

# Papel de la asociación de Nef-VIH-1 con p22-phox

Siham Salmen<sup>1</sup>, Melisa Colmenares<sup>1</sup>, Darrel L. Peterson<sup>2</sup>, Lisbeth Berrueta<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, Estados Unidos

Recibido Mayo 15, 2010. Aceptado Mayo 30, 2010

## Resumen

La alteración de la función de los componentes de la inmunidad innata puede contribuir al desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) durante el curso de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se ha descrito que Nef, una de las proteínas reguladoras del VIH, puede modular la producción de superóxido en células. Así, la alteración de la producción de superóxido en los monocitos/macrófagos y neutrófilos de pacientes infectados con VIH, podría ser secundaria a un efecto directo de Nef en componentes del complejo NADPH oxidasa. Nuestro grupo recientemente describió que Nef es capaz de aumentar la producción de anión superóxido en los neutrófilos humanos, y de asociarse con p22-phox, uno de los componentes de membrana del complejo enzimático. En este reporte proponemos un modelo hipotético de asociación entre p22-phox y Nef-VIH-1, donde se evidencia un posible sitio de contacto. Es necesario realizar nuevos estudios que permitan corroborar este modelo y mapear el sitio de contacto crítico para modular este complejo enzimático responsable de uno de los mecanismos de defensa innatos más eficientes en los fagocitos.

**PALABRAS CLAVE:** VIH, neutrófilos, superóxido, Nef, p22-phox, NADPH-oxidasa.

## ROLE OF Nef-VIH-1 AND p22-phox ASSOCIATION

### Abstract

*Altered neutrophil function may contribute to the development of AIDS during the course of HIV infection. It has been described that Nef, a regulatory protein from HIV, can modulate superoxide production in phagocytic cells, therefore altered superoxide production in monocyte/macrophage and neutrophils from HIV infected patients, could be secondary to a direct effect of Nef on components of the NADPH oxidase complex. Our group recently described a specific association between Nef and p22-phox, a membrane component of the NADPH oxidase complex. In this work we proposed a hypothetical model that shows the way that these proteins could be associated. Additional studies are necessary to map the sequence that are involved and if they are critical to modulate the enzymatic complex responsible for one of the most efficient innate defense mechanisms in phagocytes, contributing to the pathogenesis of the disease.*

**KEY WORDS:** VIH, neutrophils, superoxide, Nef, p22-phox, NADPH oxidase

## Introducción

Se ha estimado que 3.2 millones de personas en el mundo están infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (1), agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Además del deterioro de la respuesta inmune adaptativa, durante la infección por el VIH ocurre un detrimento de los elementos de la inmunidad innata (2,3). Las células fagocíticas juegan un papel muy importante en la defensa contra patógenos mediante la activación de diversos mecanismos microbicidas, dentro de los cuales se encuentran la fagocitosis y la producción de superóxido. El superóxido es generado por la activación del complejo NADPH-oxidasa, a través de la reducción del oxígeno molecular, favoreciendo así la generación de metabolitos reactivos del oxígeno (ROS), responsables de mediar la destrucción de diferentes componentes celulares, con alto poder microbicida (4). El complejo NADPH-oxidasa está constituido por un componente de membrana, denominado flavocitocromo conformado por dos subunidades proteicas (gp91-phox y p22-phox) que constituyen la subunidad catalítica y un componente citosólico, conformado por tres proteínas denominadas: p47-phox, p67-phox y p40-phox.

Una vez que la célula es activada el componente citosólico debe ser trasladado para su adecuado ensamblaje con los componentes de membrana y así conformar un complejo enzimáticamente activo (5, 6). Para que este proceso se lleve a cabo de manera efectiva, p47-phox debe sufrir un cambio conformacional, mediado principalmente por eventos de fosforilación, exponiendo de esta manera su dominio SH3; que le permite interactuar con p22-phox, facilitando el reclutamiento de los otros dos componentes citosólicos hacia la membrana celular (7); además favorece que p67-phox establezca contacto con gp91-phox conduciendo así a la activación definitiva de este complejo (8). Para que todo este proceso de movilización, traslado y activación del complejo enzimático ocurra, deben participar otras proteínas pertenecientes a la familia de las GTPasas, tales como Rac1, Rac2 (ubicadas en el citosol) y Rap1A (ubicada en la membrana) (9, 10), las cuales son indispensables

para la conformación de complejo enzimáticamente activo.

Diversas células fagocíticas y no fagocíticas expresan componentes del complejo NADPH-oxidasa, pero es especialmente en los monocitos y neutrófilos donde se ha caracterizado la función microbicida de este complejo enzimático (5). Se ha evidenciado que durante la infección por el VIH, las células fagocíticas (monocitos y neutrófilos) pierden su capacidad funcional, predisponiendo así a los pacientes a sufrir infecciones oportunistas (1, 11, 12), asociado con un desequilibrio en el estrés oxidativo e incremento en la susceptibilidad a sufrir muerte celular (13). Los monocitos/macrófagos además son células susceptibles a ser infectadas por el VIH y son consideradas uno de sus principales reservorios (14).

El virus está constituido por múltiples proteínas estructurales y reguladoras, dentro de las cuales Nef es una de las que se ha caracterizado por mediar múltiples estrategias de evasión de la respuesta inmune (15). Nef es una proteína miristoilada de 27-34 kDa de peso molecular, es expresada exclusivamente por VIH1/2 y por el virus de la inmunodeficiencia simia (VIS), y se ha establecido que es una de las proteínas más importantes en la inmunopatogenia de la infección por el VIH (16), ya que incrementa la infectividad y la replicación viral (17, 18). Gran parte de los mecanismos de regulación están asociados con su capacidad de interactuar con proteínas celulares que incluyen: receptores de membrana, proteínas encargadas del tráfico intracelular, proteínas de señalización, entre otras (15, 19).

Recientemente se ha evidenciado que Nef se asocia con proteínas del hospedador a fin de mediar sus mecanismos inmunopatogénicos, una de la mejor caracterizada es la interacción con la proteína PAK2, que conduce a alteración de la quimiotaxia celular por afectar el remodelamiento de la actina, a través de promover la hiperfosforilación de la cofilina (proteína reguladora del proceso de polimerización de actina). Esta función es común de las diferentes formas alélicas de Nef, con algunas excepciones (20).

Debido a que se ha documentado que Nef puede regular la producción de superóxido en macrófagos, microglías y neutrófilos (2, 21, 22), y que

además se ha demostrado que es capaz de inducir la fosforilación de p47-phox (23), se evaluó si esta proteína era capaz de asociarse con componentes del complejo NADPH-oxidasa y promover estos cambios a través de mecanismos directos. Para ello se realizó un abordaje mediante el uso de diferentes herramientas experimentales que incluyeron la microscopía de fluorescencia, la citometría de flujo, la biología molecular y la bioquímica, a fin de comprender cómo el VIH puede afectar la producción de superóxido en pacientes infectados.

Nef fue expresado y purificado como una proteína de fusión y utilizada para estimular a los PMN, a fin de evidenciar en primer lugar si la forma soluble era capaz de inducir la producción de superóxido (24). Este efecto de Nef sobre la activación de la producción de superóxido ha sido documentado anteriormente en otras poblaciones celulares, argumentándose varios mecanismos de acción, que involucran su capacidad para activar a Rac1 y a PAK, ambas implicadas en la activación del complejo NADPH oxidasa (24). Recientemente se ha demostrado que una línea de monocitos (U937) humanos, Nef interactúa con Hck (quinasa de células hematopoyéticas), de esta manera puede inducir la fosforilación y traslado a la membrana de p47-phox (23).

Nuestro grupo fue capaz de demostrar mediante ensayos de inmunoprecipitación, que Nef se asociaba a una proteína de 22 kDa, identificada mediante inmunotransferencia (*immunoblotting*) como p22-phox (25), hallazgo que fue confirmado mediante co-inmunoprecipitación inversa, es decir inmunoprecipitando a p22-phox y detectando a Nef, en lisados de polimorfonucleares previamente incubadas con esta proteína viral, y mediante inmunofluorescencia y ensayos de *Far-western*.

En vista de estos hallazgos, la asociación proteína-proteína fue analizada mediante el uso de un servidor de *web* que permite la predicción de la estructura proteica. Para ello primero obtuvimos los archivos en formato PDB de ambas proteínas, mediante el uso del servidor remoto *Phyre Server* (26). Luego se procedió a determinar los segmentos que con mayor probabilidad estaban interactuando y se evidenció que los residuos VRGE [126-129] de p22-phox y RRQDI [105-109] de

Nef, mostraban alta probabilidad de asociación. A pesar de que aun no está reportada la estructura cristalizada de la proteína p22-phox completa, se propone un modelo de predicción de la asociación de p22-phox con Nef, generado con el programa *ClusPro* (27) y el modelaje tridimensional realizado mediante el uso del programa *MolBrowser* de Molsoft, dicho modelo hipotético de interacción se muestra en la figura 1.

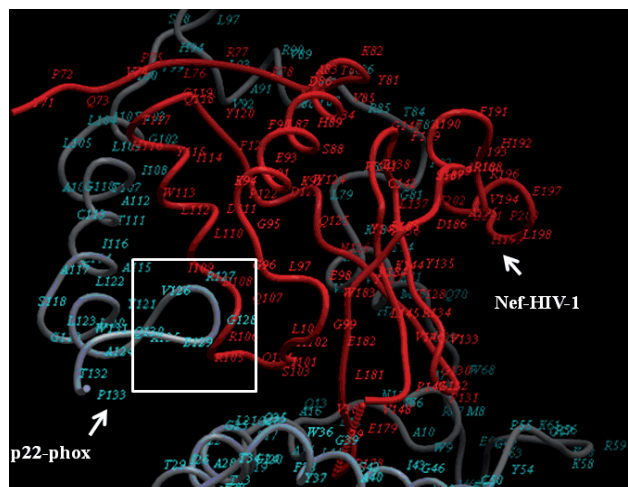


Figura 1. Modelaje sobre la asociación Nef/p22phox

La p22-phox funciona como una proteína adaptadora entre la membrana y los componentes citoplasmáticos del complejo enzimático, su asociación con Nef pudiera tener un efecto sinérgico, quizás mediante un cambio conformacional de la proteína y aumento de la actividad enzimática. Este modelo hipotético que proponemos de asociación entre p22-phox y Nef-VIH-1, es el punto de partida para el diseño de nuevos estudios que permitan corroborar los dominios participantes de esta asociación y además comprender la importancia biológica de esta interacción, lo que pudiera representar en el futuro un posible blanco para la intervención terapéutica, no solo durante la infección por VIH, sino en otras patologías asociadas a disfunción en la producción de metabolitos reactivos del oxígeno.

**Agradecimiento:** Este trabajo fue apoyado en parte por dos donaciones procedentes de FONACIT y CDCHT-ULA M-M-998-10-07-B.

**Correspondencia:** *Lisbeth Berrueta, MD, PhD. Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela, Avenida 16 de Septiembre. Edificio Louis Pasteur. Anexo IAHU-LA, PO BOX 566. Mérida 5101. Venezuela, correo electrónico: lberruet@ula.ve*

## Referencias

1. Kilaeski, E.M., Shah, S., Nonnemacher, M.R., Wigdahl, B. 2009. Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* 6:118.
2. Salmen, S., Guillermo, C., Colmenares, M., et al. 2005. Role of human immunodeficiency virus in leukocytes apoptosis from infected patients. *Invest. Clin.* 46:289-305.
3. Salmen, S., Berrueta, L., Montes, H. 2007. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Revista Médica Extensión Portuguesa-ULA* 1:29-44
4. Roos, D., van Bruggen, R., Meischl, C. 2003. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 5:1307-1315.
5. Babior, B.M. 2004. NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* 16:42-47.
6. de Mendez, I., Homayounpour, N., Leto, T.L. 1997. Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol. Cell. Biol.* 17:2177-2185.
7. Ago, T., Nunoi, H., Ito, T., Sumimoto, H. 1999. Mechanism for Phosphorylation-induced Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase Protein p47phox. Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the sh3 domain-mediated intramolecular interaction in p47phox, thereby activating the oxidase. *J. Biol. Chem.* 274:33644-33653.
8. Dang, P., Cross, A., Babior, B. 2001. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3001-3005.
9. Knaus, U., Heyworth, P., Evans, T., et al. 1991. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac2. *Science* 254:1512-1515.
10. Moskwa, P., Dagher, M.C., Paclat, M.H., et al. 2002. Participation of Rac GTPase activating proteins in the deactivation of the phagocytic NADPH oxidase. *Biochemistry* 41:10710-10716.
11. Kuritzkes, D. 2000. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and bacterial infection in patients with human immunodeficiency virus disease: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Clin. Infect. Dis.* 30:256-260.
12. Salmen, S., Teran, G., Borges, L., et al. 2004. Increased Fas-mediated apoptosis in polymorphonuclear cells from HIV-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* 137:166-172.
13. Salmen, S., Montes, H., Soyano, A., et al. 2007. Mechanisms of neutrophil death in human immunodeficiency virus-infected patients: role of reactive oxygen species, caspases and map kinase pathways. *Clin. Exp. Immunol.* 150:539-545.
14. Brown, A., Zhang, H., Lopez, P., et al. 2006. In vitro modeling of the HIV-macrophage reservoir. *J. Leukoc. Biol.* 80:1127-1135.
15. Foster, J.L., Garcia, J.V. 2008. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology* 5:1-13.
16. Quaranta, M.G., Mattioli, B., Giordani, L., Viora, M. 2006. The immunoregulatory effects of HIV-1 Nef on dendritic cells and the pathogenesis of AIDS. *FASEB J.* 20:2198-2208.
17. Hanna, Z., Kay, D.G., Rebai, N., et al. 1998. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 95:163-175.
18. Roeth, J.F., Collins, K.L. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:548-563.
19. Geyer, M., Fackler, O.T., Peterlin, B.M. 2001. Structure-function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Reports* 2:580-585.
20. Stolp, B., Abraham, L., Rudolph, J.M., Fackler, O.T. 2010. Lentiviral Nef proteins utilize PAK2-mediated deregulation of cofilin as a general strategy to interfere with actin remodeling. *J. Virol.* 84:3935-3948.
21. Olivetta, E., Pietraforte, D., Schiavoni, I., et al. 2005. HIV-1 Nef regulates the release of superoxide anions from human macrophages. *Biochem. J.* 390(Pt 2):591-602.
22. Vilhardt, F., Plastre, O., Sawada, M., et al. 2002. The HIV-1 Nef Protein and Phagocyte NADPH Oxidase Activation. *J. Biol. Chem.* 277:42136 - 42143.
23. Olivetta, E., Mallozzi, C., Ruggieri, V., et al. 2009. HIV-1 Nef induces p47(phox) phosphorylation leading to a rapid superoxide anion release from the U937 human monoblastic cell line. *J. Cell. Biochem.* 106:812-822.
24. Manninen, A., Hiipakka, M., Vihinen, M., et al. 1998. SH3-domain binding function of HIV-1 Nef is required for association with a PAK-related kinase. *Virology* 250:273-282.
25. Salmen, S., Colmenares, M., Peterson, D.L., et al. 2010. HIV-1 Nef associates with p22-phox, a component of the

NADPH oxidase protein complex. Cell. Immunol. 263:87-99.  
26. Kelley, L.A., Sternberg, M.J.E. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server.

Nat. Protoc. 4:363-371.  
27. Comeau, S.R., Gatchell, D.W., Vajda, S., Camacho, C.J. 2004: ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. Nucleic Acids Res. 32:W96-W99.