial para la actividad NADPH oxidasa (Nisimoto *et al.*, 1999; Leusen *et al.*, 1999; Grizot *et al.*, 2001; Gregory *et al.*, 2001).

El gen que codifica para p67-phox, denominado *NCF-2*, está ubicado en la región cromosómica 1q25, tiene una extensión aproximada de 40 kpb y contiene 16 exones que codifican una proteína de 526 aminoácidos (Kenney *et al.*, 1993). En este gen se han descrito varias mutaciones asociadas con el fenotipo de EGC, así como polimorfismos en diferentes regiones de su secuencia. Recientemente, el grupo de inmunodeficiencias primarias de la Universidad de Antioquia encontró algunos cambios no reportados previamente, en regiones no codificadoras del gen p67-phox (Avenidaño y Patiño, 1999). Uno de ellos corresponde a la transición de una adenina (A) por guanina (G) en el intrón 10, 21 nucleótidos antes del inicio del exón 11 (IVS10 -21 A→G). Aunque este cambio nucleotídico no se asoció con el fenotipo EGC, en algunos de los individuos analizados se observaron dos especies de RNA mensajero, uno que incluía el exón 11 (normal) y otro con pérdida completa de ese exón (Patiño *et al.*, 1999). Esto se podría explicar porque la adenina en la posición -21 sea importante para el procesamiento del RNA al interactuar con el

extremo 5' del intrón 10 que queda libre después de que éste es cortado del exón precedente (Tanugi-Cholley *et al.*, 1995; Bruce *et al.*, 1996; Mathew y Van Holde, 1998; Patiño *et al.*, 1999; Avendaño y Patiño, 1999).

Los polimorfismos genéticos encontrados en los genes del sistema NADPH oxidasa podrían afectar sólo de manera parcial la expresión de proteínas que hacen parte de este sistema, lo cual podría explicar fenómenos de susceptibilidad a infecciones en ciertas circunstancias y no un fenotipo de EGC. Por tanto, es importante estudiar el efecto que puede tener la transición A→G en el procesamiento del mRNA en los individuos normales para la expresión de p67-phox. Con el fin de determinar los niveles de expresión de p67-phox en células mononucleares en individuos que poseían diferentes genotipos para la posición nucleotídica -21 del intrón 10 del gen *NCF-2*, y verificar si estos polimorfismos tenían algún efecto en la expresión de la proteína, se analizó su presencia por una inmunodetección con un anticuerpo específico de p67-phox. Para determinar la intensidad de las bandas obtenidas para p67-phox se hizo un análisis densitométrico en 40 individuos con diferentes genotipos: 19 A/A, 14 G/G y 7 A/G. Para cada una de las concentraciones de proteína utilizadas se compararon entre sí los datos obtenidos (A/A y G/G, A/A y A/G, G/G y A/G). Este trabajo contribuye a entender los mecanismos en la regulación de la expresión y función del sistema NADPH oxidasa; además, ayuda a esclarecer el papel que tienen los polimorfismos en genes relacionados con la respuesta microbicida sobre la capacidad de responder ante retos infecciosos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se tomaron 40 individuos (21 hombres y 19 mujeres) sanos, sin antecedentes de infecciones recurrentes, que habían sido caracterizados previamente para el genotipo presente en el nucleótido -21 del intrón 10 del gen *NCF-2*.

**Obtención de células mononucleares.** Se tomaron 7 ml de sangre periférica anticoagulada con

heparina y se depositaron en un tubo que contenía Lympho Separation Medium (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH). Después de centrifugar la muestra a 2.000 rpm/30 min/temperatura ambiente, se obtuvieron las células mononucleares. A estas células se les adicionaron 10 ml de PBS a pH 7.4, se centrifugaron por diez minutos a 2.000 rpm a temperatura ambiente, luego se resuspendieron en 1 ml de PBS para determinar viabilidad, pureza y número de células.

**Extracción de proteínas citosólicas.** Para la obtención de proteínas citosólicas totales se tomaron cinco millones de células mononucleares, a las que se les agregaron 50 ml de tampón de lisis (50 µM Hepes pH 7.2, 150 mM NaCl, 5 mM NaEDTA, 1 mM ortovanadato, 10 mM NPGB, 5% Triton X-100) con inhibidores de proteasas [Leupeptin (ICN) 100 Mg/ml, PMSF (ICN) 50 nM, Chymostatin (ICN) 10 ng/ml]. El lisado se centrifugó a 14.000 rpm/20 seg/temperatura ambiente para obtener el sobrenadante con las proteínas citosólicas totales. Luego se utilizó el estuche de Pierre BCA protein (PIERCE, Rockford, USA.), para cuantificar las proteínas por colorimetría a 562 nm, comparando la muestra con una muestra patrón de concentración conocida de proteína.

**Electroforesis y transferencia.** Después de determinar la concentración de proteínas (µg/ml) se tomó el volumen de muestra necesario para obtener 30, 20 y 10 µg de proteína total y se diluyó en el tampón de carga (1.14 g Tris base, 15 glicerol, 7.5 ml β-mercaptoetanol, 3.5 g SDS, 50 mg azul de bromofenol). Los tubos que contenían las diferentes diluciones se colocaron a ebullición por cinco minutos, luego las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) durante una hora a 24 mA, lo que separó las proteínas de acuerdo con su peso molecular. Después se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana PVDF, por 45 min a 0.25 mA.

**Inmunodetección de p67-phox.** Para lograr la inmunodetección de p67-phox la membrana de PVDF se incubó en leche descremada al 5% en tampón salino-tris (TBS) que contenía 0.1% de

Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en agitación continua por una hora. Luego se incubó, con agitación, durante una hora con un anticuerpo policlonal de cabra contra la región carboxi-terminal de la p67-phox (Santa Cruz Biotechnology), se lavó con TBS-Tween por tres veces durante cinco minutos cada lavado, en agitación. Luego la membrana se expuso durante una hora a un segundo anticuerpo de conejo contra IgG de cabra marcado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) en agitación y se lavó de igual manera que la anterior. Después de esto se procedió a revelar la reacción antígeno-anticuerpo incubando la membrana con una solución de Luminol (Santa Cruz Biotechnology) y luego exponiéndola a una película radiográfica (Kodak Eastman Kodak Company, Rochester, NY). En cada uno de los experimentos se incluyó al menos uno de los individuos con cada fenotipo (*A/A*, *A/G* y *G/G*).

Para determinar el nivel de expresión de p67-phox, la película fotográfica se sometió a densitometría usando un sistema analizador de imagen digital y utilizando el programa Alpha Imager TM (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, California, USA). Se determinó la intensidad de las

bandas específicas de p67-phox en cada una de las muestras analizadas. Luego, a los datos encontrados se les verificó la normalidad por medio de un test de Anova, con el programa Prisma. Después se procedió a hacer una *t* de Student para comparar entre grupos (*A/A* y *G/G*, *A/A* y *A/G*, *A/G* y *G/G*) para cada una de las concentraciones de muestra utilizada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo pretendimos determinar si la transición -21 *A-G* en el intrón 10 del gen *NCF-2* afectaba la expresión de la p67-phox, por lo que se comparó el patrón de bandas correspondiente a p67-phox revelada por inmunodetección con un anticuerpo específico de dicha proteína (figura 1). Se pasó luego a hacer un análisis densitométrico para determinar la intensidad de las bandas obtenidas (figura 2). Sin embargo, al analizar por densitometría el patrón de bandas entre los individuos que poseían los genotipos *A/A*, *G/G* y *A/G* y comparar entre sí para las diferentes cantidades de proteína (10, 20 y 30 mg), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

**Favor enviar la fig 1 como imagen en tiff, jpg o gif, además de enviar la muestra, la imagen del disco no se deja manipular**

**Figura 1.** Inmunodetección de la proteína p67-phox en individuos con los genotipos *A/A*, *G/G* y *A/G* en la posición -21 del intrón 10. Imagen representativa del patrón de bandas correspondiente a la proteína p67-phox detectada por inmunodetección en cinco individuos diferentes después de una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) con tres concentraciones diferentes de extracto citosólico. Puede apreciarse una banda adicional en uno de los individuos *G/G*, señalada con una flecha



**Figura 2.** Análisis densitométrico para la expresión de la proteína p67-phox en individuos *A/A*, *G/G* y *A/G* en la posición -21 del intrón 10 del gen *NCF-2*. Esta figura corresponde al análisis de los valores densitométricos obtenidos en todos los individuos para las tres concentraciones usadas y su comparación entre los tres grupos de individuos estudiados. Se observa un efecto de dosis en la intensidad de las bandas, pues a mayor concentración de proteínas los valores densitométricos obtenidos son mayores. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la expresión obtenida para los tres grupos de sujetos. IDV (valor integrado de densidad); [IDV =  $\sum$ (valores de cada píxel - background)]

Una posible explicación para estos resultados es que la sensibilidad del análisis de la proteína por medio de inmunodetección puede no ser suficiente para evidenciar diferencias en las condiciones en las que se realizó el estudio. Por tanto, con el fin de evidenciar posibles diferencias en la expresión de la p67-phox es necesario evaluar además aspectos funcionales de las células fagocíticas en condiciones diversas; por ejemplo, cuantificar la producción de especies reactivas de oxígeno durante la explosión respiratoria en respuesta a diferentes estímulos (Olarte *et al.*, 1997; Patiño P *et al.*, 1999). Para esto se podría evaluar producción de peróxido de hidrógeno utilizando citometría de flujo con sondas fluorescentes como la dihidrorodamina o cuantificar la producción de anión superóxido por medio de la reducción del citocromo C medida por espectrofotometría (Nisimoto *et al.*, 1999; Patiño *et al.*, 1999). De otro lado, las diferencias en la expresión génica en los individuos con los distintos genotipos se podrían evidenciar con el análisis de los niveles de las distintas especies de RNAm que se generan como consecuencia de la presencia del polimorfismo; sin embargo, de esta manera no se podría saber si esas posibles diferencias tendrían reper-

cusiones funcionales importantes para las células fagocíticas (Patiño *et al.*, 1999).

Además de lo anterior, podría tener ventaja realizar estos análisis de expresión con PMN en vez de células mononucleares. Esto se debe a que en las células mononucleares existen varias poblaciones, unas con actividad fagocítica y que expresan los componentes del sistema NADPH oxidasa (monocitos), y otras en las que estas proteínas no tienen expresión y la proporción entre estas poblaciones varía de un individuo a otro, lo cual introduce una variabilidad que hace difícil tener homogeneidad en los datos. Aunque con los PMN se tendría una población celular más homogénea, la presencia de una gran cantidad de proteasas en los lisosomas de estas células hace que desde el punto de vista experimental sea bastante difícil tener condiciones apropiadas para analizar la expresión proteica, lo que a su vez puede llevar también a una gran variabilidad en los resultados.

Además de analizar expresión de la proteína por medio de la inmunodetección por la técnica de Western blot, se podría emplear citometría de flujo utilizando anticuerpos marcados con fluorocromos, con la ventaja de que se podría hacer análisis diferencial del grupo de poblaciones celulares que puedan estar expresando la proteína p67-phox.

Como puede apreciarse en la figura 1, uno de los individuos con el fenotipo *G/G* presentó una banda adicional. Aunque este es un hallazgo interesante que podría indicar la expresión de una proteína de menor peso molecular por un transcrito con un marco de lectura abierto más corto, también podría ser consecuencia de la degradación de esta proteína durante el proceso de extracción; por tanto, sería importante corroborar este resultado en varios individuos con el genotipo *G/G*. Además, se deberían realizar experimentos utilizando no sólo anticuerpos contra la región carboxi-terminal de la p67-phox, sino contra otros sitios para evidenciar la posible existencia de formas truncadas de esta proteína.

## REFERENCIAS

- Avendaño CP, Patiño PJ.** 1999. La p67-phox como un elemento esencial del sistema NADPH oxidasa de las células fagocíticas. *Iatreia* 12:45-50.
- Bruce A, Bray D, Lewis J, Raff M, Keith R, Watson JD.** 1996. El núcleo celular. *En: Biología molecular de la célula.* Barcelona, Omega, pp. 359-424.
- Chanock SJ, El Bernal SJ, Smith RM, Babior BM.** 1994. The Respiratory Burst Oxidase. *J Biol Chem* 269:24.519-24.522.
- Curnutte JT.** 1993. Chronic granulomatous disease: the solving of a critical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol* 67:52-515.
- De Boer M, Hilariu-stokman PM, Hossle JO, Verhoeven AJ, Graf M, Kenney RT, Seger R, Roos D.** 1994. Autosomal recessive chronic granulomatous disease with absence of the 67-KD cytosolic NADPH oxidase component: identification of mutation and detection of carriers. *Blood* 83:531-536.
- Deleo FR, Quinn MT.** 1996. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukocyte Biol* 60:677-691.
- De Méndez I, Adams AG, Sokolic RA, Malech HL, Leto TL.** 1996. Multiple SH3 domains interactions regulate NADPH oxidase assembly in the whole cell. *EMBO J* 15:1.211-1.220.
- Gregory R, Hoffman, Cerione RA.** 2001. Rac inserts its way into the immune response. *Nature Immunology* 2:194-196.
- Grizot S, Fieschi F, Daghers MC, Pebay-Peyroula E.** 2001. The active N-terminal region of p67-phox. *J Biol Chem* 276:21.627-21.631.
- Kenney RT, Malech HL, Epstein ND, Roberts RL, Leto TL.** 1993. Characterization of the p67-phox gene: genomic organization and restriction fragment length polymorphism analysis for prenatal diagnosis in chronic granulomatous disease. *Blood* 82:3.739-3.744.
- Leto TL.** 1999. The respiratory burst oxidase. *En: Gallin JI, Snyderman R (eds.). Inflammation: principles and clinical correlates.* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 769-786.
- Leusen JHW, Meischl C, Eppink MHM, Hilarius PM, De Boer M, Weening RS, Ahlin A, Sanders L, Goldblatt D, Skopczynska H, Bernatowska E, Palmblad J, Verhoeven AJ, Van Berkel WJH, Roos D.** 1999. Four novel mutations in the gene encoding gp91-phox of human NADPH oxidase: consequences for oxidase assembly. *Blood* 95:666-672.
- Mathew SC, Van Holde KE.** 1998. Los genes eucariotas y su expresión. *En: Bioquímica.* España, McGraw-Hill Interamericana, pp. 1.188-1.191.
- Nisimoto Y, Motalebi S, Han Ch, Lambeth D.** 1999. The p67-phox activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b558. *J Biol Chem* 274:22.999-23.005.
- Olarte DG, Patiño P, Salgado H, López JA, Montoya CJ, Pérez JE.** 1997. Evaluación del paciente con inmunodeficiencia. Síndrome de la infección recurrente patológica. *Medicina & Laboratorio* 7:545-575.
- Patiño PJ, Rae J, Noack D, Erickson R, Ding J, García de OD, Curnutte JT.** 1999. Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the NADPH oxidase component p67-phox. *Blood* 94:2.505-2.514.
- Ross D, De Boer M, Suribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW.** 1996. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 87:1.663-1.681.
- Roos D, Curnutte JT.** 1999. Chronic granulomatous disease. *En: Ochs Hand D, Smith E, Puk J (eds.). Primary immunodeficiency diseases, a molecular and genetic approach.* New York, Oxford University Press, Inc, pp. 353-374.
- Tanugi-cholley LC, Issartel JP, Lunardi J, Freycon F, Morel F, Vignais PV.** 1995. A mutation located at 5' splice junction sequence of intron 3 in the p67-phox mRNA in a patient with chronic granulomatous disease. *Blood* 85:242-249.
- Wilson L, Butcher C, Finan P, Kellie S.** 1997. SH3 domain-mediated interactions involving the phox components of the NADPH oxidase. *Inflammation Res* 46:268-270.