

02 Análisis molecular de la proteína P67PHOX del sistema NADPH oxidasa utilizando el sistema COX-PHOX

Andrés A. Arias¹, Mary C. Dinauer², Juan D. Matute¹,
Jiabín Ding³, Pablo J. Patiño¹

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

El sistema NADPH oxidasa de las células fagocíticas tiene un papel central para la función antimicrobiana de dichas células. La activación de este sistema está presidida por la translocación de las proteínas citosólicas p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox} hacia la membrana para ponerse en contacto con el flavocitocromo b558, induciendo de esta manera la generación de anión superóxido, un precursor de agentes microbicidas oxidantes. En el presente trabajo presentamos una aproximación al estudio molecular del sistema NADPH oxidasa basados en los hallazgos de mutaciones en el gen de la p67^{phox} de pacientes con EGC y algunos posibles polimorfismos encontrados en individuos sanos.

PALABRAS CLAVE

NADPH OXIDASA
P67PHOX
CÉLULAS COX-PHOX

METODOLOGÍA

Se generaron mutaciones en el cDNA de p67^{phox} mediante mutagénesis sitio dirigida y se expresaron en un sistema de células COS^{phox}. En las células transfectadas se analizó la actividad del sistema NADPH oxidasa mediante las metodologías de cinética de anión superóxido y reducción del NBT, además se determinó la expresión de las proteínas por Western blot.

RESULTADOS

Los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que los residuos Lys19, Lys20 y Asp21 del extremo N-terminal de la p67^{phox}

son indispensables para la activación del sistema oxidasa y que la presencia del extremo C-terminal de esta proteína (residuos 398-526) no es necesaria para la generación de O₂⁻ por el sistema NADPH oxidasa. Por otro lado, los cambios Val₁₆₆[®] Ile, Pro₃₂₉[®] Ser y His₃₈₉[®] Gln pertenecientes a polimorfismos de individuos normales no produjeron alteraciones en el funcionamiento de la p67^{phox}; por lo tanto, estos no implican ningún riesgo genético de producir deficiencias en la activación del sistema NADPH oxidasa.

CONCLUSIONES

En conclusión, en el presente trabajo se determinó el efecto que tienen algunas mutaciones y polimorfismos en el gen de la p67^{phox} sobre la función del sistema NADPH oxidasa empleando un sistema celular transgénico fundamentado en células COS-7. El modelo celular COS^{phox} representa un nuevo sistema de células completas, fácilmente transfectable que sirve para estudiar la función del sistema NADPH oxidasa de las células fagocíticas. Finalmente los hallazgos con las mutantes de la p67^{phox} nos permiten avanzar en el conocimiento sobre los mecanismos moleculares involucrados en la interacción de los componentes citosólicos del sistema NADPH oxidasa.

BIBLIOGRAFÍA

1. WINKELSTEIN JA, MARINO MC, JOHNSTON RB JR, BOYLE J, CURNUTTE J, GALLIN JI, et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79:155-169.
2. KOGA H, TERASAWA H, NUNOI H, TAKESHIGE K, INAGAKI F, SUMIMOTO H. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1999; 274: 25.051-25.060.
3. PRICE MO, ATKINSON SJ, KNAUS UG, DINAUER MC. Rac activation induces NADPH oxidase activity in transgenic COS^{phox} cells, and the level of superoxide production is exchange factor-dependent. *J Biol Chem* 2002; 277: 19.220-19.228.

.....
1 Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Corporación Biogénesis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
2 Pediatric Department, Herman B Wells Center for Pediatric Research, Indiana University School of Medicine, Indianapolis
3 Department of Immunology, Genentech Inc, South San Francisco. Email: aarias@catlos.udea.edu.co