

---

# Caracterización molecular en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica por deficiencia en p47 phox

JUAN A. LÓPEZ, PABLO J. PATIÑO,  
DIANA GARCÍA DE OLARTE

El sistema NADPH oxidasa es un complejo enzimático transportador de electrones localizado en la membrana de las células fagocíticas. De este sistema hacen parte varias proteínas; un flavocitocromo b<sub>558</sub>, el cual está conformado por una cadena b (gp91-*phox*) y una cadena a (p22-*phox*) y por al menos 3 proteínas citosólicas (p47-*phox*, p67-*phox*, p40-*phox*). Una alteración genética en cualquiera de estas proteínas causa el síndrome de Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC). La caracterización de las mutaciones de los pacientes con EGC ha sido fundamental para dilucidar la estructura y función de los componentes del sistema NADPH oxidasa. En el caso de la p47-*phox*, se han obtenido hallazgos importantes que la hacen un modelo interesante para estudiar el mecanismo molecular involucrado en regular la expresión y función bioquímica de este sistema. En los pacientes con defecto en la p47-*phox* investigados hasta ahora, se ha hallado una delección del dinucleótido GT al comienzo del exón 2, siendo la mayoría de ellos homocigóticos para esta delección, la cual posiblemente se debe a eventos de recombinación entre el gen p47-*phox* normal y un seudogen recientemente descrito. En el diagnóstico de pacientes no homocigóticos, cualquier mutación encontrada en el análisis del DNA (gDNA o cDNA) puede repre-

sentar un cambio sufrido por el seudogen. Por lo tanto, para la identificación precisa del defecto genético es necesario separar el gen normal del seudogen y analizar las secuencias en forma individual. Los pacientes no homocigóticos posiblemente deben tener una segunda mutación en el alelo tipo silvestre diferente a la delección GT. De otro lado, a través de mutagénesis sitio-dirigida se pueden modificar algunos de los aminoácidos o dominios de la p47-*phox*, los cuales pueden ser esenciales para su funcionamiento y su relación con la EGC. Con esta metodología, es posible introducir cambios en un gen cuya secuencia es totalmente conocida, el cual es amplificado; las mutantes así generadas pueden dar información acerca de la estructura y función de los genes analizados, observando su efecto sobre la función. De esta manera se puede determinar lo importante que puede ser un cambio estructural en la función de esta proteína.

---

BIÓLOGO JUAN A. LÓPEZ, Estudiante de Maestría, Ciencias Básicas Biomédicas, Grupo Inmunodeficiencias Primarias; DOCTOR PABLO J. PATIÑO, Profesor, Grupo Inmunodeficiencias Primarias; DOCTORA DIANA GARCÍA DE OLARTE, Directora, Grupo Inmunodeficiencias Primarias; todos de la Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

**PALABRAS CLAVE**  
**ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA**  
**p47 phox**  
**NADPH OXIDASA**  
**SEUDOGEN**  
**MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA**

La función y la regulación de la expresión del sistema oxidasa en las células fagocíticas juegan un papel fundamental en la defensa innata del huésped contra la infección y al mismo tiempo son responsables, al menos en parte, del daño tisular que tiene lugar durante muchas condiciones inflamatorias.

En la función microbicida de los neutrófilos es fundamental el fenómeno conocido como explosión respiratoria que tiene como finalidad la generación de metabolitos intermediarios del oxígeno, que intervienen en la destrucción de los microorganismos fagocitados. Cuando los fagocitos son activados por diversos estímulos se presenta un incremento en su consumo de glucosa a través de la vía de la hexosa monofosfato; cada molécula de glucosa así metabolizada reduce dos moléculas de NADP a NADPH (1). A su vez el NADPH transfiere electrones al  $O_2$  contenido en la vacuola fagocítica, generando el anión superóxido ( $O_2^-$ ). Mientras el superóxido es el mayor producto de la NADPH oxidasa, se cree que no es el principal agente microbicida derivado del oxígeno. Este  $O_2^-$ , según las condiciones de pH en que se encuentre, puede sufrir una dismutación espontánea y formar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o puede ser dismutado en una reacción catalizada por la superóxido dismutasa. El peróxido de hidrógeno es luego convertido en ácido hipocloroso (HClO) en presencia de cloro por la mieloperoxidasa. Existe evidencia de que la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el  $O_2$  en presencia de metales de transición como el Fe y el Cu genera radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). El peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso y el radical hidroxilo son fuertes agentes microbicidas empleados normalmente para destruir los microorganismos; sin embargo, un exceso o la producción exagerada o

una inapropiada liberación de estas moléculas contribuye al daño tisular (2).

El sistema NADPH oxidasa tiene un papel fundamental en la defensa innata del huésped contra la infección y al mismo tiempo está involucrado en el daño tisular que ocurre en muchas condiciones inflamatorias. El conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la expresión y función de este sistema es de gran utilidad para el estudio de las células fagocíticas. El sistema NADPH oxidasa se encuentra localizado en la membrana plasmática y de los gránulos específicos de los PMN. El componente más importante es el citocromo  $b_{558}$ , una proteína integral de membrana que tiene un bajo potencial redox, lo que le permite ceder electrones al oxígeno molecular. Es un heterodímero compuesto de dos subunidades, una glicoproteína de 91 kDa (*gp91-phox*) y una proteína de 22 kDa (*p22-phox*) (3,4). Tres proteínas citosólicas, *p47-phox*, *p67-phox* y *p40-phox*, son esenciales para la activación de este complejo enzimático (5,6). Además, en la activación y función de la NADPH oxidasa son necesarias las llamadas proteínas pequeñas unidoras del GTP: *rap1A* (asocia con  $b_{558}$  en la membrana de los fagocitos) y las *rac 1* y *2* (Factor de comienzo de la traslocación) (7). En estado de reposo las proteínas se encuentran separadas, pero se ha propuesto que cuando se presenta un estímulo se origina una traslocación de las proteínas citosólicas hacia la membrana, permitiendo el ensamblaje de la actividad enzimática de la oxidasa (7).

Una alteración genética en *gp91-phox*, *p22-phox*, *p47-phox* o *p67-phox* que implique una falla en la expresión y/o función de este sistema transportador de electrones, se asocia con el síndrome de EGC. Éste se caracteriza por un defecto en la explosión respiratoria de los neutrófilos; como resultado de ello se produce una incapacidad para destruir gérmenes, especialmente catalasa + (8). En la mayoría de los pacientes, el diagnóstico se puede realizar antes de los dos años: Se presentan infecciones graves a repetición que pueden involucrar úlceras crónicas, ganglios linfáticos que drenan y neumonía; otros órganos que pueden verse afec-

tados son hígado, huesos y riñones. Los microorganismos más comúnmente aislados de pacientes con EGC incluyen bacterias, particularmente *Staphylococcus aureus* y bacilos gram-negativos, especies de *Nocardia*, hongos como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Torulopsis glabrata* y *Pseudallescheria boydii* (8).

La forma más común de EGC es causada por un defecto en *gp91-phox*; tiene un patrón hereditario ligado al cromosoma X y sus mutaciones se asocian con el 60-65% de los casos de EGC (CGD-X), mientras que las formas autosómicas recesivas son: Alteración de la proteína *p22-phox* encontrada en el 5-7% de los casos, mutaciones en el gen que codifica la *p47-phox*, que corresponden a 25-30% de casos y defectos en el gen de la *p67-phox*, correspondientes al 5% (4). Como se puede observar, la deficiencia de *p47-phox* es 5 a 6 veces más común que las otras formas-autosómicas. Además es significativo que más del 90% de los pacientes que llevan la mutación proceden de poblaciones no relacionadas (9). Por otra parte, en esta proteína se han obtenido hallazgos importantes que la hacen un modelo atractivo para estudiar el mecanismo molecular involucrado en la regulación de la expresión y función bioquímica de la NADPH oxidasa.

El gen *p47-phox* se localiza en el cromosoma 7 q11.23, alcanza cerca de 18 Kb, contiene 11 exones, 390 amino ácidos, produce una proteína de 44.6 KDa, con 6 a 9 posibles sitios de fosforilación en la región carboxilo terminal (5). Aunque la función de la *p47-phox* no se ha dilucidado completamente, se acepta que su traslocación a la membrana es esencial para activar la NADPH oxidasa; sin embargo, se ha planteado una controversia acerca de la necesidad de la fosforilación de esta proteína para activar el sistema oxidasa. Park y Ahn (10) sostienen que la traslocación de *p47-phox* es un paso esencial para la activación, sin que se requiera la fosforilación, lo cual fue analizado en un sistema libre de células. De otro lado La Rosa y col. (11) demuestran que el blanco de fosforilación es un grupo de serinas en la región carboxilo terminal del polipéptido, lo que los lleva a sugerir que la

fosforilación de esta proteína es un paso esencial en el mecanismo de activación del sistema oxidasa en células totales. Para determinar si la fosforilación de *p47-phox* era necesaria para la activación del sistema oxidasa se hizo un ensayo de mutagénesis sitio-dirigida (11). Este estudio demostró que células transfectadas con la mutación no sufrieron fosforilación en comparación con células tipo silvestre; además encontraron que no hubo traslocación a la membrana de *p47-phox* después de la activación, lo cual se asoció con una disminución en la función oxidasa. Esto llevó a la conclusión que la fosforilación de estas serinas es importante para la activación del sistema oxidasa en células totales:

En contraste con la gran variedad de mutaciones encontradas en las demás formas de EGC, en la asociada con defecto de la *p47-phox*, se han descrito pocas mutaciones. En 1991 Chanock y col. (12) informaron sobre 4 mutaciones diferentes en 15 pacientes en el gen que codifica la *p47-phox*. De los 15 pacientes examinados, 11 resultaron ser homocigóticos para la delección del dinucleótido GT al comienzo del exón 2; además 4 pacientes resultaron ser heterocigóticos para la delección GT en combinación con una mutación puntual: A179-G que predice un cambio de treonina por alanina; un cambio de A425-G que predice una sustitución de lisina por glutamato y una delección G502 que predice un cambio en el marco de lectura produciendo un codón de paro prematuro en la traducción de la proteína. Un estudio realizado por Roesler y col. (13), con el fin de analizar al nivel molecular los pacientes deficientes en *p47-phox*, encontró que 25 de 29 pacientes eran homocigóticos para la delección GT en el extremo 5' del exón 2. En otro reporte, Ross y col. (4) al analizar el cDNA de 22 pacientes con defecto en *p47-phox*, demostraron en todos los casos la delección GT.

Una explicación para este fenómeno ha sido propuesta recientemente por Roesler y col. (13). Al estudiar los pacientes con defecto de la *p47-phox*, se evidenció que los individuos controles siempre presentaban algo inesperado, no descrito previamente, que consistía en la presencia de una doble

secuencia a partir del dinucleótido GT comprometido en la deleción a nivel del exón 2; es decir una secuencia normal y otra igual a la encontrada en los pacientes homocigóticos. Para caracterizar el fenómeno se hicieron estudios de clonación del gen *p47-phox*, análisis de restricción y secuenciamiento del DNA, en los cuales se encontró que todos los individuos normales contenían la secuencia esperada (GTGT), pero además contenían una secuencia con la deleción GT. Esto llevó a proponer la existencia de un pseudogen para la *p47-phox*.

Los pseudogenes son genes no funcionales, originados por una duplicación de un gen, cuya copia se torna no funcional por mutaciones sufridas en su secuencia (14). El gen *p47-phox* y el pseudogen han sido localizados en la misma banda cromosómica que corresponde a 7 q 11.23. Esta banda del cromosoma 7 es un gran bloque de segmentos de DNA no únicos duplicados (esto ha sido detectado gracias a la sobre expresión en YACS) (13). El pseudogen es altamente homólogo y probablemente emergió de una duplicación reciente del gen normal *p47-phox*. Una vez el gen se duplicó, uno de los dos genes sufrió una deleción del dinucleótido GT debido, posiblemente, a la característica palindrómica de esta región TGTACA, generando una copia anormal. Con el fin de demostrar que la mutación GT sólo se encuentra en humanos, Roesler y col. (13) analizaron esta misma secuencia en especies cercanas al hombre, mono Rhesus y chimpancé. Para ello se obtuvieron clonas a partir de genotecas diferentes de DNA (gDNA y cDNA) y se realizó un análisis con enzimas de restricción de las secuencias amplificadas. Encontraron que ambas especies animales sólo evidenciaban la secuencia correspondiente al gen normal del humano (GTGT en el exon 2). Este hecho confirma la hipótesis de que la secuencia con la deleción GT corresponde a un pseudogen propio de los seres humanos.

La homología entre ambas secuencias es del orden de 97.5%; por esto es probable que tengan lugar eventos tempranos de recombinación como son la conversión génica o el entrecruzamiento dentro

del mismo alelo entre el gen y el pseudogen como posible fuente de la mutación (13). El entrecruzamiento lleva a un intercambio recíproco de DNA y la conversión génica a un intercambio no recíproco del DNA. Es de destacar que la conversión génica entre genes homólogos y sus pseudogenes ha sido descrita en la patogénesis de varios desórdenes genéticos como son la Hiperplasia Adrenal Congénita, la enfermedad de Von Willebrand y la enfermedad de Gaucher. El grado de conversión génica depende del grado de similitud entre las dos secuencias, es decir, a mayor similitud mayor conversión génica, lo cual explicaría la alta frecuencia del defecto de la *p47 phox*. Tales eventos podrían crear portadores, que luego pueden pasar a los descendientes, algo que también podría ser una explicación para el alto número de portadores en la población; no se concluye tampoco cuál de los eventos de recombinación está más fuertemente implicado, debido a que ambos pueden crear homocigotes (13). Sin embargo, hay quienes sostienen que estos hallazgos no corresponden a un pseudogen sino a un artefacto generado durante la amplificación por medio de PCR a partir de las clonas que contienen la secuencia GTGT (13)

La caracterización de las mutaciones de los pacientes con EGC ayudará a dilucidar la estructura y función de los componentes de la NADPH oxidasa. En el caso de la *p47-phox*, esto es cierto debido a que no todos los pacientes son homocigóticos para la deleción GT. Estos presentan dos secuencias: Una que corresponde a la de los pacientes homocigóticos y otra que corresponde a una secuencia normal GTGT, en la que necesariamente se encuentra una mutación diferente de la deleción GT. Por lo tanto, para un reconocimiento preciso de la alteración genética se necesita separar el gen normal del pseudogen y estudiar estas secuencias de manera individual, lo cual permitirá identificar la mutación o mutaciones involucradas en el defecto. Para lograrlo se puede aprovechar la capacidad que tiene la enzima de restricción Dra III para cortar específicamente el cDNA correspondiente a la secuencia GTGT en el exón 2. Una vez digeridos, los

fragmentos amplificados se separan de acuerdo a su tamaño mediante electroforesis. Los fragmentos ya purificados se someten a una reacción de secuenciación con el fin de determinar la o las mutaciones existentes en el alelo con la secuencia GTGT.

Por otra parte, a través de la mutagénesis sitio-dirigida se puede modificar *in vitro* la proteína p47-phox con el fin de determinar algunos de los aminoácidos o dominios esenciales para su funcionamiento y su relación con la EGC. Con este método se puede modificar la secuencia en el DNA y las mutantes así generadas pueden dar información acerca de la estructura y función de los genes analizados, observando el efecto del cambio en la función génica.

Para confirmar si las mutaciones de p47-phox descritas en pacientes no homocigóticos si son la causa de esta manifestación fenotípica, se pueden realizar estos cambios en la secuencia de este gen; así las proteínas mutantes se pueden analizar mediante su capacidad de inducir la generación de anión superóxido en un sistema libre de células, lo cual compara las proteínas tipo silvestre y las modificadas, en cuanto a capacidad para producir radicales de oxígeno. De esta manera se determina lo importante que puede ser una mutación dada para la función de esta proteína.

## SUMMARY

### MOLECULAR CHARACTERIZATION IN PATIENTS WITH CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE DUE TO p47phox DEFICIENCY

NADPH oxidase system is an enzymatic electron transport complex localized in the membrane of phagocytic cells. Several proteins belong to this system: A flavocytochrome  $b_{558}$ , formed by a b chain (gp91-phox) and an a chain (p22-phox) and, at least, 3 cytosolic proteins (p47-phox, p67-phox and p40 phox). Genetic alteration in any of these proteins causes the syndrome of Chronic Granulomatous Disease (CGD). Characterization of mutations in patients with CGD has been fundamental to elucidate the structure and function of NADPH

oxidase system components. Several findings make p47-phox an interesting model to study the molecular mechanism involved in regulating the expression and biochemical function of this system. So far, in patients with p47-phox defect a deletion of dinucleotide GT has been found at the beginning of exon 2; most of them are homocytotic for this deletion which is probably due to recombinant events between normal p47-phox gen and a recently described pseudogen. Any mutation found when diagnosing non-homocytotic patients (gDNA or cDNA) may represent a pseudogen change. Therefore, for precise identification of the genetic defect it is necessary to separate the normal gen from the pseudogen and to analyze individual sequences. Non-homocytotic patients possibly have a second mutation in the wild type allele different from GT deletion. On the other hand, through site-oriented mutagenesis it is possible to modify some of the aminoacids or domains of p47-phox, which may be essential for its function and relationship with CGD. With this methodology it is possible to introduce changes in a gen whose sequence is thoroughly known and which is amplified; mutants so generated can give information concerning the structure and function of the analyzed genes, observing their effect on function. In this way the importance of a structural change on the function of a protein can be determined.

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. SEGAL AW, ABO A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biol Sci* 1993; 18: 43-47.
2. CURNUTTE JT. Disorders of granulocyte function and granulopoiesis. In : Hematology of infancy and childhood, 4<sup>th</sup> Edition. NATHAN DG, OSKI FA, eds. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992; 1: 904-977.
3. SMITH RM, CURNUTTE JT. Molecular Basis of Chronic Granulomatous Disease. *Blood* 1991; 77: 673-686.
4. ROOS D, De BOER M, KURIBAYASHI F, et al. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 1996; 87: 1663 - 1681.
5. FRANCKE SJ, HSIEH CL, FOELLMAER BE, et al. Genes for two autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease assigned to 1q25 (NCF2) and 7q11.23(NCF 1). *Am J Human Genet* 1990; 47: 483-492.

6. ZHAN S, VÁSQUEZ N, ZHAN SHILI, et al. Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p 40-*phox*, a new component of the Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase Complex. *Blood* 1996; 88: 2714-2721
  7. DINAUER MC. The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1993; 30: 329-369.
  8. CURNUTTE JT. Chronic granulomatous disease: The solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 76: S2-S15.
  9. CASIMIR CM, BU-GHANIM HN, RODAWAY ARF, et al. Autosomic recessive chronic granulomatous disease caused by deletion at a dinucleotide repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2753-2757.
  10. PARK JW, AHN SM. Traslocation of recombinant p47 *phox* cytosolic component of the phagocyte oxidase by *in vitro* phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 410-416.
  11. LA ROSA PF, EI BENNA J, BABIOR BM, CHANOCK J. The phosphorylation targets of p47 *phox*, a subunit of the respiratory burst oxidase. *J Clin Invest* 1995; 96: 1499-1505.
  12. CHANOCK SJ, BARRET DM, CURNUTTE JT, ORKIN SH. Gene structure of the cytosolic component, *phox-47* and mutations in autosomal recessive chronic granulomatous disease (Abstract). *Blood* 1991; 78 (Suppl 1):165a.
  13. ROESLER J, GÖERLACH A, RAE J, et al. The p47 *phox* has a pseudogene carrying the most common mutation for p47 *phox* deficient chronic granulomatous disease (Abstract). *Blood*: 1995; 86 (Supp 1): 206a, 1995.
  14. SOLARI AJ, Genética humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina. Buenos Aires: Panamericana, 1966: p 259.
-

