

TEMAS DE ACTUALIZACIÓN

Facultad de Estomatología
Centro de Investigaciones Biomédicas

NADPH-OXIDASA FAGOCÍTICA: COMPONENTES, ENSAMBLAJE Y MECANISMO DE ACCIÓN

Dra. Bárbara Elena García Triana, Dr. Alberto Saldaña Bernabeu, Dr. José Carlos García Piñeiro y Dra. Maribel Bastarrechea Milián

RESUMEN

La actividad de la NADPH-oxidasa fagocítica constituye una de las fuentes endógenas más importantes de especies reactivas del oxígeno en el organismo. Este sistema enzimático está constituido por varias proteínas: flavocitocromo b, Rap1 A, p47-phox, p67-phox, p40-phox y Rac2, las cuales se encuentran distribuidas en diferentes compartimentos celulares cuando el leucocito está en reposo. Durante la activación leucocitaria, los diferentes componentes son translocados hacia la membrana plasmática donde experimentan un proceso de ensamblaje que conforma el sistema enzimático activo. Se analizaron las características de los diferentes componentes del sistema enzimático, las etapas e interacciones que permiten el ensamblaje y el mecanismo de acción enzimático. La profundización en estos aspectos ayudará a comprender las alteraciones que se producen en las enfermedades causadas por déficit o exceso de funcionamiento del sistema.

Descriptores DeCS: ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO; NADPH OXIDASA; NEUTRÓFILOS; PÉPTIDO HIDROLASAS; MECANISMOS DE DEFENSA.

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) humanos, son movilizados a los sitios de inflamación donde destruyen a los agentes invasores a través de la liberación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y enzimas proteolíticas.¹ Un defecto en la función de estas células constituye una grave amenaza para la vida. Tal es el caso de la enfermedad granulomatosa crónica, en la que los PMN no pueden producir ERO y

las personas afectadas padecen infecciones graves.² Sin embargo, las ERO liberadas por los PMN pueden también provocar daño a los tejidos vecinos como se ha descrito en varias enfermedades.

Los PMN adquieren la capacidad de producir ERO cuando experimentan la activación, caracterizada por un aumento del consumo de oxígeno (O₂) no asociado al transporte electrónico mitocondrial, proceso

denominado “*estallido respiratorio*”, por la acción del sistema NADPH-oxidasa cuya afectación produce la EGC.

La NADPH-oxidasa cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O_2 con la formación de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$).¹ El $O_2^{\cdot-}$ es rápidamente convertido en peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso. Estos, junto a los derivados reactivos del nitrógeno y al contenido de los gránulos constituyen el mecanismo fundamental de defensa de los PMN.^{1,2}

La NADPH-oxidasa está formada por varias proteínas que se encuentran distribuidas entre el citoplasma y la membrana plasmática cuando la célula está inactiva. En su mayoría, los componentes tienen que ser translocados desde el citosol a la membrana plasmática donde ocurre el ensamblaje del complejo funcional.¹

I. COMPONENTES DEL SISTEMA NADPH-OXIDASA

1. *Flavocitocromo b (flavocitocromo b558)*: Es un heterodímero que se localiza en la membrana de los gránulos específicos ($\approx 90\%$) y la membrana plasmática ($\approx 10\%$) cuando el PMN está en reposo. Después de la activación, el flavocitocromo b es transferido desde la membrana de los gránulos específicos hacia la membrana plasmática o la de los fagosomas.¹ Está compuesto por 2 subunidades diferentes: una glicoproteína de 91 kDa (gp91-phox) y otra proteína no glicosilada de 22 kDa (p22-phox). Es una flavoproteína que contiene 2 grupos hemo.^{1,3} Se cree que la subunidad gp91-phox posee los sitios de unión para el FAD y el NADPH.⁴ El flavocitocromo b se considera el componente central de la NADPH-oxidasa, pues contiene todos los elementos que le permiten

transportar los electrones¹ desde el NADPH hasta el O_2 .

2. *Rap1A*: Es una proteína de la superfamilia Ras de proteínas de unión al GTP. Se asocia estrechamente con el flavocitocromo b en la activación. Puede activar a la proteína quinasa C y participar así en la regulación del complejo.¹

3. *p47-phox*: Se localiza en el citosol en forma libre y en un complejo de 240 kDa con otros 2 componentes: p67-phox y p40-phox. Parece ser el primer componente citosólico que interactúa con el flavocitocromo b durante el ensamblaje. Posee una región catiónica con múltiples sitios de fosforilación de serín/treonín quinasa lo que se ha relacionado con su función reguladora. La fosforilación puede alterar la conformación o neutralizar la región catiónica de la proteína, y facilitar el ensamblaje.⁵ La desfosforilación inactiva al complejo.¹

4. *p67-phox*: Sólo se encuentra en el citosol unido al complejo de 240 kDa cuando el leucocito está en reposo. Comparte la unión al NADPH con gp91-phox.¹

5. *p40-phox*: Es el tercer componente del complejo citosólico.¹ Se ha reportado de forma reiterada que puede regular negativamente la actividad del complejo⁶ y se ha demostrado que en la activación sufre varias fosforilaciones que pudieran explicar dicha acción.⁷

6. *Rac2*: Es una proteína de unión al GTP que se encuentra en el citosol durante el reposo, unida a un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (Rho-GDI). Con la activación intercambia GDP por GTP, se disocia del factor y es translocada a la membrana plasmática simultánea e independientemente del complejo de 240 kDa.¹ Es esencial para la activación del sistema y se cree que está conectada a las vías de señalización tempranas. Desempeña además un importante papel en la quimiotaxis.⁸

II. ENSAMBLAJE DEL SISTEMA NADPH-OXIDASA

Tanto en el reposo como durante el ensamblaje se establecen interacciones entre diferentes componentes del sistema (fig.). En esto desempeñan un importante papel las interacciones por dominios SH3. Estas son regiones homólogas a las regiones no catalíticas de la familia Src de tirosín-quinasas, que tienen afinidad por los residuos de prolina. Como en varios componentes del sistema existen tantos dominios SH3 como regiones ricas en prolina, esto facilita las interacciones entre las proteínas del complejo citosólico en el reposo y entre estas y el flavocitocromo b en la activación. En p47-phox existe la posibilidad de establecer este tipo de interacciones de forma intracatenaria en el reposo, lo que provoca el secuestro de la región catiónica de esta proteína. En la activación esta interacción se rompe y permite su unión a las regiones ricas en prolina de p22-phox en la membrana.¹ Como las interacciones SH3 son poco específicas, se cree que su función sea alinear a las proteínas para el establecimiento de interacciones no SH3 de

mayor especificidad. Estas últimas han sido identificadas tanto entre los componentes citosólicos como entre estos y el flavocitocromo b. Entre ellas se destacan 3 posibles interacciones entre gp91- y p47-phox. Se supone que uno de estos sitios en gp91-phox interactúa con la región catiónica de p47-phox cuando esta se encuentra altamente fosforilada.¹

Basados en las diferentes interacciones identificadas entre los componentes del sistema multienzimático, *DeLeo* y *Quinn*¹ han elaborado un modelo que explica la forma y la secuencia en que se produce el ensamblaje. Este modelo, unido a los resultados de investigaciones recientes, plantea de forma resumida:

1. En el reposo, el complejo citosólico se mantiene estabilizado a través de diferentes interacciones incluidas las SH3. La región catiónica de p47-phox está secuestrada, lo que impide su interacción con p22-phox en la membrana.
2. En la activación, p47-phox es fosforilada y pierde la unión intracatenaria por dominio SH3. Esto expone los dominios

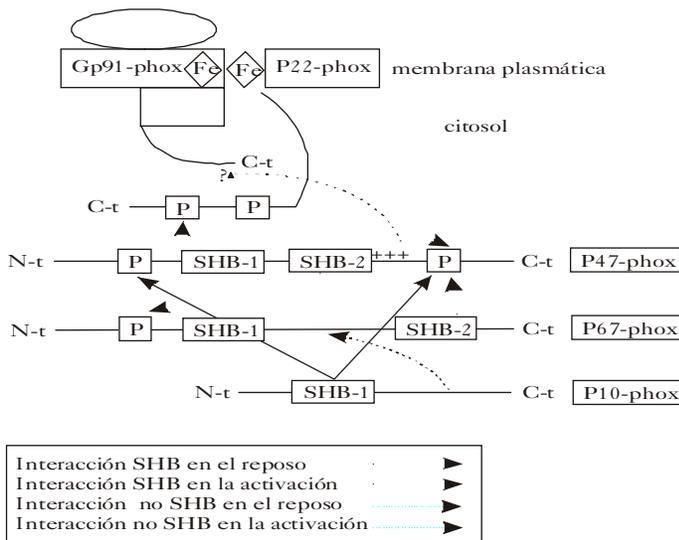
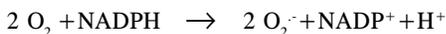


Fig. Interacciones proteína-proteína entre los componentes del sistema NADPH-oxidasa cuando el leucocito está en reposo y en la activación. Modificado de: *J Leukocyte Biol* 1996;60:677-91.

SH3 y la región catiónica, lo que facilita su interacción con p67-phox inicialmente. Después el complejo es translocado a la membrana y alineado a través de la interacción SH3 entre p47-phox y las regiones ricas en prolina de p22-phox.⁹ En este momento la región catiónica de p47-phox se libera de su unión a p67-phox y establece un enlace de alta afinidad con el flavocitocromo b, lo que puede deberse a una mayor fosforilación de p47-phox o la acción de Rac.¹

III. MECANISMO DE ACCIÓN

La NADPH-oxidasa cataliza la reacción:



Durante la transferencia de electrones, estos pasan desde el NADPH hacia el FAD, de este a los grupos hemo y de estos al O_2 .¹⁰ La liberación de protones H^+ hacia el lado citosólico produce una rápida despolarización de la membrana y una acidificación del medio intracelular. Estos cambios son compensados por la existencia de un canal de protones en la propia estructura del sistema enzimático que permite el escape de estos hacia el lado extracelular. La proteína que funciona como canal es gp91. Se sugiere que el mecanismo de flujo de protones a través de gp91-phox puede involucrar un ciclo de protonación/desprotonación de la His-115 en la medida en que esta es expuesta alternativamente hacia el lado interior y exterior de la membrana.³

La profundización en los mecanismos catalíticos y de ensamblaje de este sistema enzimático, ayudará a comprender las enfermedades causadas por déficit o exceso en su funcionamiento.

SUMMARY

The activity of the phagocyte NADPH-oxidase is one of the most important endogenous sources of reactive oxygen species in the body. This enzymatic system is made up of several proteins such as flavocytochrome b, Rap1 A, p47-phox, p40-phox and Rac2 which are distributed into different cell compartments when the leukocyte is at rest. During leukocyte activation, the various components are translocated to the plasmic membrane where they undergo a process of assembly to build an active enzymatic system. The characteristics of the various components of this system, the phases and interactions leading to the assembly and the enzymatic mechanism of action were analyzed. Deepening into these aspects will help us to understand the disorders in diseases caused by an under-functioning or over functioning of the system.

Subject headings: REACTIVE OXYGEN SPECIES; NADPH OXIDASE; NEUTROPHILS; PEPTIDE HYDROLASES; DEFENSE MECHANISMS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DeLeo FR, Quinn MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukocyte Biol* 1996;60:677-91.
2. Casado JA, Merino J, Cid J, Subirá ML, Sánchez-Ibarrola A. Oxidantes y radicales libres en la Biomedicina. *Rev Med Univ Navarra* 1996;34:165-74.
3. Henderson LM. Role of histidines identified by mutagenesis in the NADPH oxidase-associated H^+ channel. *J Biol Chem* 1998;273:33216-23.
4. Jendrossek V, Ritzel A, Neubauer B, Heyden S, Gahr M. An in-frame triplet deletion within the gp91-phox gene in an adult X-linked CGD patient with residual NADPH-oxidase activity. *Eur J Haematol* 1997;58:78-85.

5. Faust LP, El Benna J, Babior BM, Chanock SJ. The phosphorylation targets of p47-phox subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest* 1995;96:1499-1505.
6. Sathyamoorthy M, Mendez I de, Adams AG, Leto TL. p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* 1997;272:9141-6.
7. Bouin AP, Grandvaux N, Vignais V, Fuchs A. p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem* 1998;273:30097-103.
8. Tardif M, Rabiet MJ, Christophe T, Milcent MD, Boulay F. Isolation and characterisation of a variant HL60 cell line defective in the activation of the NADPH oxidase by phorbol myristate acetate. *J Immunol* 1998;161:6885-95.
9. Mendez I de, Homayounpour N, Leto TL. Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol* 1997;17:2177-85.
10. Koshkin V, Lotan O, Pick E. Electron transfer in the superoxide-generating NADPH oxidase complex reconstituted *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1997;1319:139-46.

Recibido: 10 de febrero del 2000. Aprobado: 18 de mayo del 2000.

Dra. *Bárbara Elena García Triana*. Centro de Investigaciones Biomédicas. Avenida 146 No. 3102 esquina a 31, reparto Cubanacán, municipio Playa, Ciudad de La Habana.