

LINA ANDREA GÓMEZ RESTREPO

**NOVOS POLIMORFISMOS NO GENE QUE CODIFICA A
PROTEÍNA DE 67 kDa DO SISTEMA NADPH OXIDASE**

CAMPINAS

2005

LINA ANDREA GÓMEZ RESTREPO

**NOVOS POLIMORFISMOS NO GENE QUE CODIFICA A
PROTEÍNA DE 67 kDa DO SISTEMA NADPH OXIDASE**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Saúde da Criança, área de concentração em
Saúde da Criança e do Adolescente.*

Orientador: Prof.Dr. Antonio Condino Neto



1150065982



FCM

T/UNICAMP G586n

CAMPINAS

2005

Nº CHAMADA
 +UNICAMP
 G586n
 V _____ EX _____
 TOMBO BC/ 65382 fcm/3231
 PROC. 16-2-00086-05
 C ☐ D ☒
 PREÇO 11,00
 DATA 16-2-00086-05
 Nº CPD _____

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNICAMP

BIBID - 366417

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G586n

Gómez Restrepo, Lina Andrea

Novos polimorfismos no gene que codifica a proteína de 67 kDa do sistema NADPH oxidase. / Lina Andréa Gómez Restrepo. Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador : Antonio Condino Neto

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Polimorfismos (Genética). 2. NADPH oxidase – análise.
 I. Condino Neto, Antonio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(Slp/fcm)

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR

Prof. Dr. Antonio Condino Neto

MEMBROS

1. Prof. Dr. Antonio Condino Neto
2. Prof. Dra. Lilia Freire de Souza Li
3. Prof. Dra. Andréa Trevas Maciel
4. Prof. Dra. Anete Sevciovic Grumach
5. Prof. Dr. Dewton Moraes de Vasconcelos

Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente

Faculdade de Ciências Médicas

Universidade Estadual de Campinas

DATA: 16 de Junho de 2005

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Edilma, que embora entenda pouco do que aqui está escrito,
entende perfeitamente o verdadeiro significado deste trabalho.*

Ao Prof. Dr Antonio Condino, pela oportunidade e orientação recebida.

Ao Dr. Pablo Javier Patiño, pelo voto de confiança e pelo apoio.

À minha família, Jorge, Edilma, Elkin e Maricela, que na distância, sempre me fizeram sentir seu amor.

À Jussara Redher pelo apoio técnico e amizade.

Aos meus colegas e amigos do Centro de Investigação em Pediatria pelos momentos divertidos que passamos, pelos conselhos nos momentos de necessidade e pela ajuda profissional.

A Pablo Cadavid pela torcida de sempre.

Às biólogas Dulcineia Albuquerque e Ângela Maria de Asis pelo apoio técnico e amizade.

A CAPES pelo apoio financeiro.

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xvii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxi</i>
INTRODUÇÃO.....	25
OBJETIVOS.....	37
CAPÍTULOS.....	41
CAPÍTULO 1.....	43
CAPÍTULO 2.....	65
CAPÍTULO 3.....	93
DISCUSSÃO GERAL.....	113
CONCLUSÃO GERAL.....	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
ANEXO.....	133

Cit <i>b</i>₅₅₈	Citocromo b 558
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CYBA	Gene da subunidade A do citocromo b 558
CYBB	Gene da subunidade B do citocromo b
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DHR	Dihidrorodamina
DGC	Doença Granulomatosa Crônica
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
GTP	Guanilato Trifosfato
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
gp91^{PHOX}	Glicoproteína de 91 KDa da Oxidase dos fagócitos
kDa	Kilodaltons
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato
NCF1	Fator Citosólico de Neutrófilos 1
NCF2	Fator Citosólico de Neutrófilos 1
O₂	Oxigênio Molecular
O₂⁻	Ânion Superóxido
PAF	Fator ativador de plaquetas

PHOX	Oxidase dos Fagócitos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
p22^{PHOX}	Proteína de 22 KDa da Oxidase dos Fagócitos
p67^{PHOX}	Proteína de 67 KDa da Oxidase dos Fagócitos
p47^{PHOX}	Proteína de 47 KDa da Oxidase dos Fagócitos
p40^{PHOX}	Proteína de 40 KDa da Oxidase dos Fagócitos
Rac	“Ras related C3 Botulinum Toxin”
Rap1A	“Ras related protein 1A”
Rho	“Ras homology”
ROS	Espécies Reativas do Oxigênio
SSCP	Polimorfismos Conformacionais de Cadeia Simples
SH3	Domínio de Homologia Src 3
SNPs	"Single Nucleotide Polymorphisms"
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

RESUMO

A NADPH oxidase das células fagocíticas é um sistema enzimático encarregado da produção de espécies reativas do oxigênio, as quais são essenciais durante a resposta imune inata contra uma grande variedade de microorganismos como bactérias e fungos. Um dos principais componentes deste sistema é a proteína citosólica p67^{PHOX} codificada pelo gene NCF2 localizado no braço longo do cromossomo 1. Mutações no gene NCF2 resultam em uma das formas autossômicas recessivas da doença granulomatosa crônica (DGC), uma imunodeficiência primária caracterizada por infecções graves e recorrentes. Recentemente descrevemos mudanças nucleotídicas em alguns pacientes deficientes de p67^{PHOX} onde aparentemente essas alterações não foram responsáveis pelo fenótipo, mas que poderiam modificar de alguma forma a expressão do gene. Para determinar se essas alterações correspondem a polimorfismos gênicos, analisamos sua ocorrência na população normal. A primeira substituição é uma transição C→T na posição -23 da região 5' reguladora do gene. Dos 100 sujeitos avaliados, 67% foram homozigotos para o alelo C, 32% foram heterozigotos e só 1% foram homozigotos para o alelo T. A segunda mudança nucleotídica corresponde à transição A→G na posição -21 da região 3' terminal do íntron 10 (IVS10-21A→G), essa substituição foi analisada em 114 indivíduos dos quais 41% foram homozigotos para A, 49% foram heterozigotos e 24% homozigotos para G. Esses dois polimorfismos estão localizados dentro de seqüências necessárias para o início da transcrição (C→T at -23) e para a formação do *splicing* (IVS10-21A→G) e por isto podem alterar a expressão do gene p67^{PHOX}, e conseqüentemente diminuir a atividade do sistema NADPH oxidase. Na análise da seqüência com o polimorfismo no intron 10 (IVS10-21A→G), observamos espécies anormais de mRNA nos indivíduos sadios. Nos genótipos analisados algumas moléculas de RNAm não possuem o exon 11. O efeito funcional do polimorfismo -23 ^{C/T} no gene p67^{phox} foi analisado medindo a atividade da luciferase entre construtos, contendo toda a região promotora com o alelo T e com o alelo C, mas não se observaram diferenças.

Palavras chaves: gene NCF2, SNPs, seqüência promotora, RNA *splicing*, NADPH oxidase, explosão respiratória, fagócitos.

ABSTRACT

The NADPH oxidase of phagocytic cells is an enzymatic system that through the production of reactive oxygen species is essential for the innate immune response against a variety of bacteria and fungi. One of its essential components is p67^{PHOX}, a 67-kDa cytosolic protein encoded by the NCF2 gene located in the long arm of chromosome 1. Varied mutations involving the NCF2 gene result in an autosomal recessive form of chronic granulomatous disease (CGD), a primary immunodeficiency characterized by severe and recurrent infections. We have recently described different nucleotide changes in some p67-phox-deficient patients that apparently were not responsible for the CGD phenotype, but they could modify to some extent gene expression. To determine if two of these changes corresponded to genetic polymorphisms, we analyzed their occurrence in healthy donors. The first substitution corresponded to C→T transition at position -23 of the 5' regulatory region of the gene. Among 100 evaluated subjects, 67% were homozygous for the allele containing C, 32% were heterozygous, and 1% were homozygous for T. The second nucleotide change corresponded to A→G transition in position -21 of the 3' end of intron 10 (IVS10-21A→G). This substitution was analyzed in 114 subjects: 41% were homozygous for A, 49% were heterozygous, and 24% were homozygous for G. Both polymorphisms are located within sequences necessary for initiating gene transcription (C→T at -23) and for RNA *splicing* (IVS10-21A→G). Therefore, they may alter p67^{PHOX} gene expression and consequently decrease the activity of NADPH oxidase system.

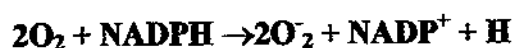
The sequence analysis for the polymorphism located in the intron 10 (IVS10-21A→G) show generation of the abnormal mRNA species in normal individuals; some molecules of the mRNA do not contain the intron 11 in all subject genotypes.

The functional effect of the -23 ^{C/T} polymorphism in the p67-PHOX was evaluated measuring luciferase activity of the T allelic p67-PHOX promoter and C allelic promoter, but no differences were observed.

Key words: NCF2 gene, SNPs, promoter sequence, RNA *splicing*, NADPH oxidase, respiratory burst, phagocytes.

INTRODUÇÃO

O sistema NADPH oxidase é um grupo de enzimas associadas às membranas plasmáticas de uma grande variedade de células. Deste grupo a melhor estudada é a NADPH oxidase dos leucócitos, a qual é encontrada principalmente nos fagócitos maduros e nos linfócitos B. A ativação deste sistema enzimático ocorre em resposta a estímulos fisiológicos como a ingestão de patógenos opsonizados e a substâncias quimiotáticas como N-formil peptídios, C5a, o fator ativador de plaquetas (PAF), e a interleucina 8 (IL8) produzidas durante a resposta imune inata (HENDERSON et al., 1996) (CHANOCK et al., 1994). Essas substâncias aumentam o consumo de oxigênio molecular de 1- 400 vezes, e começa a redução do oxigênio a ânion superóxido (O_2^-), num evento metabólico conhecido como “Explosão Respiratória” (DELEO et al., 1999) (WOODMAN et al., 1991). O sistema NADPH oxidase catalisa a produção de ânion superóxido pela redução de um elétron do oxigênio, usando o NADPH como o doador de elétrons (BABIOR, 1999) (SEGAL and ABO, 1993).



O ânion superóxido gerado sofre uma dismutação espontânea, sendo convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que serve como um co-substrato para as peroxidases, como a mieloperoxidase (MPO) dos neutrófilos e monócitos (CLARK et al., 2002) ou a peroxidase eosinofílica (HORTON et al., 1996). Estas peroxidases oxidam halógenos (Cl^- , Br^- e I^-) e assim produzem uma grande variedade de oxidantes reativos conhecidos como espécies reativas do oxigênio (ROS, do inglês Reactive Oxygen Species), que são usados pelos fagócitos para matar microrganismos invasores. Mas esses reativos também podem causar dano tecidual, por isso sua produção deve ser bem regulada para assegurar que serão gerados quando e onde sejam requeridos (SEGAL and ABO, 1993). Junto com a ativação do NADPH oxidase, os grânulos intracelulares se fundem com a membrana fagolisossomal para liberar moléculas biologicamente ativas, como proteases, e diversas proteínas antimicrobianas (FURTMULLER et al., 1998).

As espécies reativas do oxigênio, junto com os mecanismos microbicidas não dependentes do oxigênio, atuam sinergicamente na atividade bactericida das células fagocíticas durante a resposta imune, atuando sobre alvos moleculares como o DNA

genômico, o transporte de elétrons, proteínas e lipídeos que constituem os organismos (SEGAL et al., 2000) (KLEBANOFF, 1999).

A importância da explosão respiratória na defesa do hospedeiro foi evidenciada pelos defeitos na atividade NADPH oxidase ligados à Doença Granulomatosa Crônica (DGC), uma imunodeficiência primária na qual os pacientes sofrem infecções recorrentes produzidas por microorganismos extracelulares principalmente catalase positivos e fungos (EZEKOWITZ et al., 1987). A Doença Granulomatosa Crônica é uma desordem herdada caracterizada pela falha na produção de O_2^- pelos fagócitos, causada por mutações nos genes que codificam alguma das subunidades que formam o sistema NADPH oxidase (ARIGA et al., 1993; RAE et al., 1998). DGC é normalmente diagnosticada na infância e tem uma incidência de 1 em 250.000 nascidos vivos (NISIMOTO et al., 1995).

Propriedades e funções dos componentes do sistema NADPH oxidase

O sistema NADPH oxidase consiste de cinco componentes que são essenciais para sua atividade: $p22^{PHOX}$ e $gp91^{PHOX}$, que estão localizados nas membranas das vesículas secretoras e grânulos específicos, onde ocorrem como uma flavohemoproteína heterodimérica conhecida como citocromo b_{558} , e os componentes $p40^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$ e $p67^{PHOX}$, que se localizam no citosol como um complexo (VOLPP et al., 1988) (CURNUTTE, 1993).

O flavocitocromo b_{558} possui um grupo FAD e dois grupos hemo, que são os encarregados de ceder os elétrons ao oxigênio molecular para a geração do ânion superóxido (O_2^-) dentro do fagolisossomo ou na superfície celular (WALLACH and SEGAL, 1996). Quando as células são expostas a estímulos, os componentes citosólicos $p40^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$ e $p67^{PHOX}$ migram para membrana plasmática para se associarem com o citocromo b_{558} e ativar o complexo enzimático. O sistema montado é capaz de transferir os elétrons por um gradiente de potencial reduzido à Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) presente no flavocitocromo e em seguida aos grupos heme. É postulado que o flavocitocromo b_{558} sofre alterações conformacionais para permitir a união do NADPH e/ou

facilitar a transferência de elétrons entre o NADPH e o FAD. O passo final na cadeia de transporte dos elétrons ocorre quando o oxigênio aceita um elétron, sendo convertido em ânion superóxido (SEGAL et al., 2000) (ROTROSEN et al., 1992) (CURNUTTE, 1993).

Citocromo b_{558}

O citocromo b_{558} é um complexo 1:1 de $p22^{PHOX}$ e $gp91^{PHOX}$ (WOODMAN et al., 1991) (WALLACH et al., 1996), e aparentemente contém dois resíduos heme para um de FAD (SEGAL, 1992). Esta composto pelo gene da $gp91^{PHOX}$ (CYBB, MIN 306400) que possui aproximadamente 30 Kb, contém 13 exons e encontra-se localizado no cromossomo Xp21 (DINAUER, 1993). Seu RNAm codifica um polipeptídio de 571 resíduos, com três hélices transmembrana e peso molecular de 65 kDa. Possui uma sequência rica em prolínas na região C-terminal, a qual se liga com a região N-terminal da $p47^{PHOX}$ (IMAJOH-OHMI et al., 1992). A $p22^{PHOX}$ (CYBA, MIM 233690) tem comprimento de 8.5 Kb, contém seis exons e está localizado no cromossomo 16q24. Codifica uma proteína de 195 aminoácidos com um peso molecular de 20.9 kDa. É uma proteína transmembrana e possui uma região rica em prolínas na extremidade carboxi terminal (CHANOCK et al., 1994) (DINAUER et al., 1989).

Componentes Citosólicos

A $p47^{PHOX}$ é uma proteína altamente básica (pI: 10.4), possui 390 aminoácidos, e contém dois domínios SH3 através dos quais interage com outras proteínas. O gene da $p47^{PHOX}$ (NCF1, MIM 2337000) encontra-se localizado no cromossomo 7q11.23, tem um comprimento de 18 Kb e contém 11 exons (DELEO and QUINN, 1996). Possui dois domínios SH3 perto do centro da molécula, sendo que o primeiro liga-se à sequência rica em prolínas na região C-terminal da $p22^{PHOX}$ e o segundo domínio liga-se à região rica em prolínas da $p67^{PHOX}$. Ela é responsável pelo transporte do complexo citosólico desde o citosol até a membrana durante a ativação da oxidase. O extremo carboxi terminal mostra

possíveis alvos a serem fosforilados, com várias serinas e resíduos básicos (BENGIS-GARBER and GRUENER, 1996).

Está comprovado que durante a ativação da oxidase a $p47^{PHOX}$ conduz o complexo citosólico até à membrana, já que neutrófilos que não têm $p47^{PHOX}$ são incapazes de transferir $p67^{PHOX}$ desde o citosol até a membrana. Antes dos componentes serem transferidos para a membrana, a $p47^{PHOX}$ deve ser fosforilada. Essa fosforilação é um dos principais eventos na ativação da oxidase, embora $p47^{PHOX}$ não seja absolutamente indispensável na atividade da oxidase (BENGIS-GARBER and GRUENER, 1996) (HEYWORTH et al., 1991).

A $p67^{PHOX}$ é uma proteína que possui 526 aminoácidos, tem uma massa de 60.9 kDa e é levemente ácida (pI: 6.0). O gene da $p67^{PHOX}$ (NCF2, MIM 233710) encontra-se localizado no cromossomo 1q25 e contém 16 exons que geram um RNAm de 2.4 Kb (CHANOCK et al., 1994). A $p67^{PHOX}$, assim como a $p47^{PHOX}$, contém domínios SH3 que podem ser encontradas em uma grande variedade de proteínas de sinalização intracelular (LETO et al., 1990). Possui quatro repetições tetratricopeptídeas (TPR) que são repetições em "tandem" de 34 aminoácidos. Esses motivos medeiam interações entre proteínas e formação de complexos multiprotéicos, e também são encontrados numa grande variedade de proteínas. A $p67^{PHOX}$ interage com as proteínas citosólicas $p40^{PHOX}$ e $p47^{PHOX}$ através destes três motivos (LETO et al., 1990) (CHEN et al., 1996).

A $p67^{PHOX}$ contém uma região central rica em prolínas seguida por um domínio SH3, com um segundo domínio SH3 na região C-terminal. A função do primeiro domínio é desconhecida. A $p67^{PHOX}$ interage com a $p47^{PHOX}$ usando o domínio SH3 da região C-terminal para unir-se a seqüências ricas em prolínas do extremo C-terminal da $p47^{PHOX}$, em seguida o segundo domínio SH3 da $p47^{PHOX}$ se une com a região rica em prolínas da $p67^{PHOX}$ (UHLINGER et al., 1994). No sistema NADPH oxidase esses domínios têm um papel muito importante na interação entre os componentes que levam à montagem do complexo enzimático ativo unido à membrana (DELEO and QUINN, 1996). A porção N-terminal da $p67^{PHOX}$ contém uma região de união para Rac, sendo que essas proteínas são importantes para a ativação e desativação do sistema NADPH oxidase e são chamadas de

proteínas ligadoras de GTP, onde as subfamílias das Rac têm sido identificadas como essenciais (DORSEUIL et al., 1996).

As proteínas ativadoras $p67^{PHOX}$ e $p47^{PHOX}$ formam o complexo citosólico junto com um terceiro componente, a proteína $p40^{PHOX}$, que possui 339 aminoácidos. O gene que codifica essa proteína é o NCF4, que se encontra no cromossomo 22q13, possui 10 exons (ZHAN et al., 1996) e contém duas seqüências ricas em prolinas na região C-terminal. Demonstrou-se que esse domínio se liga com um domínio SH3 da $p47^{PHOX}$. Acredita-se que a translocação da $p40^{PHOX}$ à membrana é dependente da presença da $p47^{PHOX}$ e é mediada pela $p67^{PHOX}$. Assim, a $p47^{PHOX}$ se associa com a $p67^{PHOX}$ pela interação dos motivos de prolina e SH3, a $p40^{PHOX}$ interage diretamente com a $p47^{PHOX}$ e indiretamente com $p67^{PHOX}$ (KURIBAYASHI et al., 2002).

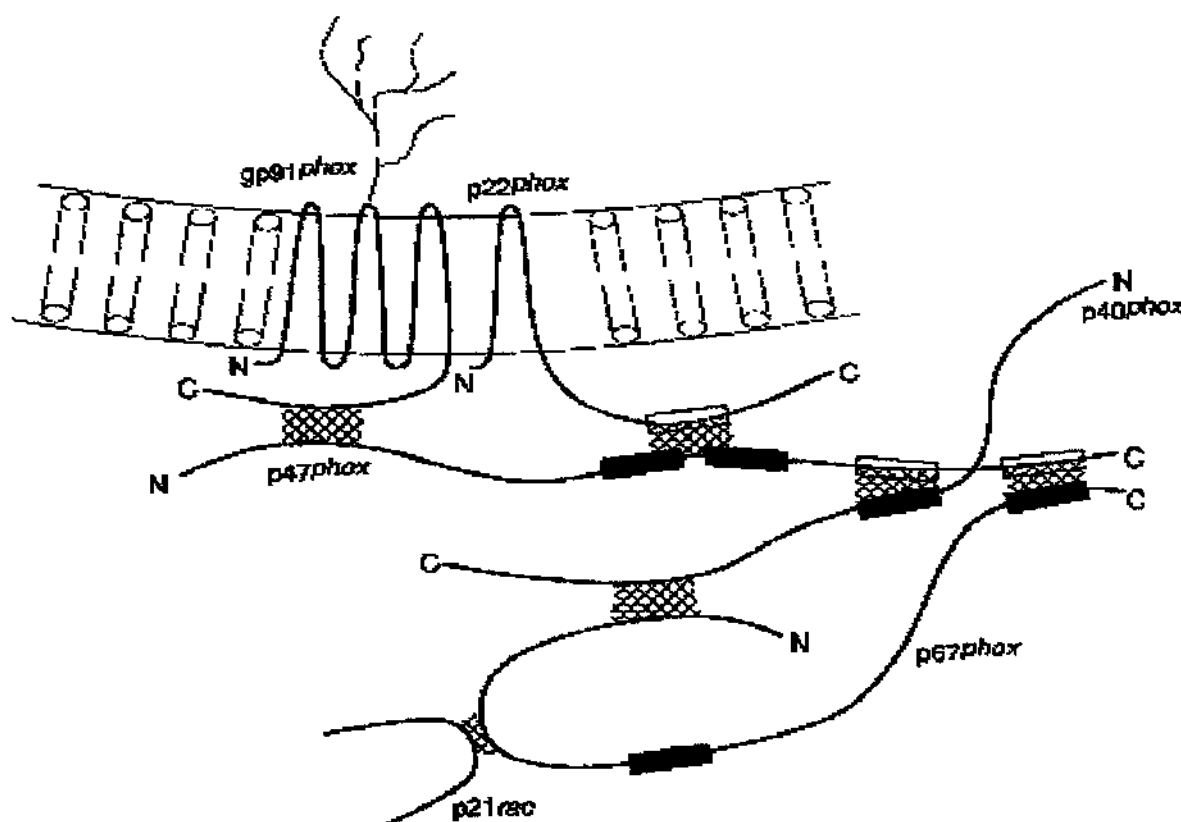


Figura 1- Interações entre as proteínas *phox*. Esse modelo mostra as interações entre os componentes do sistema NADPH oxidase. As caixas pretas são os domínios SH3, as caixas abertas são as seqüências das regiões ricas em prolinas interagindo com elas (KURIBAYASHI et al., 2002).

A ativação do sistema NADPH oxidase requer também mais duas proteínas de baixo peso molecular que ligam GTP, as Rac, as quais nas células em repouso encontram-se localizadas no citoplasma num complexo dimérico Rho-GDI (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*); e a Rap1A, que se localiza nas membranas. Essas proteínas pertencem à superfamília Ras das pequenas proteínas (~21kDa) ligantes de GTP, que regulam diversas vias de transdução de sinais, ciclo celular, e translocação de proteínas (HEYWORTH et al., 1993).

Durante a ativação, Rac2 liga-se ao GTP (guanosine triphosphate) e se liga à p67^{PHOX}, que migra para a membrana junto com o complexo citosólico e se associam ao citocromo b₅₅₈ (DIEKMANN et al., 1994). A Rap1A forma complexos estequiométricos com o citocromo b₅₅₈. O citocromo b₅₅₈ e a Rap1A são liberadas à superfície celular pela fusão das membranas das vesículas secretoras. O papel da Rac-2 na produção de O₂⁻ parece estar relacionado à sua interação com a p67^{PHOX} e estabilização desta proteína (BURG and PILLINGER, 2001). Aparentemente, a fosforilação da Rap1A pode inibir a atividade da oxidase, uma vez que é desfeita a associação com o citocromo b₅₅₈. Por isso a translocação da Rap1A até o citocromo b₅₅₈ é importante para a atividade da oxidase (SEGAL et al., 2000).

Durante a fagocitose, a membrana plasmática é internalizada e se une à vesícula fagocítica. Com isso, a NADPH oxidase libera O₂⁻ dentro da vesícula e a rápida conversão do O₂⁻ em produtos sucessores banha o agressor internalizado com uma mistura de oxidantes corrosivos (BABIOR, 1999).

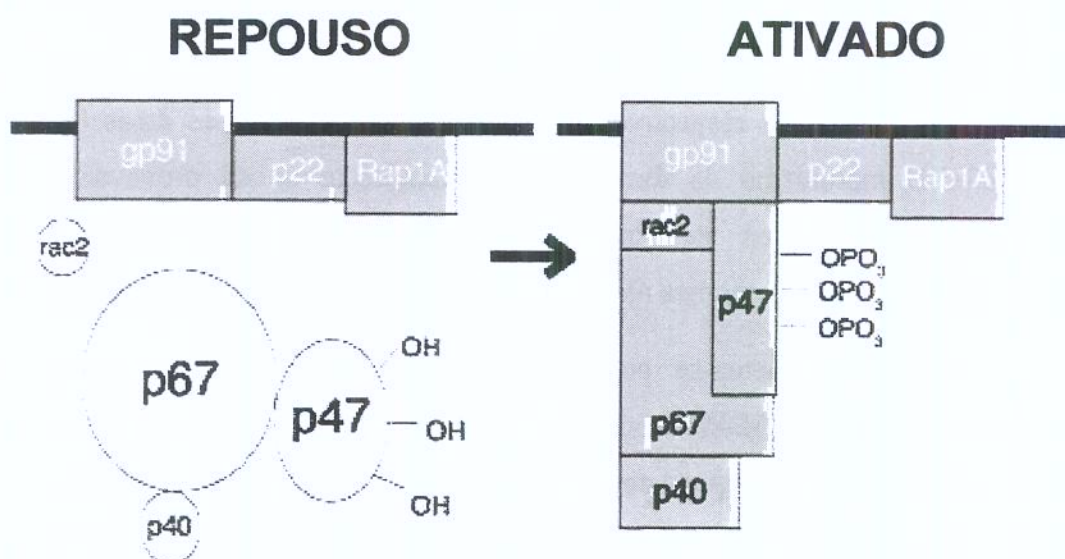


Figura 2- Ativação do sistema NADPH oxidase. Nas células em repouso as subunidades da oxidase estão distribuídas entre o citosol ($p40^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$, $p67^{PHOX}$ e $Rac2$) e as membranas ($Rap1A$ e o citocromo b_{558} , o complexo $p22^{PHOX}/gp91^{PHOX}$). $Rac2$ e $Rap1A$ são proteínas ligantes de guanina que atuam em outros processos além da ativação da oxidase. As outras cinco proteínas são únicas ao sistema NADPH oxidase. Quando as células são ativadas, a $p47^{PHOX}$ é fosforilada e as subunidades citosólicas migram para a membrana, se ligando ao citocromo b_{558} e provocando a ativação do sistema (DIEKMANN et al., 1994) (WOODMAN et al., 1991).

Doença Granulomatosa Crônica

É uma imunodeficiência primária grave e rara, com incidência estimada de 1/250.000 nascidos vivos por ano. É causada por uma alteração no sistema NADPH oxidase fagocítico humano, que altera a produção dos reativos intermediários do oxigênio (WINKELSTEIN et al., 2000). Os pacientes com DGC sofrem infecções recorrentes, provocadas principalmente por bactérias catalase positivas como *Staphylococcus aureus* e

bacilos gram negativos, fungos como *Aspergillus* e *Candida*. Essas infecções ocorrem predominantemente em locais considerados barreiras naturais do organismo (SEGAL et al., 2000). O paciente apresenta infecções graves e recidivantes na pele, nas vias respiratórias, trato gastrointestinal, e nos respectivos linfonodos que drenam essas áreas (FORREST et al., 1988). O mecanismo da formação dos granulomas se dá provavelmente pela dificuldade dos neutrófilos em matar o agente agressor pela persistência dos microrganismos nos fagolisossomos na tentativa de conter as infecções (SEGAL, 1988).

A DGC apresenta-se como consequência de mutações em algum dos componentes do sistema NADPH oxidase, que levam a ausência, baixa expressão ou mau funcionamento de um dos componentes deste sistema. A forma mais freqüente da DGC é a ligada ao sexo, na qual é afetada a cadeia pesada do citocromo b_{558} , o componente $gp91^{PHOX}$ (com aproximadamente 60% dos casos). Nas formas autossômicas recessivas é afetado um dos componentes citosólicos da NADPH oxidase, a $p47^{PHOX}$ (25-30% dos casos), $p67^{PHOX}$ (5% dos casos) ou defeitos na cadeia leve do citocromo b_{558} , o componente $p22^{PHOX}$ (5-7% dos casos). Ainda não se documentaram pacientes com DGC devida a defeitos nos componentes $p40^{PHOX}$, Rap1A, rac1 ou rac2 (WINKELSTEIN et al., 2000) (THRASHER et al., 1994) (ROOS, 1994).

Os tipos de mutações que causam DGC ligada ao sexo incluem deleções e inserções menores, grandes deleções multigênicas, e substituições del tipo “missense” ou “nonsense” (RAE et al., 1998) (SEGAL et al., 2000). Diversos defeitos moleculares no gene CYBB já foram identificados, alguns dentro da região codificadora, nos introns, e regiões regulatórias do gene (ARIGA et al., 1994; NEWBURGER et al., 1994).

A incidência de DGC autossômica é menor que a DGC ligada ao sexo, portanto o número de mutações identificadas nestes pacientes é menor. A identificação das mutações em famílias com alteração na $p22$ ou na $p67^{PHOX}$ indica que as bases genético-moleculares das deficiências destas proteínas são tão heterogêneas quanto as observadas nas deficiências do componente $gp91^{PHOX}$ ligadas ao X (CROSS et al., 1996). Já para a $p47^{PHOX}$, 90% dos pacientes com alteração nesta proteína apresentam a mesma mutação, uma deleção homozigota dos nucleotídeos GT, correspondente às duas primeiras bases do segundo exon do gene NCF1 (ROESLER et al., 2000) (VAZQUEZ et al., 2001).

Além das mutações, diferentes polimorfismos têm sido descritos nos componentes gp91, p22, p67 e p47^{PHOX} (MORENO et al., 2003). Os polimorfismos de um só nucleotídeo são pares de bases únicas localizadas no DNA nas quais seqüências alternativas (alelos) existem em indivíduos normais numa população, e se apresentam com uma frequência de pelo menos 1% (BENTO, 1997). Muitas moléculas envolvidas na resposta imune apresentam polimorfismo gênico, e substituições de um único nucleotídeo (*SNP, single nucleotide polymorphism*) representam o tipo mais freqüente de variação de DNA na população humana podendo influir na estabilidade e atividade das proteínas (FOSTER et al., 1998) (MARSHALL and WELSH, 2001). Baseados nestes fatos e num recente estudo em pacientes com doença granulomatosa crônica (PATINO et al., 1999) pretendemos estabelecer se duas substituições nucleotídicas que aparentemente não foram responsáveis pelo fenótipo destes pacientes corresponderiam a polimorfismos e se poderiam estar alterando a expressão deste gene. A primeira destas transições é a troca de A→G na posição -21 da região 3' do intron 10 e a segunda é a transição de C→T na posição -23 antes do início do exon 1.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar se duas substituições nucleotídicas encontradas no gene NCF2, que codifica para a proteína p67^{PHOX} correspondem a polimorfismos e quais são os efeitos funcionais sobre o gene.

Objetivos específicos

Capítulo 1: *“Doença Granulomatosa Crônica da infância: novos polimorfismos no gene NCF2”.*

Investigar a existência de dois novos polimorfismos (SNPs "single nucleotide polymorphisms") no gene NCF2 do sistema NADPH oxidase e determinar sua frequência em uma população sadia.

Avaliar a sensibilidade da técnica de SSCP (polimorfismo conformacional de cadeia simples) para identificar SNPs.

Capítulo 2: *“Novo polimorfismo no Intron 10, na sequência necessária para o splicing do gene NCF2 gera espécies alternativas de RNAm, mas não afeta à expressão da p67-phox”.*

Determinar se a presença de A por G na posição -21 do intron 10 (IVS10-21A→G) produz alterações funcionais no gene NCF2 em indivíduos normais.

Analisar a sequência entre os introns 10 e 12 do gene NCF2 e determinar a presença de *splicing* alternativo.

Capítulo 3: *“Identificação de um novo polimorfismo na região promotora do gene NCF2”.*

Analisar se a presença deste polimorfismo pode modificar de alguma maneira a regulação da transcrição do gene NCF2, usando mutagênese sitio dirigida e medição da atividade de luciferase.

CAPÍTULOS

CAPÍTULO I

DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA DA INFÂNCIA: NOVOS POLIMORFISMOS NO GENE NCF2.

CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE OF CHILDHOOD: NEW POLYMORPHISMS IN NCF2 GENE.

Running Title: Polymorphisms in p67-phox

Publicado na Revista de Ciências Médicas (*Journal of Medical Sciences*) Campinas,
vol 13 (2): 137-146, Abril/Junho, 2004

AUTORES

1. Lina Andrea Gómez¹, aluna de doutorado, lgomez@fcm.unicamp.br

2. Maria Teresa Rugeles², Doutora em Imunologia, mtrugel@carios.udea.edu.co

2. Pablo Javier Patiño², Doutor em Imunologia, ppatino@carios.udea.edu.co

1. Antonio Condino-Neto¹, Livre-Docente em Pediatria, condino@lexxa.com.br

¹Departamento de Pediatria e Centro de Investigação em Pediatria, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. Brasil.

²Laboratório de Imunología, Faculdade de Medicina, Universidade de Antioquia. Medellín. Colômbia.

Autor para Correspondência

Antonio Condino Neto

Centro de Investigação em Pediatria

Universidade Estadual de Campinas

CP 6111. Campinas SP. Brasil. CEP 13081-970

Tel: 55 19 3788-8988. Fax 55 19 3289-8638

Apoio Financeiro: FAPESP processos 01/14365-3 e 02/05880-4.

Palavras-Chave: imunodeficiências primárias, distúrbios fagocitários, criança, infecções de repetição.

Key words: primary immunodeficiencies, phagocyte disorders, child, recurrent infections.

RESUMO

Objetivos: Mutações no gene NCF2 resultam em uma das formas autossômicas recessivas da doença granulomatosa crônica da infância (DGC). Além de mutações conhecidas, descreveu-se em pacientes com DGC duas novas substituições no gene NCF2. O objetivo deste estudo foi investigar se estas substituições constituem polimorfismos do gene NCF2.

Métodos: Investigamos a frequência de duas substituições na sequência do gene NCF2 em 214 doadores sadios. A primeira é uma transição de C→T na posição -23 da região 5' reguladora. A segunda é uma transição de A→G na posição -21 da região 3' terminal do íntron 10. Extraímos DNA genômico de células do sangue periférico. O DNA foi amplificado por meio de PCR com primers específicos para o gene NCF2, analisado quanto à presença de polimorfismos conformacionais de cadeias simples, digerido com endonucleases específicas e sequenciado. O cálculo das frequências genotípicas e alélicas seguiu a lei de Hardy e Weinberg.

Resultados: Cem indivíduos foram avaliados quanto a presença da transição C→T na posição -23 da região 5' reguladora; sendo 67% homozigotos para o alelo C, 32% heterozigotos, e apenas 1% homozigoto para T. Cento e quatorze indivíduos foram analisados quanto a presença da transição A→G na posição -21 da região 3' terminal do íntron 10; dos quais 36% foram homozigotos para A, 43% heterozigotos e 21% homozigotos para G.

Conclusões: Considerando as frequências alélicas, concluímos que essas variantes correspondem a polimorfismos do gene NCF2. Suas possíveis implicações na expressão do gene NCF2 constituem objeto de pesquisa atual em nosso laboratório.

ABSTRACT

Objectives: Mutations in the NCF2 gene result in an autosomal recessive form of chronic granulomatous disease of childhood (CGD). We have recently described nucleotide changes in p67-*phox*-deficient CGD patients that apparently were not responsible for their CGD phenotype. To determine if two of these changes are genetic polymorphisms, we analyzed their occurrence in the general population.

Methods: We investigated the frequency of two substitutions in NCF2 gene in 214 healthy individuals. The first corresponded to a C→T transition at position -23 of the 5' regulatory region of the gene. The second corresponded to an A→G transition in position -21 of the 3' end of intron 10 (IVS10-21A→G). NCF2 gene fragments from genomic DNA were amplified by PCR with specific primers. These substitutions were detected in genomic DNA by conformational polymorphism analysis of PCR-generated fragments, restriction endonuclease digestion assays, and DNA sequencing. Genotypes and allelic frequencies were calculated by the Hardy-Weinberg equation.

Results: A total of 100 healthy subjects were analyzed for the presence of the C→T transition of the 5' regulatory region of the gene, 67% were homozygous for C, 32% were heterozygous, and 1% was homozygous for T. The A→G transition in intron 10 was analyzed in 114 subjects, 36% were homozygous for A, 43% were heterozygous, and 21% were homozygous for G.

Conclusions: Considering the allelic frequencies, we conclude that both substitutions correspond to polymorphisms of NCF2 gene. The possible implications for transcription or expression of NCF2 gene are under current investigation in our laboratory.

INTRODUÇÃO

As células fagocíticas têm um papel fundamental na defesa inata do hospedeiro contra as infecções. Para esta função, os neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos possuem um eficiente sistema microbicida dependente do oxigênio, cuja atividade é conhecida como explosão respiratória dos fagócitos (1). A produção de reativos intermediários do oxigênio (ROS) ocorre como consequência da ativação de um complexo enzimático denominado NADPH oxidase, que está localizado principalmente na membrana fagolisossomal. Esse sistema transfere os elétrons do NADPH citosólico para o vacúolo, com a finalidade de reduzir o oxigênio a ânion superóxido, dando início aos eventos que levam a morte dos patógenos (2).

O centro enzimático do complexo NADPH oxidase é constituído por vários elementos. A glicoproteína de 91 KDa (gp91-*phox*) e a proteína de 22 KDa (p22-*phox*) formam um heterodímero denominado flavocitocromo b_{558} , presente na membrana das células fagocíticas (3). As proteínas de localização citosólica são a p47-*phox*, p67-*phox* e p40-*phox*, as quais se translocam para a membrana quando os fagócitos são ativados (1). Um defeito na proteína gp91-, p22-, p47- ou p67-*phox* produz a Doença Granulomatosa Crônica da infância (DGC), uma imunodeficiência primária caracterizada por infecções graves e recorrentes causadas principalmente por bactérias catalase positivas e fungos (4).

Além dessas mutações associadas com a DGC, são encontradas diversas substituições nos genes do sistema oxidase, algumas delas consideradas polimorfismos, pois sua frequência na população geral é mais elevada do que se esperaria apenas pela taxa de mutação recorrente (5). No gene da p67-*phox* foram descritas várias mutações responsáveis pela DGC, em várias regiões da sequência deste gene (6) (7). Recentemente foram encontradas algumas substituições não descritas previamente, durante a caracterização de pacientes com DGC, secundária a deficiência de p67-*phox*, os quais além das mutações responsáveis pelo fenótipo de DGC, apresentavam diferentes substituições de nucleotídeos, que também foram identificadas em indivíduos sadios, e que por sua localização na estrutura do gene, poderiam modificar parcialmente a expressão do mesmo (8). Uma destas alterações corresponde à transição de C→T na posição -23 da

região 5' reguladora do gene, que pode ter importância na regulação do promotor do gene (9). A outra substituição é uma transição de A→G no íntron 10, na posição de 21 nucleotídeos antecedendo o início do éxon 11 (IVS10-21 A→G), local de importância para o "splicing" da molécula e processamento do RNA maduro (10). O objetivo deste trabalho foi investigar a frequência destas variações alélicas na população geral, e determinar se estas constituem polimorfismos do gene NCF2.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Sujeitos

Foram estudados 214 indivíduos não relacionados, voluntários sadios da população geral, de ambos os sexos, com idades entre 18 e 40 anos. Após leitura e concordância com os termos do Consentimento Livre e Esclarecido foi realizada uma pequena entrevista inicial sobre seu estado de saúde e o registro de episódios infecciosos mais importantes. A seguir, foram coletados 10 mL de sangue venoso periférico em tubos com heparina. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em conformidade com a resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde do Brasil.

Obtenção de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído do sangue venoso periférico, utilizando-se o kit DNA Purification (Promega, Madison, WI), segundo as instruções do fabricante. O DNA foi ressuspendido em 100 µL de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM) e armazenado a 4°C até seu uso.

Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR)

As zonas do DNA genômico correspondentes à região 5' reguladora do gene NCF2 e ao extremo 3' do íntron 10 do mesmo gene foram amplificadas a partir do DNA genômico obtido dos indivíduos sadios. Os oligonucleotídeos usados para a região 5' foram: p67-5'LB 5'ACCTCTGGCTGGTGACAC3' e p67-EX1RB 5'CCTCCCTGGTGATAATGACA3'; enquanto que para o íntron 11 foram p67-Ex11LA 5'GTGTTTCCCCACATCCAC3' e p67-Ex11RA 5'CAGGGAGAGGAACTCAGGA3'.

As reações de amplificação foram feitas num volume final de 50 µL utilizando Amplitaq Gold (Perkin Elmer). As condições da reação de amplificação foram de 30 ciclos de 96°C/2 min, 63°C/15 seg e 72°C/30 seg, seguidos de um ciclo de extensão de 72°C por

7 minutos, o qual foi realizado num termociclador Gen^R PCR Sistem 9600 (Perkin Elmer). Com a finalidade de confirmar a amplificação, os fragmentos foram visualizados por meio de luz ultravioleta, depois sua separação por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

Análises de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP)

Com a finalidade de identificar polimorfismos conformacionais nos fragmentos de amplificação correspondente à região 5' do gene NCF2 (oligonucleotídeos p67-5'LB e p67-EX1RB) e ao extremo 3' do íntron 10 (oligonucleotídeos p67-Ex11LA e p67-Ex11RB), os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em condições nativas utilizando uma câmara de seqüenciamento. Para isso misturou-se 5 µL da reação de PCR com azul de bromofenol dissolvido em formamida, o DNA foi desnaturado por 2 min a 80°C, em seguida foi colocado sobre um gel de poliacrilamida a 6% e foi corrida uma eletroforese a 35 Watts por 3 horas. A seguir, o gel foi corado com uma solução de prata seguindo protocolo previamente descrito (11).

Identificação do polimorfismo na posição -23 da região 5'

O fragmento de DNA obtido depois da amplificação da região 5' do gene NCF2 foi digerido com a enzima de restrição Mae III, 2 U/µL (Boehringer Mannheim), a 55°C durante 3 horas, em um volume final de 25 µL, em tampão específico (20mM Tris-HCl, 275mM NaCl, 6mM MgCl₂, 7mM 2-mercaptoetanol, pH 8.2). Esta enzima reconhece e corta no sítio GTNAC, onde N significa qualquer nucleotídeo. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose NuSieve (FMC BioProducts, Rockland, Maine) a 2,5%. O gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL), e as bandas foram visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta.

Seqüenciamento enzimático do DNA

As amostras de DNA amplificadas por PCR foram purificadas utilizando o “Concert Rapid PCR Purification System (Life Technologies, Gibco) e seqüenciadas pelo método enzimático de incorporação de dideoxinucleotídeos, utilizando o kit DNA sequencing Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction for ABI 377 (PE/Applied Biosystems). Quando indicado, o fragmento foi subclonado no vetor pBlueScript conforme ensaios padronizados (12). Uma vez obtidas as seqüências alteradas, estas foram comparadas com as seqüências normais a partir dos dados do GenBank.

Estatística

As freqüências dos polimorfismos foram determinadas a partir das leis de Hardy-Weinberg, que são uma extensão das leis Mendelianas e descrevem as freqüências de alelos e de genótipos para populações em equilíbrio gênico. A lei de Hardy e Weinberg estabelece que $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, onde p = freqüência do alelo dominante e q = freqüência do alelo recessivo (13).

RESULTADOS

Transição de C por T na posição -23 da região promotora do gene NCF2

Para determinar a frequência desta substituição, o fragmento de 465 pb que inclui a região 5' promotora do gene, foi obtido do DNA genômico amplificado por meio de PCR, a partir de 100 indivíduos sadios. Esse fragmento foi digerido com a enzima de restrição Mae III, que corta a citosina na posição -23. A figura 1A mostra o padrão de digestão deste fragmento nos diferentes indivíduos. Os homozigotos para o alelo C geraram fragmentos de 138 e 316 pb, os heterozigotos (C/T) geraram fragmentos de 138, 316 e 454 pb.

Embora os indivíduos homozigotos para o alelo referido (C/C) pudessem gerar 3 fragmentos (316, 138 e 11pb), somente dois deles são visíveis, pois o terceiro é muito pequeno para ser observado. Os indivíduos homozigotos para o novo alelo (T/T) devem gerar dois fragmentos (454 e 11pb) e os heterozigotos podem apresentar os 4 possíveis fragmentos.

A análise SSCP do produto de PCR revelou diferentes padrões eletroforéticos para cada genótipo (Figura 1B). Cada produto de amplificação é desnaturado, migra nas suas condições nativas, permitindo observar 3 bandas nos indivíduos heterozigotos e apenas duas nos homozigotos. Para confirmar esses resultados, sequenciamos a região que contém a substituição (Figura 1C). Sessenta e sete dos 100 indivíduos foram homozigotos para C, 32 foram heterozigotos, e somente um deles foi homozigoto para T. As frequências alélicas e fenotípicas são apresentadas na Tabela I.

Transição de A por G na posição -21 do intron 10 (IVS10-21A→G) no gene NCF-2

O ensaio SSCP usando um fragmento de PCR de 200 pb contendo o final 3' do intron 10 foi realizado para identificar a substituição de A por G na posição -21 do intron 10, já que não achamos uma enzima de restrição para a identificação da substituição.

Observamos um padrão de quatro bandas para os indivíduos heterozigotos (G/A), e duas bandas para os homozigotos (A/A) ou (G/G) (Figura 2A). Essa substituição nucleotídea foi confirmada por seqüenciamento, usando o método enzimático de incorporação de dideoxynucleotídeos como mencionado nos materiais e métodos (Figura 2B). Uma completa correlação entre o seqüenciamento e os dados da migração do SSCP foi observada. Dos 114 sujeitos analisados para essa transição nucleotídea, 41% foram homozigotos para A, 49% foram heterozigotos e 24% foram homozigotos para G (Tabela I).

DISCUSSÃO

Somente 2-3% do DNA humano se expressa. Assim, a maior parte do genoma humano não é composto por genes que transcrevem um RNA importante para a produção de uma proteína fundamental. Mutações neste DNA não chegam a ter um efeito no fenótipo do indivíduo e por esse motivo não são eliminadas da população. Em outras palavras, o DNA que não é transcrito está mais sujeito a acumular mutações, constituindo uma grande fonte de variabilidade no DNA dos indivíduos. Estas variações genéticas sem consequências aparentes precisam ser diferenciadas daquelas que causam o aparecimento de doenças genéticas, por afetarem regiões importantes de genes fundamentais para o indivíduo (14).

O objetivo deste trabalho foi determinar a frequência de duas substituições de nucleotídeos localizadas em regiões não transcritas do gene NCF2. Estas regiões são importantes para o começo da transcrição gênica (região 5' reguladora) ou para o splicing do RNA (sequência receptora do intron 10), portanto, uma variação nessas sequências pode resultar numa alteração da expressão gênica, reduzindo a síntese da $p67^{phox}$ e consequentemente diminuindo a atividade microbicida das células fagocíticas.

A transição na posição -23 na região 5' do gene NCF2 foi detectada na maioria dos indivíduos sadios estudados com uma frequência alélica de 17% para o alelo T, o que corresponde a um polimorfismo no gene NCF2. Embora outros polimorfismos tenham sido descritos neste gene (6), a mudança -23C→T é a primeira a ser descrita na região promotora do gene NCF2, e pode ter implicações para o início de sua transcrição.

A eficiência da transcrição está sujeita a regulação por proteínas ativadoras ou supressoras da transcrição. Sugere-se que os fatores de transcrição unidos ao DNA influenciam a transcrição por meio de interação proteína-proteína, com fatores de iniciação geral, resultando na potencialização do recrutamento ou estabilização do complexo do promotor basal ao molde. Um desses ativadores é o Sp1, que se liga às chamadas caixas GC. O Sp1 é universalmente expresso, sendo necessário para a expressão constitutiva e induzível de uma variedade de genes. Outros fatores de transcrição descritos no promotor do gene NCF2 incluem o Sp1/Sp3, PU.1, AP-1, PU.1/HAF1, importantes para a atividade

do promotor (9) (15). Embora o polimorfismo aqui apresentado não esteja localizado em nenhuma sequência reguladora conhecida do promotor do gene NCF2, sua proximidade ao sítio de início de transcrição, sugere que este possa alterar a expressão do RNA.

Também foi investigada a frequência alélica de uma segunda substituição, a transição de A por G na posição -21 (*IVS10-21A → G*) no gene NCF2. Esta alteração pode modificar o splicing do exon 11 neste gene (8). A substituição -21A foi encontrada no “branch acceptor sequence” do intron 10, o qual é necessário para a formação do laço entre a extremo 5' livre e o extremo 3' terminal do intron (16) (17).

Durante o splicing do RNAm, o sítio doador no extremo 5' do intron é cortado por ribonucleoproteínas que geram um exon com um extremo 3' livre e um intron com uma guanina livre no extremo 5'. O grupo fosfato desta guanina livre é esterificado com um grupo hidroxila de uma adenina conservada, localizada na sequência “branch acceptor”, entre os nucleotídeos -18 e -37 do extremo 3' do intron. Estes acontecimentos permitem a formação do laço e o corte do extremo 3' do intron. Simultaneamente com a excisão do intron, ambos os exons são unidos e a sequência do intron é removida (16).

A substituição descrita no intron 10 pode alterar o splicing do RNA do gene NCF2 no intron 10 e no exon 12. Em alguns casos o splicing normal está presente, pois o extremo 5' no intron 10 reconhece o sítio acceptor de splicing no mesmo intron. Entretanto, em outras circunstâncias, a formação do laço ocorre entre o extremo 5' do intron 10 e a sequência acceptora de splicing no intron 11, a qual resulta em exclusão do exon 11. A eliminação deste exon pode mudar o marco de leitura e resultar em uma proteína truncada, como representado na Figura 3.

No grupo de indivíduos sadios analisados para essa transição, 36% foram homozigotos para A, 21% foram homozigotos para G, e o restante foi heterozigoto. Estes dados indicaram uma frequência alélica para G de 42,5%. Como este alelo está presente em quase metade da população sadia, pode ter um papel importante na expressão da *p67-phox*.

Estudos preliminares de nosso grupo indicam que algumas espécies de RNAm não possuem o exon 11 (18). A redução de moléculas de RNAm normais em células que carregam um dos polimorfismos que descrevemos pode diminuir a expressão da *p67-phox*. Entretanto, na maioria dos casos, a redução do número de moléculas de RNAm pode não alterar a função do sistema NADPH oxidase, já que um número reduzido de moléculas de *p67-phox* é suficiente para a ativação completa e normal deste sistema. Porém, estes polimorfismos podem ser deletérios se presentes simultaneamente com mutações no gene, afetando drasticamente a expressão ou a função da proteína *p67-phox* ou de outros genes envolvidos na resposta imune. Além disso, efeitos adicionais ou diferentes destes, podem ser causados por polimorfismos, conduzindo a uma resposta imune anormal em indivíduos normais. Em pacientes que já apresentam resposta imune defeituosa, os efeitos sinérgicos poderiam ser ainda piores (19) (20).

Considerando as frequências alélicas observadas nesta pesquisa, concluímos que essas variantes constituem polimorfismos do gene NCF2. Suas possíveis implicações sobre a expressão do gene NCF2, funcionamento da proteína *p67-phox*, por ele codificada, atividade do sistema NADPH oxidase, por ela integrado, e conseqüentemente sobre a resposta imunológica, constituem objeto de pesquisa atual em nosso laboratório.

Agradecimentos: Os autores agradecem Jussara Rehder e Diana Castaño pela assistência técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chanock SJ, el Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 1994;269(40):24519-22.
2. Curnutte JT. Chronic granulomatous disease: the solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;67(3 Pt 2):S2-15.
3. Smith RM, Curnutte JT. Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 1991; 77(4):673-86.
4. Ezekowitz RA. Update on chronic granulomatous disease: the concept of the near-normal host. *Curr Clin Top Infect Dis* 2000;20:325-34.
5. Lewin. *Genes*. V ed. New York; 1994.
6. Aoshima M, Nunoi H, Shimazu M, Shimizu S, Tatsuzawa O, Kenney RT, et al. Two-exon skipping due to a point mutation in p67-phox--deficient chronic granulomatous disease. *Blood* 1996; 88(5):1841-5.
7. Tanugi-Cholley LC, Issartel JP, Lunardi J, Freycon F, Morel F, Vignais PV. A mutation located at the 5' splice junction sequence of intron 3 in the p67phox gene causes the lack of p67phox mRNA in a patient with chronic granulomatous disease. *Blood* 1995; 85(1):242-9.
8. Patino PJ, Rae J, Noack D, Erickson R, Ding J, de Olarte DG, et al. Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase component p67-phox. *Blood* 1999; 94(7):2505-14.
9. Eklund EA, Jalava A, Kakar R. PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase gp91(phox) expression. *J Biol Chem* 1998; 273(22):13957-65.

10. Hornig H, Aebi M, Weissmann C. Effect of mutations at the lariat branch acceptor site on beta-globin pre-mRNA splicing in vitro. *Nature* 1986; 324(6097):589-91.
11. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5(4):874-9.
12. Condino-Neto A, Newburger PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood* 2000; 95(11):3548-54.
13. Monje S-. *Genética*. Barcelona. España; 1982.
14. Bento S. *DNA segredos e misterios*. 1997.
15. Lania L, Majello B, De Luca P. Transcriptional regulation by the Sp family proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(12):1313-23.
16. Krainer AR MT. *RNA splicing*. washington DC: IRL Press; 1998.
17. Kuivenhoven JA, Weibusch H, Pritchard PH, Funke H, Benne R, Assmann G, et al. An intronic mutation in a lariat branchpoint sequence is a direct cause of an inherited human disorder (fish-eye disease). *J Clin Invest* 1996; 98(2):358-64.
18. Gómez LA RM, Patino PJ, Condino-neto A. A polymorphism in intron 10 of the NCF2 gene leading to alternative splicing. Meeting of the Brazilian Society of Immunology 2003 october 5-8, 2003:153.
19. Foster CB, Lehnbecher T, Mol F, Steinberg SM, Venzon DJ, Walsh TJ, et al. Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1998; 102(12):2146-55.
20. Foster CB, Chanock SJ. Mining variations in genes of innate and phagocytic immunity: current status and future prospects. *Curr Opin Hematol* 2000; 7(1):9-15.

LEGENDAS DAS FIGURAS E TABELA

Figura 1. Transição de C por T na posição -23 da região promotora do gene NCF2

Painel A. Eletroforese dos fragmentos de PCR da região 5' do gene NCF2 digeridos com Mae III. As linhas 1, 3 e 4 mostram o padrão de digestão dos homozigotos para C na posição -23. A linha 2 mostra o heterozigoto (C/T).

Painel B. Análise de SSCP dos fragmentos de PCR da região 5' do gene NCF2 em 9 indivíduos estudados. A concordância desses padrões de migração com os diferentes genótipos na posição -23 do promotor foi confirmada pela digestão com Mae III e seqüenciamento do DNA.

Painel C. Seqüência de DNA da região 5' do gene NCF2 de indivíduos apresentando diferentes genótipos. As setas indicam os nucleotídeos presentes na posição -23

Figura 2. Transição de A por G na posição -21 do intron 10 (IVS10-21A→G) no gene NCF-2.

Painel A. Análise por SSCP da região do intron 10-exon 11 do gene NCF2 de 10 indivíduos sadios. Esse padrão de migração concorda com os diferentes genótipos na posição -21 do intron 10, identificados por sequenciamento do DNA.

Painel B. Seqüência do DNA da região do intron 10-exon 11 do gene NCF2. As setas indicam os nucleotídeos presentes na posição -21 do intron 10.

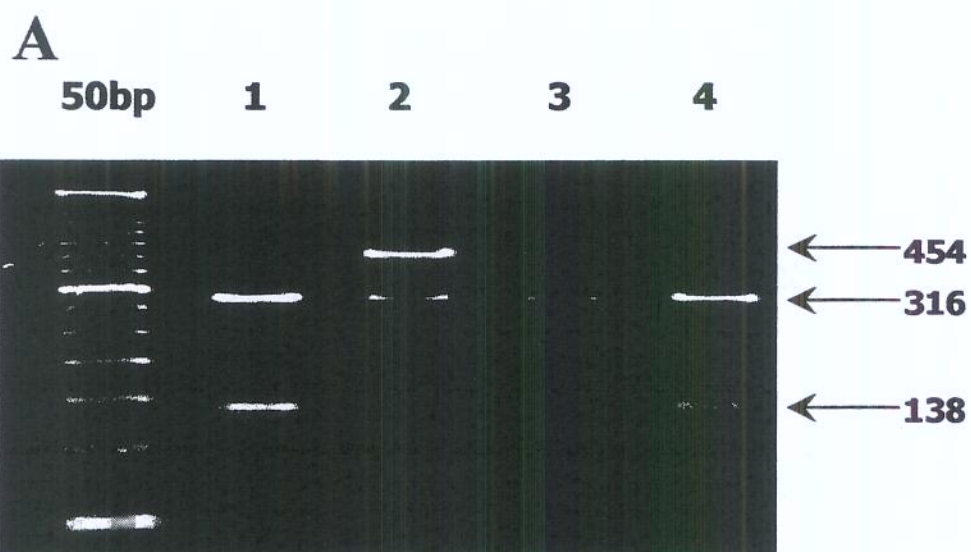
Figura 3. Splicing Alternativo. A transição de A por G na posição -21 do intron 10 (IVS10-21A→G) no gene NCF-2 pode modificar parcialmente o splicing do exon 11 neste gene (8). A posição -21 está localizada na seqüência "branch acceptor" do intron 10, que é necessária para a formação do laço entre a região 5' e o extremo 3' do intron 10.

Tabela I. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos -23C→T e IVS10-21A→G, calculadas por meio da lei de Hardy-Weinberg.

Tabela I

5'-23C→T			IVS10-21A→G	
		No. (frequência)		
Frequências genotípicas	C/C	67 (0.67)	A/A	41 (0.36)
	C/T	32 (0.32)	A/G	49 (0.43)
	T/T	1 (0.01)	G/G	24 (0.21)
Frequências alélicas	C	166 (0.83)	A	131 (0.575)
	T	34 (0.17)	G	97 (0.425)

Figura 1



C

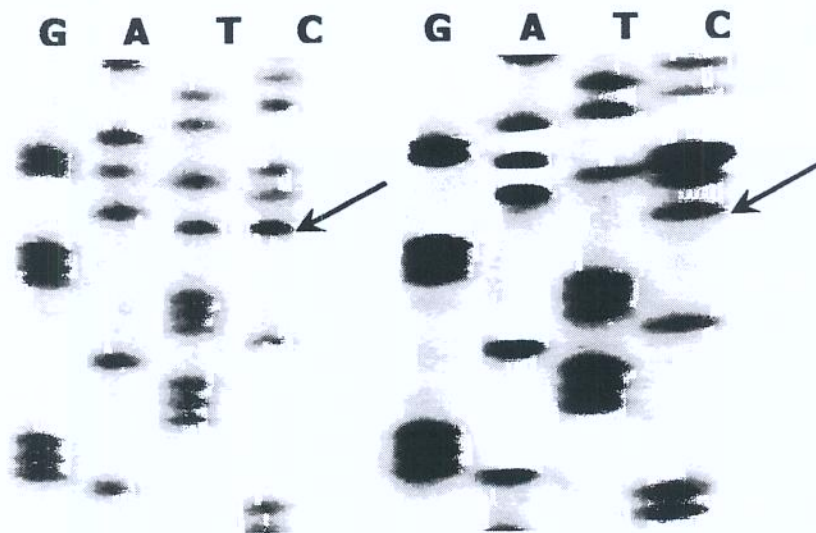
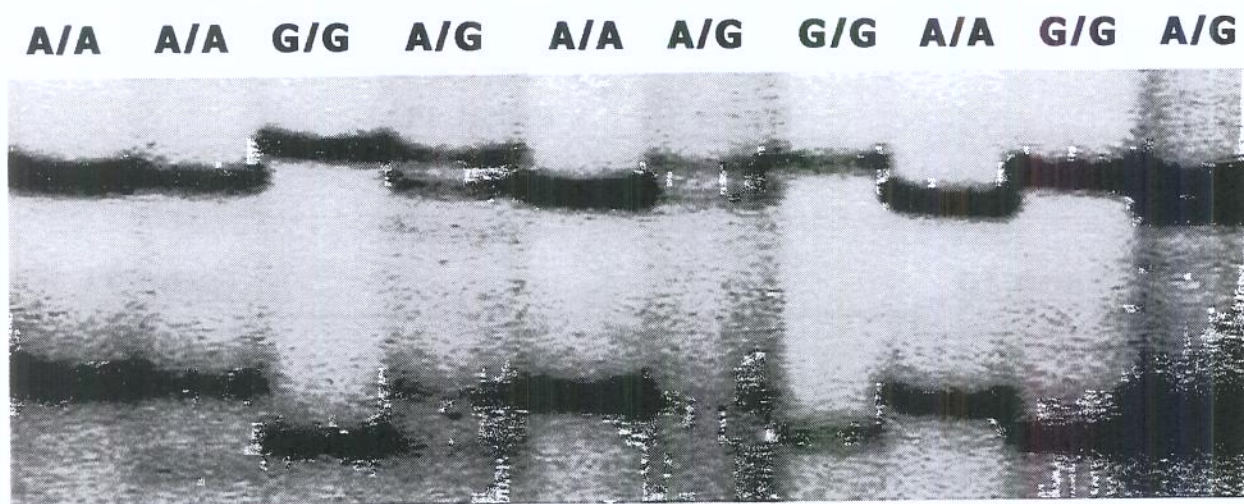


Figura 2

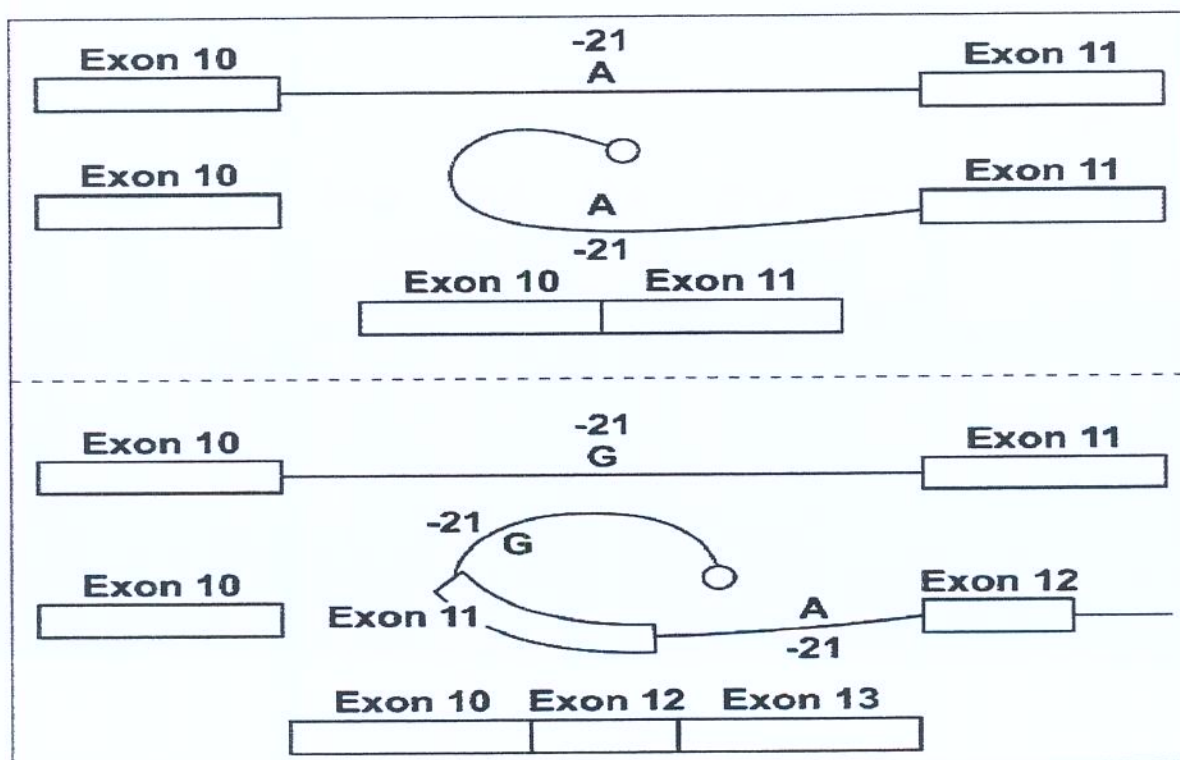
A



B



Figura 3



CAPÍTULO II

A POLYMORPHISM IN THE INTRON 10 BRANCH ACCEPTOR SEQUENCE OF NCF2 GENERATES ALTERNATIVE mRNA SPECIES BUT DOES NOT AFFECT THE EXPRESSION OF p67-PHOX

Submetido.

Lina Andrea Gómez¹, Maria Teresa Rugeles², Pablo Javier Patiño², Antonio Condino-Neto^{1,3}*

1- Department of Pediatrics and Center for Investigation in Pediatrics, State University of Campinas Medical School. Campinas, SP. Brazil.

2- Group of Primary Immunodeficiencies, School of Medicine, University of Antioquia, Medellín, Colombia.

3- Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, SP. Brazil.

Running title: Polymorphism in gene encoding p67-phox

Key words: NCF2 gene, RNA splicing, NADPH oxidase, respiratory burst.

Author for Correspondence:

Antonio Condino Neto, MD, Ph.D

Department of Pediatrics

State University of Campinas Medical School

PO Box 6111. Campinas SP. Brasil. CEP 13081-970

Tel: 55 19 3788-8988. Fax 55 19 3289-8638

E-mail: condino@lexxa.com.br

Support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grants 01/14365-3 and 02/05880-4); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Instituto Colombiano para el Desarrollo Científico y Tecnológico (Colciencias, grant 11115-04-1203), and Universidad de Antioquia.

ABSTRACT

The p67-*phox* protein is an essential component for activating the NADPH oxidase of phagocytes. Mutations affecting this gene lead to an autosomal recessive form of chronic granulomatous disease (CGD), a primary immunodeficiency characterized by recurrent severe infections. We have previously described different nucleotide changes in the NCF2 gene of normal subjects and p67-*phox*-deficient patients. One of the substitutions is an A→G transition in position -21 of the 3' end of intron 10 (IVS10-21A→G), located within the branch acceptor sequence necessary for RNA splicing of the NCF2 gene. In this work we analyzed its occurrence by sequencing genomic DNA of 114 normal subjects and found that 36% were homozygous for A, 43% were heterozygous, and 21% were homozygous for G, showing that this transition corresponds to a polymorphism. We further investigated the cDNA structure of NCF2 gene between exons 9 and 14. The RT-PCR analysis followed by cDNA sequencing revealed complete (452 bp) and alternative (284 bp) products, without exon 11 fragment in all genotypes. The DHR test as assayed by flow cytometry was 99.6% for G/G, 99.45% for A/G and 99% for A/A individuals ($p=0.81$), showing normal respiratory burst activity. The NCF2 gene expression as assayed by real-time PCR was similar among all genotypes ($p=0.937$). We conclude that the IVS10-21A→G transition is a polymorphism of the NCF2 gene, and its location gives rise to alternative splicing without altering gene expression or the respiratory burst activity of normal subjects under specific experimental conditions.

INTRODUCTION

The respiratory burst of phagocytic cells plays an essential role in the innate immune response against pathogenic microorganisms. During this response, phagocytes (monocytes, macrophages, neutrophils and eosinophils) produce high levels of reactive oxygen species (ROS) that act together with the lysosomal enzymes to kill phagocytized microorganisms [1]. Production of ROS depends on the activation of the enzymatic complex NADPH oxidase (phagocyte oxidase), which is located mainly in the phagolysosomal membrane. This enzymatic system takes electrons from the cytosolic NADPH and transfers them in to the phagolysosome in order to reduce oxygen to superoxide anion, thereby initiating the biochemical events leading to microbial death [2]. The phagocyte oxidase is comprised of at least five components. Two of these, gp91-*phox* and p22-*phox*, form the flavocytochrome b₅₅₈, a membrane protein, which appears to carry all of the redox components of the oxidase complex [3]. Other two proteins, p47-*phox* and p67-*phox*, are cytosolic factors required for complete activation of the phagocyte oxidase. A third cytosolic protein, p40-*phox*, is not essential for superoxide generation in a cell free system and might have a regulatory role during the activation of the oxidase [4] [5].

The importance of the phagocyte oxidase for the antimicrobial response is evidenced in patients with chronic granulomatous disease (CGD), a primary immunodeficiency characterized by recurrent and severe infections produced mainly by catalase positive microorganisms [6]. CGD is caused by mutations in any of the genes encoding the major molecules that constitute NADPH oxidase (gp91-, p22-, p47, or p67-*phox*) [7, 8]. Moreover polymorphisms have been reported in CYBB and CYBA genes [9] [10].

We have previously characterized the genetic basis of CGD in 6 patients lacking p67-*phox* (MIM number 233710), one of the less frequent forms of CGD [11]. In addition to the mutations responsible for the CGD phenotype, we have also identified other nucleotide changes in different regions of this gene in CGD patients and in healthy individuals. One of these nucleotide substitutions is an A→G transition at position -21 of

intron 10 (*IVS10-21A→G*), which is located in the branch acceptor sequence, important for intron removal during pre-mRNA splicing.

Our aim was to investigate if this substitution corresponds to a polymorphism of the NCF2 gene, and its possible implications on mRNA splicing, gene expression and respiratory burst activity of phagocytes from normal subjects.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

A total of 114 healthy subjects, 18–40 years old, were screened for the genetic variant in the intron 10 of NCF2 gene. Written consent was obtained according to regulations of the School of Medicine of the University of Antioquia, State University of Campinas Medical School ethics committee, and the Ministry of Health of Brazil resolution 196/96.

Nucleic acid preparation and EBV-B cell transformation

Genomic DNA was prepared from blood samples using a commercial purification kit (Promega, Madison WI). RNA was prepared from EBV-transformed B-lymphocytes by the guanidine HCl method, as previously described [12]. Total or nuclear RNA was reverse transcribed with random hexamers and SuperScrip II RT (Life Technologies, Gibco), according to manufacturer's instructions.

EBV-transformed B cell lines reproduce the biochemical and molecular defects of CGD patients [13], provide an alternative to repeated blood collections from patients, and serve as an abundant source of nucleic acids for molecular studies. To prepare such cell lines, mononuclear cells were cultured with supernatants from B95-8, an EBV-producer cell line, as previously described [14,15,16]. Cellular viability was monitored and the cultures were maintained during the studies. Aliquots of EBV-transformed B cells were frozen in liquid nitrogen for archiving and future studies.

Polymorphism Characterization

Amplification of NCF2 fragments by polymerase chain reaction (PCR)

The sequence corresponding to the NCF2-exon 10 branch point region was amplified from 5µl (1µg/mL) of genomic DNA in 50µL of PCR reaction buffer (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) containing 200µM dNTP mix (Amersham-

Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, England), 2.6 ng/ μ L of each primer, and 2.5 U Taq polymerase (Promega), using a GeneAmp 9600 thermal cycler (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT). The oligonucleotides used for amplifying NCF2 intron10/exon 11 sequences were p67-Ex11LA 5'GTGTTTCCCCACATCCAC3' and p67-Ex11RA 5'CAGGGAGAGGAACTCAGGA3'. The reaction was carried out for 30 cycles at 96°C for 5 s, 60°C for 15 s and 72°C for 30 s, followed by a 7 minutes extension at 72°C.

Identification of single nucleotide substitutions by single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis

The transition at position -21 of intron 10 (21 nucleotides before the last nucleotide of intron 10) was detected in genomic DNA by conformational polymorphism of the PCR-generated fragments [17, 18]. PCR products were resuspended in loading buffer, denatured at 80°C for 2 minutes, subjected to electrophoresis in a 6% non-denaturing polyacrylamide gel and silver stained. The relationship between the altered SSCP profile and the nucleotide substitution was further confirmed by sequencing genomic DNA, revealing homozygous and heterozygous subjects.

DNA sequencing

DNA sequencing was performed using a DNA cycle sequencing system (Promega, Madison, WI). 82.5 ng of oligonucleotide primers p67-Ex9L 5'CCCCACCTTCATCTTCTT 3' and p67-Ex13R 5'TGATCCAGGATGTTGAGAGAA3' were labeled in an 11- μ L reaction containing 1 μ L 32 P γ ATP (adenosine 5'-triphosphate; 22.2×10^{13} Bq/mmol [6000 Ci/mmol]) (DuPont), 1 μ L 10 $\times$ T4 polynucleotide kinase buffer containing 500mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 100mmol/L MgCl₂, 50mmol/L dithiothreitol, 1mmol/L spermidine; and 1 μ L T4 polynucleotide kinase (equal to 1 unit). Amplification reactions were performed for 30 cycles of 96°C for 5 s, 60°C for 15 s and 72°C for 30 s, and the reactions were stopped using sequencing loading dye (10 mM NaOH,

95% deionized formamide, 0.05% bromophenol blue and 0.05% xylene cyanol). PCR products were heated for 2 minutes at 80°C and loaded into polyacrylamide denaturing sequencing gels. Electrophoresis was performed at constant power (55 W) in TBE buffer using an S-2 Sequencing Chamber (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). The gels were dried and exposed overnight at -70°C to BioMax film (Kodak, Rochester, NY). Some sequences were performed using Big Dye Terminator DNA sequencing Kit (Perkin Elmer) and the samples were run on an ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer ABI, CA), with the same primers referred above.

Functional Analysis

Biochemical analysis of the respiratory burst activity

The respiratory burst activity of granulocytes was analyzed by flow cytometry using the dihydrorhodamine assay [19]. In this assay DHR 123 is oxidized to green fluorescent rhodamine by the H_2O_2 . Briefly, 100 μ L of the leukocyte-rich supernatant (10^6 cells) were added into 1 mL of phosphate buffered saline, pH 7.3 (PBS, Dulbecco's Phosphate-buffered Saline, GIBCO) with 9.9 μ M/mL dihydrorhodamine (DHR 123 Molecular Probes) and incubated 10 min at 37°C. The respiratory burst was induced with 110 μ L phorbol ester phorbol-myristate-acetate (PMA, 0.4 μ g/mL, Sigma). The samples were incubated for additional 15 min at 37°C, put on ice to stop the reaction and subsequently analyzed by flow cytometry using the blue-green excitation light (488 nm argon-ion laser) using a flow cytometer (EPICS XL, Coulter, Miami, FL). The respiratory burst was evaluated in both homozygous and heterozygous individuals.

Splicing analysis

The cDNA sequence spanning the region between exons 9 and 14 in normal and alternative transcripts were investigated using primers described in Table I. Primers 1 and 2 were used to amplify the cDNA region between exons 9 and 14.

Alternative transcripts were analyzed using primers 1, 2 and 3 as illustrated in Figure 1. The PCR was carried out for 30 cycles at 96°C for 5 s, 60°C for 15 s, and 72°C for 30 s, followed by a 7 minutes extension at 72°C. Products were resolved in agarose gel electrophoresis, purified from gel using the Qiaquick Spin PCR Purification Kit (Qiagen) and cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega) according to manufacturer instructions. Sequence was performed using Big Dye Terminator DNA sequencing Kit (Perkin Elmer) and the samples were run on an ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer ABI, CA) and used the oligonucleotide primers p67-Ex9L (5' CCCCACCTTCATCTTCTT 3') and p67-Ex13R (5' TGATCCAGGATGTTGAGAGAA 3').

Gene Expression

Gene expression of normal transcripts were assayed by real-time PCR using SYBR Green Real Time PCR System (Applied Biosystems). Each 25 µL PCR mix contained 7.9 µL Sybr® Green Master Mix (1X Sybr® Green Buffer, 3 mM MgCl₂, 200 nM dNTP blend, 0.63 U Amplitaq Gold®, 0.25 U AmpErase® (UNG), 600 nmol forward primer NCF2cDNAEX16 5' TTCCCTTTGCACTCCCCTT 3', 600 nmol reverse primer NCF2cDNAEx15 5'GAGGCTACCCAACCAGAGGAC 3' and 12 ng/µL cDNA. Cycle conditions for the ABI 5700 were 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes and 35 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 minute. After the 35 cycles, a dissociation curve (melting curve) was generated in the range of 60°C to 95°C. β actin was used to normalize the amount of template for each wild type. The reactions were run in triplicate and the results averaged on a log scale. Standard curves for each amplification product were generated from 10-fold dilutions of pooled cDNA to determine primer efficiency.

Statistic Analysis

The SAS System for Windows software 6.12 (SAS Institute, 1989-1996, Carry, NC, USA) was used for statistical analysis. The polymorphism's frequencies were determined by the Hardy-Weinberg equilibrium [20]. The Kruskal-Wallis test was used for comparisons among groups [21, 22].

RESULTS

Transition A to G at position -21 of intron 10 (IVS10-21A→G) of NCF2 gene

The SSCP assay detected the -21 A to G substitution in intron 10 (Figure 2A). This nucleotide substitution was confirmed by DNA sequencing (Figure 2B). There was a complete correlation between sequencing data and SSCP migration pattern. From 114 subjects, 41 were homozygous for A, 49 were heterozygous and 24 were homozygous for G (Table II), leading to allelic frequencies of 57.5% for A and 42.5% for G, confirming a polymorphism of the NCF2 gene.

Analysis of the p67-phox cDNA

The region between exons 9 and 14 containing 507 pb was amplified by PCR with primers p67-835LcDNA and p67-1320RcDNA. The fragment corresponding to an alternative transcript without exon 11 (284 pb) was amplified in the same reaction using p67cDNAEx10-12L and p67-1320RcDNA primers. This analysis was performed in four different individuals carrying each genotype. We observed generation of normal and alternative transcripts in all subjects. Sequencing of this p67-phox cDNA region corroborated these data (Figure 3).

Respiratory Burst Activity and Gene Expression

The DHR test revealed the percentage of cells showing a positive respiratory burst activity. It was 99.6% for G/G individuals, 99.45% for A/G and 99% for the A/A individuals ($p=0.81$, Kruskal-Wallis Test). The intensity mean fluorescence (IMF) range for G/G, A/G, and A/A groups were respectively: 4.57-79.3, 10.20-94.2 and 3.48-77.7 ($p=0.6634$, Kruskal-Wallis Test). These results indicated that there were no statistical differences among these groups.

The gene expression analysis of the NCF-2 was assayed by real time PCR. The representative amplification plot of NCF-2 was similar to standard curves obtained from β actin. Calibration curves were generated from serial dilutions of the external standard cDNAs. The calibration curves were linear as shown by a significant correlation coefficient (R^2 value) of 0.99. Gene expression of the A/A genotype was used as a reference for comparing the A/G and G/G genotypes. Gene expression among the subjects carrying the three genotypes did not show any significant statistical difference ($p=0.937$, Kruskal-Wallis test) (Figure 4).

DISCUSSION

We investigated the allelic frequency of a nucleotide change, the A to G transition at position -21 of intron 10 (*IVS10-21A→G*), in the NCF-2 gene; 36% of healthy individuals were homozygous for A, 21% were homozygous for G and the remaining were heterozygous, which indicates an allelic frequency for G of 42.5%, compatible with a polymorphism.

Initially, we determined the respiratory burst activity of granulocytes from subjects with different genotypes in response to PMA. Although these cells showed a similar behavior among genotypes, subtle alterations may be present and we cannot rule out the possibility of distinct responses to other physiologic stimuli.

Given that this allele is present in almost half of the healthy population, we investigated if this nucleotide transition influences *p67-phox* expression. We have previously reported that a variant splicing of exon 11 may occur in this gene [11]. The -21A is placed in the branch acceptor sequence of intron 10, which is necessary for lariat formation between the free 5' and 3' ends of intron 10. During pre-mRNA splicing, the donor site at the 5' end of the intron is cut by the ribonucleoproteins that constitute the spliceosome, which produces an exon with a free 3' end and an intron with a free guanine nucleotide at its 5' end. The phosphate group of this free guanine is esterified with a hydroxyl group from a conserved adenine located at the branch acceptor sequence among nucleotides -18 and -37 of the 3' end of the intron. This event allows the formation of a RNA lariat that is important for positioning the ribonucleoprotein machinery so it can identify and cut the 3' end of this intron. Simultaneously with the intron excision, both exons are joined and the intron sequence is spliced out [23] (Figure 5).

To investigate the presence of alternative splicing, we amplified segments of cDNA that cover exon 9 to exon 13 of NCF-2 gene, and two different transcripts were detected. Some species of mRNA in these healthy individuals did not include exon 11.

Modifications in regions that determine the splicing of pre-mRNA may exert different effects on the mRNA and protein products of the gene. Commonly, alternative splicing patterns determine the inclusion of a portion of coding sequence in the mRNA,

giving rise to protein isoforms that differ in their peptide sequence and hence in the structure and biological activity. Estimates of the minimum number of human gene products that undergo alternative splicing are as high as 60%. Particular pre-mRNAs often show multiple positions of alternative splicing, giving rise to a family of related proteins from a single gene [24, 25]. Changes in the splice site choice can have different effects on the encoded protein. Genetic switches based on alternative splicing are important in many cellular and developmental processes and errors in splicing regulation have been implicated in a number of different disease states [26].

In higher eukaryotic organisms, the branch acceptor sequence is not highly conserved and mutations in this sequence lead to the use of cryptic branch points that ultimately result in a reduced rate of splicing [27, 28]. A study demonstrated that different nucleotide substitutions affecting conserved A in the branch acceptor sequence of the large rabbit β -globin gene led to a 50% reduction in the rate of splicing as compared to wild type [29]. In this model, the mutated branch point would still allow for normal splicing when A was replaced with C, whereas G or U inhibited the normal splicing pattern. Furthermore, an association between mutations in the branch acceptor sequence and human diseases has been recently described [30, 31, 32].

The NCF2-intron 10 nucleotide substitution described here resulted in alternative NCF2 RNA splicing events in intron 10 and exon 11. In most of the cases normal splicing took place because the 5' end of the intron 10 recognizes the branch acceptor site of the same intron; however, in some circumstances the lariat formation occurred between the 5' end of intron 10 and the branch acceptor sequence of intron 11, which caused exon 11 to be skipped during the mRNA splicing. The elimination of this exon could lead to a frame shift in the open reading frame and result in a truncated protein. However we found that the presence of this nucleotide transition did not alter the splicing pattern of NCF2 gene. With A or G in position -21 we still observed two cDNA species, one normal and an alternative without exon 11.

The lack of a strong dependence on a particular sequence at the site of branch formation in mammals suggest that the site of branch formation is probably specified in large part by the structure of the multicomponent complex that forms the precursor RNA,

or the role of the branch site is to supply a reactant, the 2' hydroxyl group, in the cleavage reaction at the 5'splice site, while other sequences provide the specificity. Therefore a consensus sequence at the branch site can facilitate the reaction but is not essential for splicing [33].

A reduction in the number of normal mRNA molecules in cells carrying the single nucleotide polymorphism that we described may not alter the function of the NADPH oxidase system, because even a reduced number of p67-*phox* molecules are sufficient for a normal activation of this system [26]. In some circumstances, these types of polymorphisms may be deleterious if they are present simultaneously with gene mutations affecting the expression or function of p67-*phox* or other genes involved in the immune response. Similarly, additive effect of these and other single nucleotide polymorphisms can lead to abnormal immune responses in otherwise healthy individuals. In patients already presenting defective immune responses, the synergistic effect can be even more severe [23] [34].

When we analyzed the NCF-2 expression for each genotype, we did not observe any association between genotype and intensity of gene expression. However, differences exist among individuals, therefore, for a given population, polymorphisms may act as susceptibility genes and have moderate effects in the clinical expression of the diseases [35,36]. It is possible that subtle changes of expression, which have little or no effect in the general population, could assume greater significance in individuals with defects in host defense systems, such as CGD.

REFERENCES

1. Karlsson, A. and C. Dahlgren, *Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes*. Antioxid Redox Signal, 2002. 4(1): p. 49-60.
2. Nathan, C. and M.U. Shiloh, *Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(16): p. 8841-8.
3. Chanock, S.J., et al., *The respiratory burst oxidase*. J Biol Chem, 1994. 269(40): p. 24519-22.
4. Segal, B.H., et al., *Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease*. Medicine (Baltimore), 2000. 79(3): p. 170-200.
5. Babior, B.M., *NADPH oxidase: an update*. Blood, 1999. 93(5): p. 1464-76.
6. Ezekowitz, R.A., *Update on chronic granulomatous disease: the concept of the near-normal host*. Curr Clin Top Infect Dis, 2000. 20: p. 325-34.
7. Goldblatt, D. and A.J. Thrasher, *Chronic granulomatous disease*. Clin Exp Immunol, 2000. 122(1): p. 1-9.
8. Noack, D., et al., *A second case of somatic triple mosaicism in the CYBB gene causing chronic granulomatous disease*. Hum Genet, 2001. 109(2): p. 234-8.
9. Kuribayashi, F., et al., *A novel polymorphism in the coding region of CYBB, the human gp91-phox gene*. Hum Genet, 1996. 97(5): p. 611-3.
10. Moreno, M.U., et al., *Preliminary characterisation of the promoter of the human p22(phox) gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension*. FEBS Lett, 2003. 542(1-3): p. 27-31.

11. Patino, P.J., et al., *Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase component p67-phox*. Blood, 1999. 94(7): p. 2505-14.
12. Subrahmanyam, Y.V., et al., *A modified method for the display of 3'-end restriction fragments of cDNAs: molecular profiling of gene expression in neutrophils*. Methods Enzymol, 1999. 303: p. 272-97.
13. Volkman, D.J., et al., *B cell lines as models for inherited phagocytic diseases: abnormal superoxide generation in chronic granulomatous disease and giant granules in Chediak-Higashi syndrome*. J Immunol, 1984. 133(6): p. 3006-9.
14. Condino-Neto, A. and P.E. Newburger, *NADPH oxidase activity and cytochrome b558 content of human Epstein-Barr-virus-transformed B lymphocytes correlate with expression of genes encoding components of the oxidase system*. Arch Biochem Biophys, 1998. 360(2): p. 158-64.
15. Condino-Neto, A., et al., *Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide*. Br J Clin Pharmacol, 1993. 35(5): p. 485-90.
16. Nilsson, K., et al., *The establishment of lymphoblastoid lines from adult and fetal human lymphoid tissue and its dependence on EBV*. Int J Cancer, 1971. 8(3): p. 443-50.
17. Sekiya, T., *Detection of mutant sequences by single-strand conformation polymorphism analysis*. Mutat Res, 1993. 288(1): p. 79-83.
18. Orita, M., et al., *Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction*. Genomics, 1989. 5(4): p. 874-9.
19. Emmendorffer, A., et al., *Evaluation of flow cytometric methods for diagnosis of chronic granulomatous disease variants under routine laboratory conditions*. Cytometry, 1994. 18(3): p. 147-55.

20. Martin, R.C., et al., *Method for determination of (-102C>T) single nucleotide polymorphism in the human manganese superoxide dismutase promoter*. BMC Genet, 2004. 5(1): p. 33.
21. Milliken G.A, J.D.E., *Analysis of Messy Data*. 1984, New York: Van Nostrand Renhold Company.
22. DC, M., *Desing and Analysis of Experiments*, ed. T. Edition. 1991, New York: John Wiley Sons.
23. Krainer AR, M.T., *RNA splicing*. 1998, washington DC: IRL Press. 131-205.
24. Colgan, D.F. and J.L. Manley, *Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation*. Genes Dev, 1997. 11(21): p. 2755-66.
25. Lewin, *Genes*. V ed. 1994, New York.
26. Black, D.L., *Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing*. Annu Rev Biochem, 2003. 72: p. 291-336.
27. Ruskin, B., J.M. Greene, and M.R. Green, *Cryptic branch point activation allows accurate in vitro splicing of human beta-globin intron mutants*. Cell, 1985. 41(3): p. 833-44.
28. Padgett, R.A., et al., *Nonconsensus branch-site sequences in the in vitro splicing of transcripts of mutant rabbit beta-globin genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(24): p. 8349-53.
29. Hornig, H., M. Aebi, and C. Weissmann, *Effect of mutations at the lariat branch acceptor site on beta-globin pre-mRNA splicing in vitro*. Nature, 1986. 324(6097): p. 589-91.
30. Janssen, R.J., et al., *A branch site mutation leading to aberrant splicing of the human tyrosine hydroxylase gene in a child with a severe extrapyramidal movement disorder*. Ann Hum Genet, 2000. 64(Pt 5): p. 375-82.

31. Kuivenhoven, J.A., et al., *An intronic mutation in a lariat branchpoint sequence is a direct cause of an inherited human disorder (fish-eye disease)*. J Clin Invest, 1996. 98(2): p. 358-64.
32. Zhu, X., et al., *Coexpression of normal and mutated CD40 ligand with deletion of a putative RNA lariat branchpoint sequence in X-linked hyper-IgM syndrome*. Clin Immunol, 2001. 99(3): p. 334-9.
33. Rautmann, G. and R. Breathnach, *A role for branchpoints in splicing in vivo*. Nature, 1985. 315(6018): p. 430-2.
34. Foster, C.B. and S.J. Chanock, *Mining variations in genes of innate and phagocytic immunity: current status and future prospects*. Curr Opin Hematol, 2000. 7(1): p. 9-15.
35. Foster, C.B., et al., *Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease*. J Clin Invest, 1998. 102(12): p. 2146-55.
36. Geraghty, D.E., *Genetic diversity and genomics of the immune response*. Immunol Rev, 2002. 190: p. 5-8.

Legends to Figures and Tables

Table I. Primers used for splicing analysis. Primers 1 and 2 were used to amplify the cDNA corresponding to sequence between exons 9 and 14; alternative transcripts were analyzed using primers 1, 2 and 3.

Table II. Genomic and allelic frequencies for the IVS10-21 A→G polymorphism. Of 114 healthy subjects analyzed for this nucleotide transition, 41 were homozygous for A, 49 were heterozygous and 24 were homozygous for G. The polymorphisms' frequencies were determined by the Hardy- Weinberg equilibrium.

Figure 1. Schematic representation for detection of principal and alternative splice transcripts. The localization of PCR primers is indicated. Primer combinations and length of resulting PCR fragments are 452 bp for principal transcript and 284 for the alternative splice transcript.

Figure 2. Transition A to G at position -21 of intron 10 (IVS10-21A→G) of NCF2 gene.

A. SSCP analysis of the intron 10 – exon 11 region of the NCF2 gene in 5 healthy subjects. These migration profiles were consistent with the different genotypes in position -21 of intron 10 identified by DNA sequencing.

B. DNA sequence of the intron 10 – exon 11 region of the NCF2 gene shows the alleles identified in healthy controls. Arrows indicate nucleotides present at position -21 of intron 10.

Figure 3. Sequence analysis of the p67-phox cDNA

A. To corroborate those both normal and abnormal sequences were present, we amplified the NCF2 cDNA with the conventional primers (p67-835LcDNA, p67-1320RcDNA) and with the forward primer p67Ex10-12LcDNA plus p67-1320RcDNA. The presence of both

sequences in subjects carrying the different genotypes was observed. The transcripts with exon 11 have 507 pb while the transcript without exon 11 has 284 pb.

B. The PCR products were purified from gel and sequenced using Big Dye Terminator DNA sequencing kit (Perkin-Elmer). The generation of alternative transcripts without exon 11 was observed in the all genotypes.

Figure 4. Real Time PCR Analysis of NCF2 gene was made using cDNA from individuals with A/A, A/G, and G/G genotypes; there were no statistical differences in NCF2 gene expression among genotypes ($p=0.937$, Kruskal-Wallis test).

Figure 5. Structure of p67-*phox* cDNA in healthy donors.

The upper panel of the figure shows the normal splice events for in exon 10–intron 10– exon 11 region. The lower panel shows a schematic representation of the alternative splicing produced by the substitution in the branch point sequence of intron 10.

Table I

PCR oligonucleotide primers used for splicing analysis

1. p67-835L	5'AGAAGAGCTCCAGGTCATG 3'
2. p67-1320R	5'CACAGAGTCAGGCAGTAGTTT 3'
3. p67Ex10-12L	5' GCAGCCCCAGGCCAGAAA 3'

Table II

Genotypic and allelic frequencies for the IVS10-21 A→G polymorphism		
		IVS10-21A→G
		No. (frequency)
Genotypic Frequencies	A/A	41 (0.36)
	A/G	49 (0.43)
	G/G	24 (0.21)
Allelic Frequencies	A	131 (0.575)
	G	97 (0.425)

Figure 1

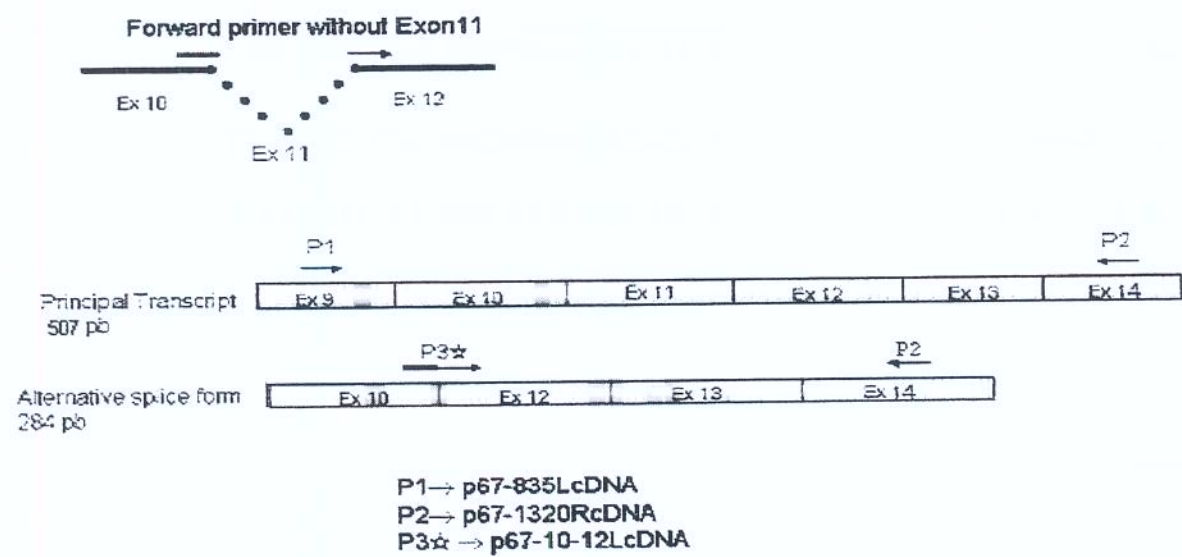
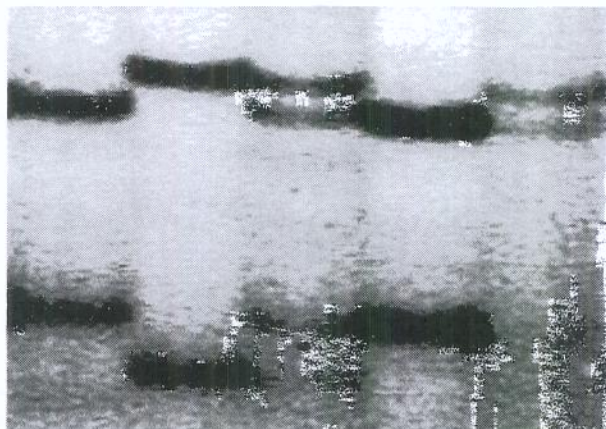


Figure 2

A

A/A G/G A/G A/A A/G



B

GATC GATC GATC GATC GATC



B

100bp

A/A

A/G

G/G

Mass Ladder

452 bp

284 bp

B

Exon 10

Exon12

931 1068

C C C T ⁹⁰ C C A C C C C C A ¹⁰⁰ C C C C X C A A X C A A

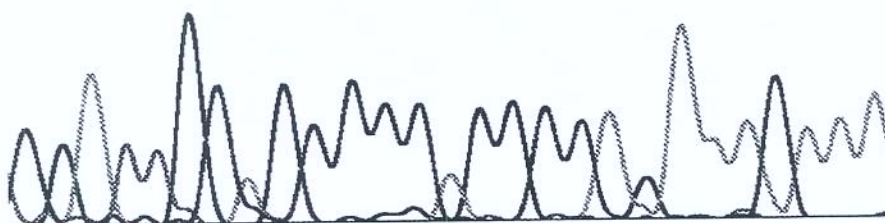


Figure 4

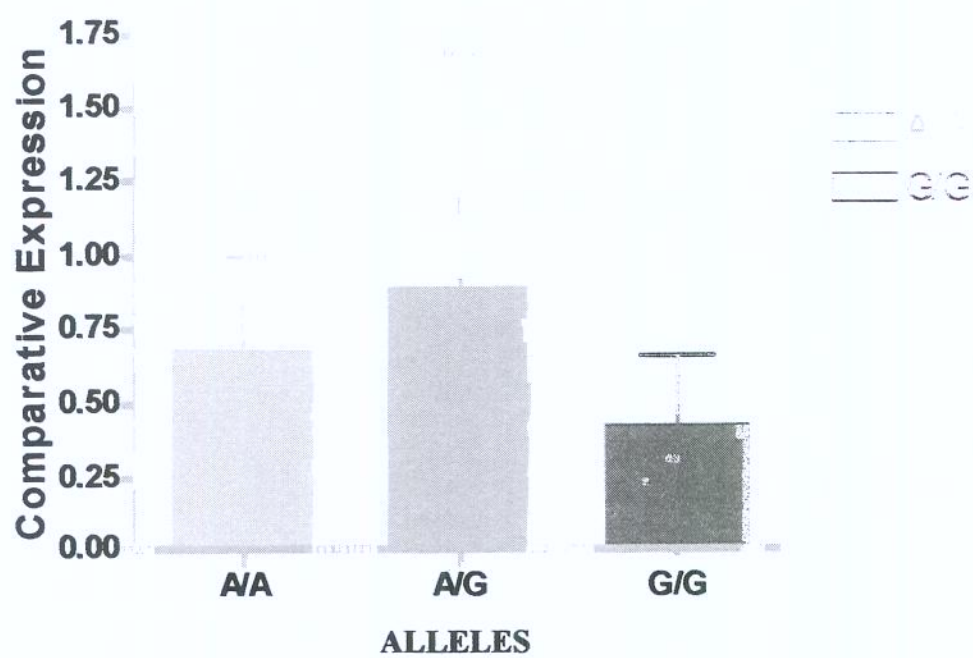


Figure 5

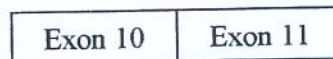
Normal RNA Splicing



RNA Splicing



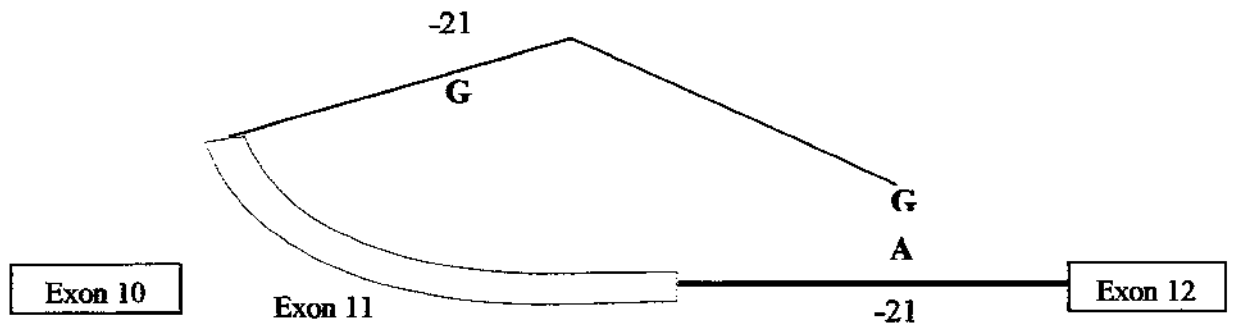
cDNA



Alternative Splicing



RNA Splicing



cDNA



CAPÍTULO III

IDENTIFICATION OF A NEW SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN THE PROMOTER OF THE NCF-2 GENE

Lina Andrea Gómez¹, Pablo Javier Patiño², Horacio Javier Novaira³, Marcelo Marcos Morales³, Antonio Condino-Neto¹

- 1- Department of Pediatrics, Center for Investigation in Pediatrics, State University of Campinas Medical School. Campinas, São Paulo, Brazil.
- 2- Group of Primary Immunodeficiencies, School of Medicine, University of Antioquia, Medellín, Colombia.
- 3- Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo 01/14365-3 e 02/05880-4, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Colombiano para el Desarrollo Científico y Tecnológico (Colciencias, Project # 1115-04-12013) and Universidad de Antioquia.

Author for Correspondence:

Antonio Condino Neto, MD, Ph.D
Department of Pediatrics
State University of Campinas Medical School
PO Box 6111. Campinas SP. Brasil. CEP 13081-970
Tel: 55 19 3788-8988. Fax 55 19 3289-8638
E-mail: condino@iexxa.com.br

Running title: Polymorphism in gene encoding p67^{phox}

Key words: NCF2 gene, SNPs, promoter sequence, phagocytes, chronic granulomatous disease

ABSTRACT

Objectives: NADPH oxidase plays an essential role during the innate immune response against a high number of microorganisms. A defect in one of the components of NADPH oxidase produces chronic granulomatous disease (CGD), a rare inherited immunodeficiency characterized by severe and recurrent infections. Mutations in NCF-2 that encodes p67^{phox}, one of the components of this oxidase, result in an autosomal recessive form of CGD. Besides mutations responsible for CGD, we have previously identified some nucleotide changes in NCF-2 gene that apparently were not responsible for the CGD phenotype, one of these was the transition C → T at position -23 of the promoter region. To determine if this substitution corresponds to a genetic polymorphism, we analyzed its occurrence in the general population and possible implications for the expression of the NCF-2 gene.

Methods: The frequency of the transition C → T at position -23 of the 5' regulatory region was investigated in 100 healthy individuals. The NCF-2 gene fragment from genomic DNA was amplified by PCR with specific primers. This substitution was detected in genomic DNA by digestion with Mae III, also by conformational polymorphism analysis of PCR-generated fragments (SSCP), and confirmed by DNA sequencing. Genotypes and allelic frequencies were calculated by the Hardy-Weinberg equation. To analyze gene expression luciferase reporter gene assay was used.

Conclusions: We conclude that this substitution corresponds to polymorphism of NCF2 gene, and granulocytes with this transition show normal gene expression.

INTRODUCTION

The NADPH oxidase is a multi-protein enzyme complex that plays an essential role in host defense [1]. It is expressed in neutrophils, eosinophils, and mononuclear phagocytes, and catalyzes the transfer of electrons from NADPH to oxygen, resulting in formation of superoxide anion (O_2^-) [2]. O_2^- is rapidly converted to secondary toxic oxygen species, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), and hydroxyl radical (OH), which can kill microorganisms[3]. Moreover, the activation of this enzymatic system produces several electrochemical changes inside of the phagolysosoma, which allow the activation of bactericidal enzymes released from granule [4, 5]. The relevance of the NADPH oxidase is demonstrated by chronic granulomatous disease, a rare inherited disorder characterized by recurrent infections due to a failure of phagocytic leukocytes to produce reactive oxygen species [6].

The phagocyte oxidase consists of four components that are essential for its activity: the heterodimeric membrane-associated flavocytochrome b_{558} protein, composed of gp91^{PHOX} and p22^{PHOX}, the cytosolic components p47^{PHOX}, p67^{PHOX}, and 40^{PHOX} [7] and the small GTPases Rac1 or Rac2 [8]. During activation, the cytosolic oxidase proteins translocate to the membrane and associate with flavocytochrome b_{558} for complete activation of the phagocyte oxidase [9].

One of the essential components of this system is a 67 kDa cytosolic protein named p67^{PHOX}. The gene that encodes p67^{PHOX} (NCF-2) is located in chromosome 1q25, spans 40 Kb and contains 16 exons. A genetic alteration involving p67^{PHOX} gene results in an autosomal recessive form of chronic granulomatous disease (CGD) [10].

We have recently described different single nucleotide changes in some p67-deficient patients that apparently were not responsible for the CGD phenotype, but they could modify in some extent the gene expression [11]. In order to define if one of these changes corresponds to a polymorphism of the p67^{PHOX} gene we analyzed their presence in normal individuals. The substitution is a C→T transition at position -23 of the 5' regulatory region of the gene. This region is important starting transcription (5' regulatory region). Therefore, variations in this sequence might result in altered gene

expression, reduced p67^{PHOX} synthesis and finally a decreased ability of phagocytic cells to produce reactive oxygen species.

The aim for this work was to determine the frequency of this single nucleotide substitution located in the promoter region of the NCF2 gene, as well as to investigate its possible functional effects regarding gene expression.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The study population consisted of 100 healthy subjects, 18-40 years old, males and females. Venous peripheral blood was drawn in heparinized tubes and analyzed for the presence of the possible polymorphism in the NCF-2 gene and functional experiments. Written consent was obtained according to regulations of the School of Medicine of the University of Antioquia, State University of Campinas Medical School ethics committee, and the Ministry of Health of Brazil resolution 196/96.

Amplification of NCF2 fragments by polymerase chain reaction (PCR)

Genomic DNA was isolated from mononuclear cells using a commercial Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI). For each sample 5 µL of gDNA was amplified in 50 µL reaction buffer containing 1X PCR buffer (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 200 µM dNTP mix (Amersham-Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, England), 2.6 ng/µl of each primer, and 2.5 U Taq polymerase (Promega), using a GeneAmp 9600 thermal cycler (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT). The synthetic oligonucleotides used for amplifying of the 5' regulatory region of NCF2 gene were p67-5'LB 5'ACCTCTGGCTGGTGACAC3' and p67-Ex1RB 5'CCTCCCTGGTGATAATGACA3'. The reaction was carried out for 30 cycles at 96°C for 5 s, 60°C for 15 s and 72°C for 30 s, followed by a 7 minutes extension at 72°C.

Identification of the nucleotide transition in the p67^{PHOX} promoter

In order to identify the nucleotide placed at position -23 (23 nucleotides before transcription start site in exon 1) of the 5' promoter region in the NCF-2 gene we used the restriction endonuclease Mae III. This enzyme recognizes and cuts the sequence GTNAC. Twenty-five µL of the PCR fragment obtained with primers p67-5'LB and p67-Ex1RB

were precipitated in sodium acetate followed by digestion with 2 U of Mae III (Boehringer Mannheim) at 55°C for 3 hours. The digestion fragments were resolved in a 2.5% NuSieve (FMC BioProducts, Rockland, Maine) agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized by UV transillumination.

Identification of single nucleotide substitutions by single-strand conformation polymorphism analysis

To evaluate the sensitivity of SSCP to determine SNPs, the transition at 5' regulatory region of NCF2 gene was detected in some of the individuals by single-strand conformational polymorphism (SSCP) of the PCR-generated fragments from genomic DNA [12, 13]. PCR products were resuspended in loading buffer, denatured at 80°C/2 min, subjected to electrophoresis in a 6% non-denaturing polyacrylamide gel and the DNA bands were revealed by silver staining. To confirm the relationship between the abnormal SSCP profile and the nucleotide substitution, genomic DNA fragments from homozygous and heterozygous subjects were sequenced.

DNA sequencing

DNA sequencing was performed using a DNA cycle sequencing system (Promega, Madison, WI). 82.5 ng of oligonucleotide primers p67-5'LB and p67-Ex1RB were labeled in an 11-μL reaction containing 1μL ³²P ATP (adenosine 5'-triphosphate; 22.2×10¹³ Bq/mmol [6000 Ci/mmol]) (DuPont), 1μL 10×T4 polynucleotide kinase buffer containing 500mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 100mmol/L MgCl₂, 50mmol/L dithiothreitol, 1mmol/L spermidine; and 1μL T4 polynucleotide kinase (equal to 1 unit). Amplification reactions were performed for 30 cycles of 96°C for 5 s, 60°C for 15 s and 72°C for 30 s, and the reactions were stopped using sequencing loading dye (10 mM NaOH, 95% deionized formamide, 0.05% bromophenol blue and 0.05% xylene cyanol). PCR products were heated for 2 minutes at 80°C and loaded into polyacrylamide denaturing sequencing gels. Electrophoresis was performed at constant power (55 W)

in TBE buffer using an S-2 Sequencing Chamber (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). The gels were dried and exposed overnight at -70°C to BioMax film (Kodak, Rochester, NY). Some sequences were performed using Big Dye Terminator DNA sequencing Kit (Perkin Elmer) and the samples were run on an ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer ABI, CA), with the same primers referred above.

Mutagenesis of promoter human NCF-2 gene

In order to investigate the effect of this polymorphism in the promotor region, we used the clone 985-4 (that include the region of polymorphism). This fragment was cloned into the pGL3-Basic Luciferase Vector (Promega), this construct was kindly provided by Robert Clark and Li Sen-Li from the University of Texas Health Science Center at San Antonio (UTHSCSA). A site-directed mutagenesis Kit (Quik-Change, Stratagene, La Jolla, CA) was used to generate the mutant sequence. The mutagenic primers were: p67prmL: 5'GTTCTCACTCTAGGTCACCGGGTTTCATTGAGGACC 3', p67promR: 5'GGTCCCAAATGAAACCCGTGACCTAGAGTGAGAAC 3'. All constructs were confirmed by restriction mapping and sequencing.

Transient transfection and luciferase activity

To investigate if C to T substitution had an effect on gene expression, transfection experiments on HL-60 cells were carried out harvested by centrifugation and re-suspended with RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (GIBCO, N.Y., USA). Transient transfection for electroporation was performed in 7×10^6 cells suspended in 0.3 mL (per cuvette) of this medium with 1,25% final concentration dimethyl sulfoxide (DMSO) (Melkonyan et al, 1996) with pGL3-985/-4sm luciferase (firefly) reporter plasmid or pGL3-985/-4mut luciferase (firefly) reporter plasmid or N-terminal fluorescent protein vector, pEGFP-N1 (for control of transfection efficiency, CLONTECH, Palo Alto, CA).

A total of 30 µg of each plasmid DNA were added per cuvette, and the mixture was incubated for 1 min at room temperature and electroporated with a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad) at 290 V and 950 µF (Melkonyan et al, 1996). Immediately after the pulse, transfected cells from one cuvette were placed on 6 mL of pre-warmed RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum and 1.25% DMSO and divided in two wells. After 24h incubation at 37°C the cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and then lysated in 250 µl (per well) with lysis buffer (25mM gly-gly, 15mM MgSO₄, 4mM EGTA, Triton X (25%) and 2mM DTT) for 20 min at room temperature. Luciferase activity was quantified using 200 µl of cell lysate, 100 µl of D-luciferin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) and 100 µl of luciferase assay buffer (25mM gly-gly, 15mM MgSO₄, 4mM EGTA, 15mM KH₂PO₄, 6mM ATP and 3mM DTT) per sample. Light emission was detected using a TD-20/20 Luminometer (Turner Designs) for 30 seconds at room temperature. Gene transfer efficiency was examined under an inverted fluorescent microscope (Axiovert 135, Zeiss) where the transfected cells exhibiting a green cytoplasm fluorescence were detected [14].

Biochemical analysis of the respiratory burst activity

The respiratory burst activity of granulocytes was analyzed by flow cytometry using the dihydrorhodamine assay [15]. In this assay DHR 123 is oxidized to green fluorescent rhodamine by the H₂O₂. Briefly, 100 µl of the leukocyte-rich supernatant (10⁶ cells) were added into 1 mL of phosphate buffered saline, pH 7.3 (PBS, Dulbecco's Phosphate-buffered Saline, GIBCO) with 9.9 µM/mL dihydrorhodamine (DHR 123 Molecular Probes) and incubated 10 min at 37°C. The respiratory burst was induced with 110 µl phorbol ester phorbol-myristate-acetate (PMA, 0.4 µg/mL, Sigma.). The samples were incubated for additional 15 min at 37°C, put on ice to stop the reaction and subsequently analyzed by flow cytometry using the blue-green excitation light (488 nm argon-ion laser) using a flow cytometer (EPICS XL, Coulter, Miami, FL) (15). The respiratory burst was evaluated in both homozygous and heterozygous individuals.

Statistical analysis

Chi Square analysis was used to test for deviation of genotype distribution from Hardy-Weinberg equilibrium and to determine whether there were any significant differences in allele or genotype frequencies between normal individuals. Differences in the luciferase activity experiments between allelic variants were assessed by ANOVA or Kruskal-Wallis test. *P* value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to determine the frequency of the transition C to T at position -23 of promoter region of NCF-2 gene a PCR fragment of 465 bp including the 5' promoter region of this gene was obtained from genomic DNA of 100 healthy subjects. This fragment was digested with the enzyme Mae III, which cuts the allele containing a cytosine at the position -23. The Figure 1A shows the digestion pattern of this fragment in different healthy subjects. Although the homozygous subjects for the reported allele (C/C) will generate three fragments (316, 138 and 11 bp) only the two larger were visible by this analysis because the third one is too small to be visualized. Those homozygous subjects for the new allele (T/T) should generate two fragments (454 and 11 bp), while in the heterozygous the four possible fragments will be present. SSCP showed to be a sensible assay to detect single nucleotide polymorphisms, and revealed a different electrophoretic pattern for each genotype (Figure 1B), which correlated with Mae III digestion data. To confirm these findings, we sequenced the region containing the substitution (Figure 1C). Sixty-seven of 100 subjects were homozygous for C, 32 were heterozygous and just one homozygous for T was detected. The allelic and genotypic frequencies are presented in Table 1.

The fact that transition C to T at position -23 of the 5' region in the NCF-2 gene was detected in a high number of the healthy subjects (allelic frequency of 17% for the T allele) leading to a true polymorphism of the NCF-2 gene. Although other polymorphisms have been described in this gene [16,17], this nucleotide substitution is the first to be described in the promoter region of NCF-2.

The effect of -23^{C/T} polymorphism of the NCF-2 gene on respiratory burst was evaluated by flow cytometry using the dihydrorhodamine assay in both homozygous and heterozygous individuals, the DHR test revealed normal H₂O₂ production by the cells. It was 99.4% for C/C individual, 98% for C/T and 99.2% for the T/T individual. To investigate whether this substitution had an effect on gene expression constructs containing mutated sequences were prepared as shown in Fig. 2A, and then were transfected into HL60 cells (clone 15). As shown in figure 3 no differences were observed in the luciferase activity between the allele carrying a T at position -23 of NCF-2 gene promoter and the allele with a C in that position ($p = 0.1049$).

Different studies about *PHOX* genes promoters have demonstrated a complex regulatory mechanism involving both positive and negative transcription factors and the role for the development of the myeloid cell lineage [18]. The transcription of *p67^{PHOX}* gene is regulated by diverse factors, including AP1, Sp1, PU.1 and the HAF-1 complex. Although the TATA box is not present in the promoter of the *NCF2* gene, binding sites for PU.1 are present in the position at which TATA-boxes are typically located [19]. The HAF1-binding site, a CYBB *cis* element necessary for IFN- γ induced *gp91^{PHOX}* expression, has been described in the 5' region of *NCF2* gene (-180 to -172 in first intron) [18, 20]. The HAF1-binding element is activated by cooperation between PU.1 and the IFN regulatory factors (IRF1 and ICSBP). Furthermore, PU.1 has been hypothesized to activate TATA-less promoters by interacting with TBP and TFIID [21]. HAF1-binding site and IRFs (IRF1 and ICSBP) are necessary for myeloid differentiation and *gp91-PHOX* expression [22].

A recent study of the myeloid-specific transcriptional regulation of the *NCF2* gene used the *p67^{PHOX}* 5'-flanking region from -985 to -4 (relative to ATG) and cloned into the promoterless luciferase reporter plasmid pGL3-basic (Promega). Combined mutations in this construct alter the luciferase activity in HL60 lysates, showing that this segment has the principal elements necessary to regulate transcription in this myeloid cell line [23].

The polymorphism we described here is not located in any known regulatory sequence of the promoter in the *NCF2* gene, maybe this is the reason to not produce modifications in the RNA expression. However, in some circumstances, this kind of polymorphisms might be deleterious if they are present simultaneously with gene mutations affecting the expression or function of *p67^{PHOX}* or other genes involved in the immune response. Similarly, additive effect of these and other single nucleotide polymorphisms could lead to abnormal immune responses in otherwise healthy individuals. In patients already presenting defective immune responses, the synergistic effect could be even worse [24, 25].

Probably the combined effect of a collection of SNP alleles in key genes, plus environmental factors together determine whether an individual suffers some disease. For that reason the study of SNP continue to be important.

Figures and Table Legends

Table I. Genomic and allelic frequencies for the C→T transition at position -23 of promoter region of NCF2 gene. Among 100 evaluated subjects, 67% were homozygous for the allele containing C while 32% were heterozygous, and 1% was homozygous for T. The polymorphisms' frequencies were determined by the Hardy- Weinberg equilibrium.

Figure 1.

A. Agarose gel electrophoresis of PCR fragments from the 5' region of the NCF2 gene digested with Mae III. Lanes 1, 3 and 4 show digestion pattern of subjects homozygous for C in position -23; lane 2 shows a heterozygous subject (C/T). **B.** SSCP analysis of PCR fragments from the 5' region of the NCF2 gene in 9 healthy subjects. The concordance of these migration profiles with different genotypes in position -23 of the promoter was confirmed by digestion with Mae III and DNA sequencing. **C.** DNA sequence of the 5' region of the NCF2 gene in two healthy subjects presenting different genotypes. Arrows indicate the nucleotides present in position -23.

Figure 2.

Biochemical analysis of respiratory burst. The cells were activated by ester phorbol-myristate-acetate (PMA) and tested for their production of H_2O_2 staining with dihydrorhodaminr 123.

Figure 3.

A. Schematic representation of promoter gene constructs containing the $p67^{PHOX}$ promoter. The only difference between the two constructs is a T or a C base -23 nucleotides before first nucleotide of exon 1.

B. Luciferase levels in HL60 cells transfected whit reporter gene constructs: mutated (M) or not mutated (N), and a control (C). Data shown are mean values from 16 separate experiments ($p = 0.1049$).

References

1. De Leo, F.R., et al., *Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67PHOX and flavocytochrome b to a common functional domain in p47PHOX*. J Biol Chem, 1996. **271**(29): p. 17013-20.
2. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3007-17.
3. Dinayer, M.C., *The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1993. **30**(4): p. 329-69.
4. Dinayer, M.C., J.A. Lekstrom-Himes, and D.C. Dale, *Inherited Neutrophil Disorders: Molecular Basis and New Therapies*. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program), 2000: p. 303-318.
5. Segal, A.W., *How neutrophils kill microbes*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 197-223.
6. Babior, B.M., *NADPH oxidase: an update*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1464-76.
7. Vignais, P.V., *The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(9): p. 1428-59.
8. Heyworth, P.G., et al., *Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s)*. Mol Biol Cell, 1993. **4**(11): p. 1217-23.
9. Segal, B.H., et al., *Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease*. Medicine (Baltimore), 2000. **79**(3): p. 170-200.
10. Cross, A.R., et al., *Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (first update)*. Blood Cells Mol Dis, 2000. **26**(5): p. 561-5.
11. Patino, P.J., et al., *Molecular analysis of chronic granulomatous disease caused by defects in gp91-PHOX*. Hum Mutat, 1999. **13**(1): p. 29-37.

12. Sekiya, T., *Detection of mutant sequences by single-strand conformation polymorphism analysis*. Mutat Res, 1993. **288**(1): p. 79-83.
13. Orita, M., et al., *Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction*. Genomics, 1989. **5**(4): p. 874-9.
14. Melkonyan, H., C. Sorg, and M. Klempt, *Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO)*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(21): p. 4356-7.
15. Emmendorffer, A., et al., *Evaluation of flow cytometric methods for diagnosis of chronic granulomatous disease variants under routine laboratory conditions*. Cytometry, 1994. **18**(3): p. 147-55.
16. Aoshima, M., et al., *Two-exon skipping due to a point mutation in p67-PHOX-deficient chronic granulomatous disease*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1841-5.
17. Kenney, R.T., et al., *Characterization of the p67PHOX gene: genomic organization and restriction fragment length polymorphism analysis for prenatal diagnosis in chronic granulomatous disease*. Blood, 1993. **82**(12): p. 3739-44.
18. Eklund, E.A. and R. Kakar, *Recruitment of CREB-binding protein by PU.1, IFN-regulatory factor-1, and the IFN consensus sequence-binding protein is necessary for IFN-gamma-induced p67PHOX and gp91PHOX expression*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 6095-105.
19. Skalnik, D.G., *Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes*. Gene, 2002. **284**(1-2): p. 1-21.
20. Eklund, E.A. and D.G. Skalnik, *Characterization of a gp91-PHOX promoter element that is required for interferon gamma-induced transcription*. J Biol Chem, 1995. **270**(14): p. 8267-73.

21. Eklund, E.A., A. Jalava, and R. Kakar, *PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase gp91(PHOX) expression*. J Biol Chem, 1998. 273(22): p. 13957-65.
22. Tenen, D.G., et al., *Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia*. Blood, 1997. 90(2): p. 489-519.
23. Li, S.L., et al., *Transcriptional regulation of the p67PHOX gene: role of AP-1 in concert with myeloid-specific transcription factors*. J Biol Chem, 2001. 276(42): p. 39368-78.
24. Foster, C.B., et al., *Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease*. J Clin Invest, 1998. 102(12): p. 2146-55.
25. Foster, C.B. and S.J. Chanock, *Mining variations in genes of innate and phagocytic immunity: current status and future prospects*. Curr Opin Hematol, 2000. 7(1): p. 9-15.

Table 1

Genotypic and allelic frequencies for the 5'-23 C→T substitution		
		5'-23C→T
		No. (frequency)
Genotypic Frequencies	C/C	67 (0.67)
	C/T	32 (0.32)
	T/T	1 (0.01)
Allelic Frequencies	C	166 (0.83)
	T	34 (0.17)

Figure 1

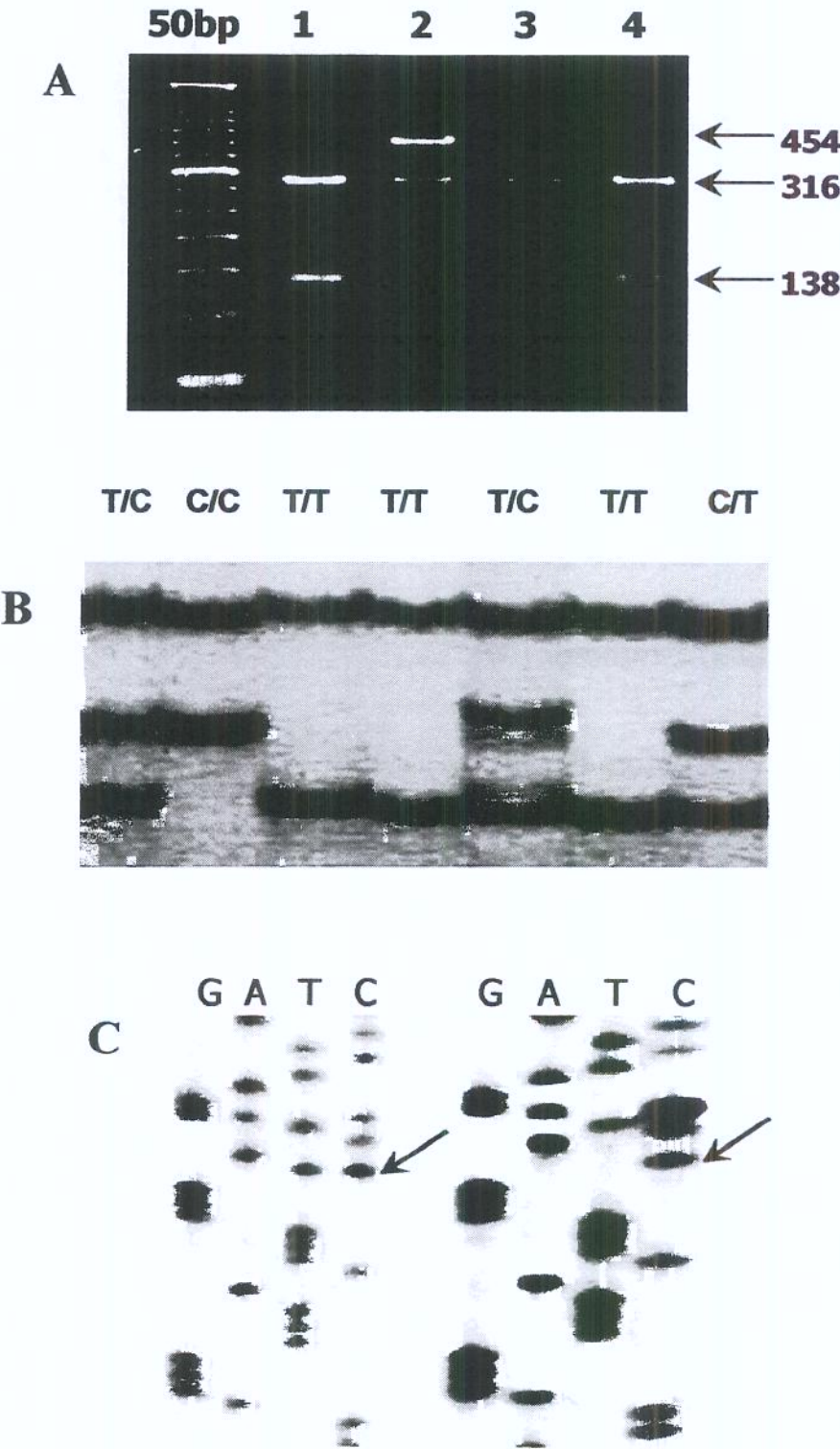


Figure 2

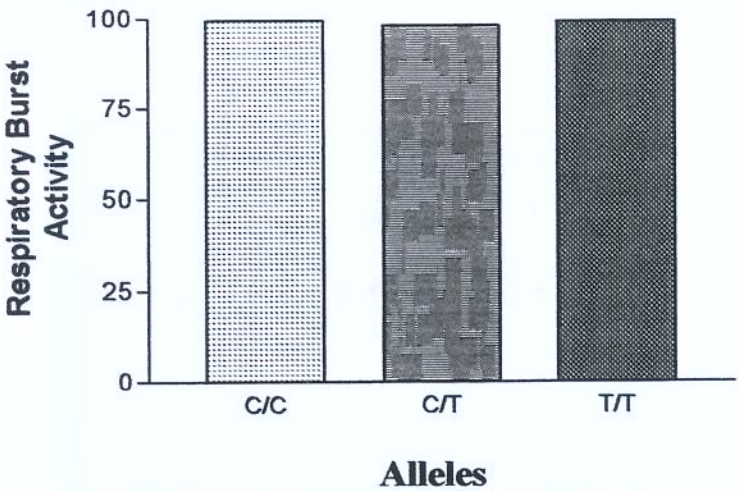
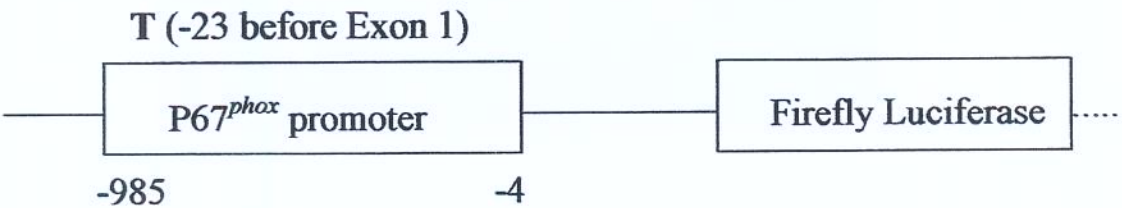


Figure 3

A

Mutated Promoter (M)

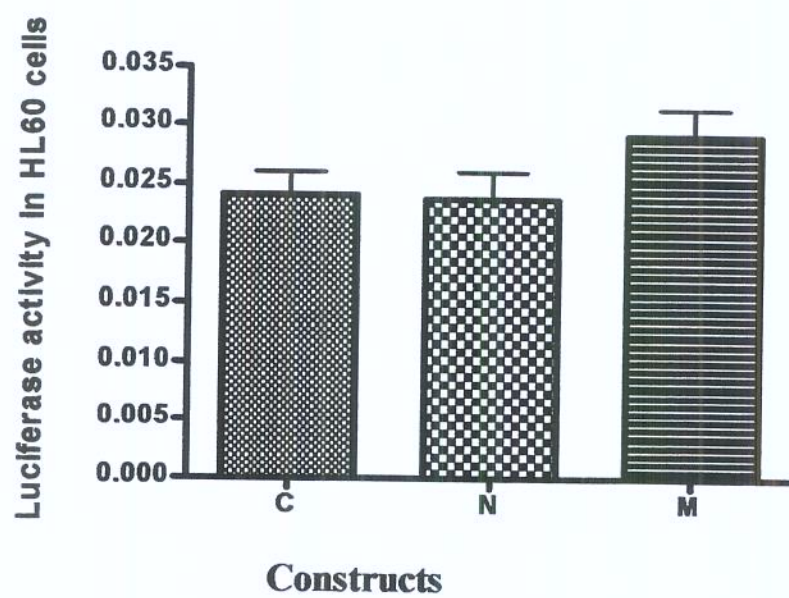


Normal Promoter (N)

C (-23 before Exon1)



B



DISCUSSÃO GERAL

Acredita-se que existam aproximadamente 10 milhões de polimorfismos no genoma da espécie humana. Assim, dez milhões de posições ao longo do genoma de três mil milhões de pares de bases têm variações comuns (BENTO, 1997). Isto é interessante porque permite rastrear a herança em famílias, sendo que alguns desses polimorfismos são funcionalmente importantes e provavelmente mudam a forma como o genoma se comporta e de fato uma pequena fração deles tem papel na susceptibilidade a doenças.

Num estudo prévio, nosso grupo fez a caracterização molecular de vários indivíduos com DGC autossômica recessiva causada por defeitos na $p67^{PHOX}$, onde além das mutações associadas com a doença também foram achadas outras alterações que aparentemente não seriam as responsáveis pelo fenótipo da DGC (PATINO et al., 1999).

Na primeira delas, a transição de A por G na posição -21 do intron 10 (*IVS10-21A→G*) do gene NCF2, observamos uma frequência do alelo G de 42.5%, ou seja, está presente em quase metade da população sadia. Como descrevemos, este polimorfismo está localizado numa região determinante para a realização do *splicing* do intron 11 (*branch acceptor region*).

Sabe-se que dependendo do genótipo, o *splicing* alternativo pode ser regulado diferentemente durante a ativação celular. O mecanismo sugerido é que o polimorfismo dentro da sequência reguladora de *splicing* pode implicar na ligação de alguns fatores reguladores expressos preferencialmente durante esta etapa (LYNCH and WEISS, 2001; SKALNIK, 2002). Por isto é interessante estudar a influência do genótipo na expressão de variantes de *splicing* de mRNA.

Na análise da região compreendida entre os introns 9 ao 14 do gene NCF2 observamos sequências com diferentes tamanhos em relação à sequência normal, assim este polimorfismo estaria implicado na geração de *splicing* alternativo. Ao analisar a expressão não se encontraram diferenças entre os indivíduos, já que os ensaios feitos pelo Real Time PCR não mostraram diferenças significativas dos doadores sadios assim como nos ensaios para determinar atividade oxidase, onde avaliamos a explosão respiratória, e não observamos diferenças significativas entre eles.

Esses resultados poderiam ser explicados pelo fato de que 60% dos genes humanos sofrem *splicing* alternativo (MODREK and LEE, 2002), gerando distintas isoformas de proteínas que diferem na sua sequência peptídica e, portanto na sua atividade química e biológica, contribuindo na diversidade de proteínas (GRABOWSKI and BLACK, 2001). Portanto, a substituição descrita pode ter implicações no *splicing* do RNA entre o intron 10 e exon 11, mas sem alterar a expressão do gene nem a atividade oxidase.

A transição na posição -23 na região promotora do gene NCF2 se apresentou com uma frequência alélica de 17% para o alelo T. Embora outros polimorfismos tenham sido relatados neste gene (KENNEY et al., 1993) (AOSHIMA et al., 1996), 23C→T é o primeiro a ser descrito na região promotora do gene NCF2, e por isso estudamos as possíveis implicações deste polimorfismo para o início da transcrição deste gene.

Vários estudos sobre as regiões promotoras dos genes que formam o sistema NADPH oxidase demonstraram mecanismos reguladores complexos que envolvem fatores de transcrição positivos e negativos e seu papel no desenvolvimento na linhagem celular mielóide (EKLUND and KAKAR, 1999).

A transcrição do gene que codifica para a $p67^{PHOX}$ é regulado por diversos fatores, incluindo AP1, Sp1, PU.1 e o complexo HAF-1 (SKALNIK, 2002). O polimorfismo localizado -23 nucleotídeos antes do exon 1 não se encontra dentro da sequência reguladora de nenhum destes fatores. Para confirmar se esse polimorfismo poderia ter alguma implicação na transcrição deste gene, fizemos mutagênese sítio dirigida usando o construto pGL3-p67985/-4 e clonando num plasmídeo que continha o gene da luciferase, avaliando a atividade desta proteína em células HL60 transfectadas com os distintos construtos, mas não se observou diferenças na expressão.

Uma redução no número de moléculas de RNAm normais em células que possuem um ou mais polimorfismos, poderia diminuir a expressão da $p67^{PHOX}$, mas em indivíduos normais esta redução não altera a função do sistema NADPH oxidase possivelmente porque o número reduzido de moléculas de $p67^{PHOX}$ produzidas podem ser suficientes para uma ativação normal e completa do sistema (FOSTER and CHANOCK, 2000).

Em algumas circunstâncias tais tipos de polimorfismos poderiam ser deletérios se eles estiverem presentes no gene junto com mutações, afetando a expressão ou a função da p67^{PHOX} ou de outros genes envolvidos na resposta imune. Da mesma forma, efeitos aditivos ou diferentes destes e outros polimorfismos poderiam levar a uma resposta imune anormal em indivíduos sadios. Em pacientes que já apresentam resposta imune defeituosa, os efeitos sinérgicos podem ser piores (FOSTER et al., 1998).

A presença de um polimorfismo comum pode alterar sutilmente ou nada o fenótipo, mas em combinação com um “background” gênico vulnerável poderiam influenciar uma ou mais funções biológicas e levar a uma doença. É por isso que o curso clínico de muitas desordens aparentemente monogênicas pode ser modificado significativamente não só por fatores ambientais como por genes secundários ou modificados (CHANOCK and FOSTER, 1999), e é isso que torna interessante tais estudos, a possibilidade do entendimento das bases moleculares da diversidade humana em populações bem caracterizadas, podendo conseguir identificar a importância clínica de marcadores genéticos.

Este estudo avaliou se esses dois polimorfismos no gene NCF2 em indivíduos sadios poderiam alterar a expressão desta proteína ou sua função. Mesmo que não se tenha encontrado uma correlação direta entre o genótipo e o fenótipo, seria interessante estudar essas alterações em indivíduos que possuam uma imunodeficiência de base, o que permitiria uma associação mais clara com a alteração da resposta inata.

CONCLUSÃO GERAL

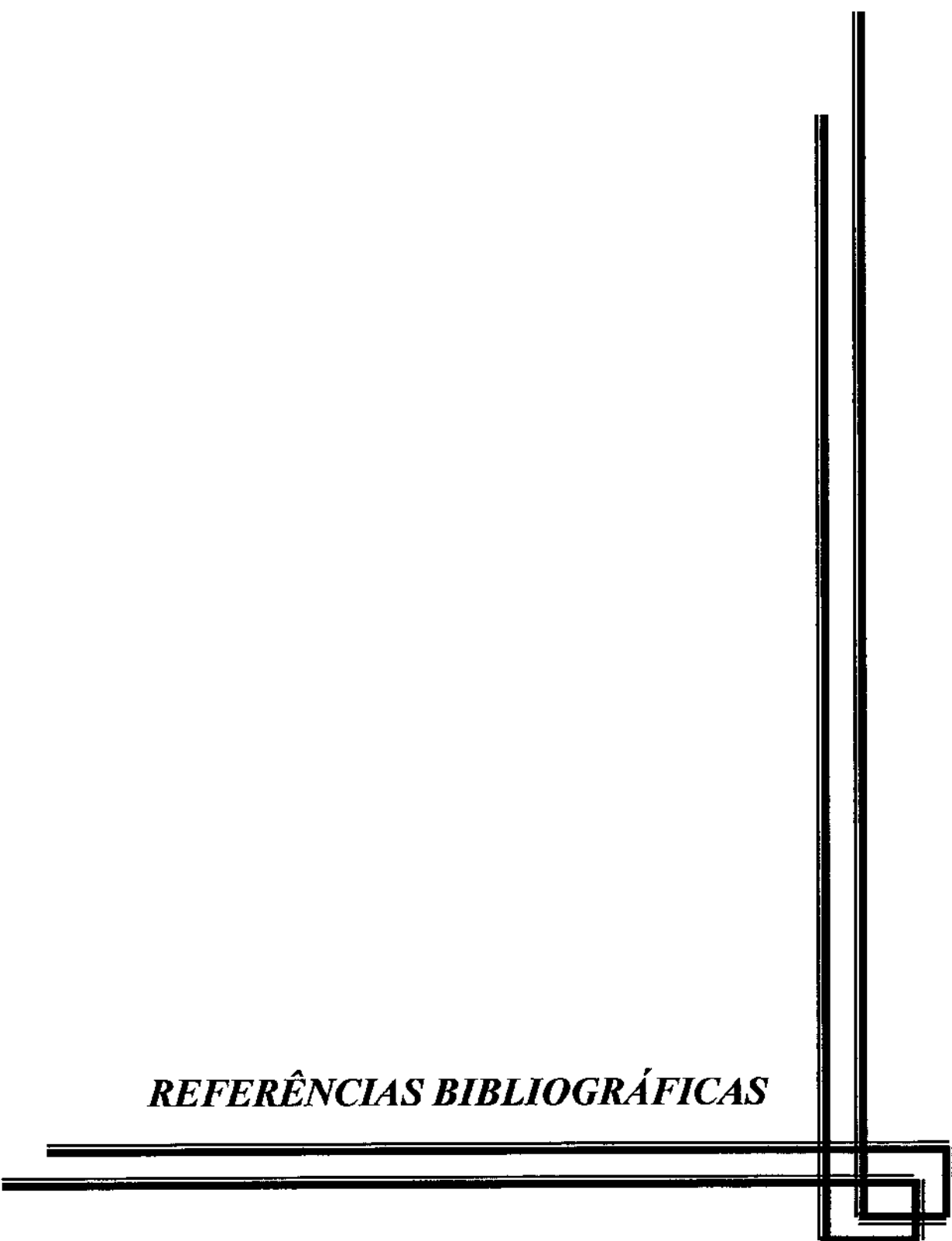
As frequências alélicas e genotípicas da transição de A por C na posição -21 do intron 10 e da transição de C por T na posição -23 da região promotora do gene NCF2 confirmaram que essas alterações correspondem a polimorfismos gênicos.

Na região compreendida entre os introns 9 ao 14, identificamos a presença de seqüências com diferentes tamanhos em relação à seqüência normal, assim a transição de A por C na posição -21 do intron 10 está implicada na geração de *splicing* alternativo.

Os ensaios de explosão respiratória mostraram que essas mudanças no DNA de indivíduos normais não produziram alterações que comprometem a atividade oxidase.

O envolvimento da transição de C por T localizada -23 nucleotídeos antes do exon 1 na regulação da transcrição foi estudada usando mutagênese sítio dirigida e clonando num plasmídio que continha o gene da luciferase, não foram observadas alterações na atividade deste gene entre o construto com o promotor com o alelo T e o construto com o alelo C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



AOSHIMA, M., NUNOI, H., SHIMAZU, M., SHIMIZU, S., TATSUZAWA, O., KENNEY, R.T. and KANEGASAKI, S.: Two-exon skipping due to a point mutation in p67-PHOX--deficient chronic granulomatous disease. **Blood**, 88: 1841-5 (1996).

ARIGA, T., SAKIYAMA, Y., FURUTA, H. and MATSUMOTO, S.: Molecular genetic studies of two families with X-linked chronic granulomatous disease: mutation analysis and definitive determination of carrier status in patients' sisters. **Eur J Haematol**, 52: 99-102 (1994).

ARIGA, T., SAKIYAMA, Y., TOMIZAWA, K., IMAJOH-OHMI, S., KANEGASAKI, S. and MATSUMOTO, S.: A newly recognized point mutation in the cytochrome b558 heavy chain gene replacing alanine57 by glutamic acid, in a patient with cytochrome b positive X-linked chronic granulomatous disease. **Eur J Pediatr**, 152: 469-72 (1993).

BABIOR, B.M.: NADPH oxidase: an update. **Blood**, 93: 1464-76 (1999).

BENGIS-GARBER, C. and GRUENER, N.: Protein kinase A downregulates the phosphorylation of p47 PHOX in human neutrophils: a possible pathway for inhibition of the respiratory burst. **Cell Signal**, 8: 291-6 (1996).

BENTO, S. **DNA segredos e mistérios**. São Paulo, Sarvier. (1997).

BURG, N.D. and PILLINGER, M.H.: The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. **Clin Immunol**, 99: 7-17 (2001).

CHANOCK, S.J., EL BENNA, J., SMITH, R.M. and BABIOR, B.M.: The respiratory burst oxidase. **J Biol Chem**, 269: 24519-22 (1994).

CHANOCK, S.J. and FOSTER, C.B.: SNPing away at innate immunity. **J Clin Invest**, 104: 369-70 (1999).

CHEN, M.S., SILVERSTEIN, A.M., PRATT, W.B. and CHINKERS, M.: The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. **J Biol Chem**, 271: 32315-20 (1996).

- CLARK, S.R., COFFEY, M.J., MACLEAN, R.M., COLLINS, P.W., LEWIS, M.J., CROSS, A.R. and O'DONNELL, V.B.: Characterization of nitric oxide consumption pathways by normal, chronic granulomatous disease and myeloperoxidase-deficient human neutrophils. **J Immunol**, 169: 5889-96 (2002).
- CROSS, A.R., CURNUTTE, J.T., RAE, J. and HEYWORTH, P.G.: Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease. **Blood Cells Mol Dis**, 22: 90-5 (1996).
- CURNUTTE, J.T.: Chronic granulomatous disease: the solving of a clinical riddle at the molecular level. **Clin Immunol Immunopathol**, 67: S2-15 (1993).
- DELEO, F.R., ALLEN, L.A., APICELLA, M. and NAUSEEF, W.M.: NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. **J Immunol**, 163: 6732-40 (1999).
- DELEO, F.R. and QUINN, M.T.: Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. **J Leukoc Biol**, 60: 677-91 (1996).
- DIEKMANN, D., ABO, A., JOHNSTON, C., SEGAL, A.W. and HALL, A.: Interaction of Rac with p67PHOX and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. **Science**, 265: 531-3 (1994).
- DINAUER, M.C.: The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease. **Crit Rev Clin Lab Sci**, 30: 329-69 (1993).
- DINAUER, M.C., CURNUTTE, J.T., ROSEN, H. and ORKIN, S.H.: A missense mutation in the neutrophil cytochrome b heavy chain in cytochrome-positive X-linked chronic granulomatous disease. **J Clin Invest**, 84: 2012-6 (1989).
- DORSEUIL, O., REIBEL, L., BOKOCH, G.M., CAMONIS, J. and GACON, G.: The Rac target NADPH oxidase p67PHOX interacts preferentially with Rac2 rather than Rac1. **J Biol Chem**, 271: 83-8 (1996).

EKLUND, E.A. and KAKAR, R.: Recruitment of CREB-binding protein by PU.1, IFN-regulatory factor-1, and the IFN consensus sequence-binding protein is necessary for IFN-gamma-induced p67PHOX and gp91PHOX expression. **J Immunol**, 163: 6095-105 (1999).

EZEKOWITZ, R.A., ORKIN, S.H. and NEWBURGER, P.E.: Recombinant interferon gamma augments phagocyte superoxide production and X-linked chronic granulomatous disease gene expression in X-linked variant chronic granulomatous disease. **J Clin Invest**, 80: 1009-16 (1987).

FORREST, C.B., FOREHAND, J.R., AXTELL, R.A., ROBERTS, R.L. and JOHNSTON, R.B., Jr.: Clinical features and current management of chronic granulomatous disease. **Hematol Oncol Clin North Am**, 2: 253-66 (1988).

FOSTER, C.B. and CHANOCK, S.J.: Mining variations in genes of innate and phagocytic immunity: current status and future prospects. **Curr Opin Hematol**, 7: 9-15 (2000).

FOSTER, C.B., LEHRNBECHER, T., MOL, F., STEINBERG, S.M., VENZON, D.J., WALSH, T.J., NOACK, D., RAE, J., WINKELSTEIN, J.A., CURNUTTE, J.T. and CHANOCK, S.J.: Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease. **J Clin Invest**, 102: 2146-55 (1998).

FURTMULLER, P.G., BURNER, U. and OBINGER, C.: Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate. **Biochemistry**, 37: 17923-30 (1998).

GRABOWSKI, P.J. and BLACK, D.L.: Alternative RNA splicing in the nervous system. **Prog Neurobiol**, 65: 289-308 (2001).

HENDERSON, B., POOLE, S. and WILSON, M.: Microbial/host interactions in health and disease: who controls the cytokine network? **Immunopharmacology**, 35: 1-21(1996).

HEYWORTH, P.G., CURNUTTE, J.T., NAUSEEF, W.M., VOLPP, B.D., PEARSON, D.W., ROSEN, H. and CLARK, R.A.: Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-PHOX and p67-PHOX requires interaction between p47-PHOX and cytochrome b558. **J Clin Invest**, 87: 352-6 (1991).

HEYWORTH, P.G., KNAUS, U.G., SETTLEMAN, J., CURNUTTE, J.T. and BOKOCH, G.M.: Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). **Mol Biol Cell**, 4; 1217-23 (1993).

HORTON, M.A., LARSON, K.A., LEE, J.J. and LEE, N.A.: Cloning of the murine eosinophil peroxidase gene (mEPO): characterization of a conserved subgroup of mammalian hematopoietic peroxidases. **J Leukoc Biol**, 60: 285-94 (1996).

IMAJOH-OHMI, S., TOKITA, K., OCHIAI, H., NAKAMURA, M. and KANEGASAKI, S.: Topology of cytochrome b558 in neutrophil membrane analyzed by anti-peptide antibodies and proteolysis. **J Biol Chem**, 267: 180-4 (1992).

KENNEY, R.T., MALECH, H.L., EPSTEIN, N.D., ROBERTS, R.L. and LETO, T.L.: Characterization of the p67PHOX gene: genomic organization and restriction fragment length polymorphism analysis for prenatal diagnosis in chronic granulomatous disease. **Blood**, 82; 3739-44 (1993).

KLEBANOFF, S.J.: Myeloperoxidase. **Proc Assoc Am Physicians**, 111: 383-9 (1999).

KURIBAYASHI, F., NUNOI, H., WAKAMATSU, K., TSUNAWAKI, S., SATO, K., ITO, T. and SUMIMOTO, H.: The adaptor protein p40(PHOX) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. **Embo J**, 21: 6312-20 (2002).

LETO, T.L., LOMAX, K.J., VOLPP, B.D., NUNOI, H., SECHLER, J.M., NAUSEEF, W.M., CLARK, R.A., GALLIN, J.I. and MALECH, H.L.: Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. **Science**, 248: 727-30 (1990).

LYNCH, K.W. and WEISS, A.: A CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer. **J Biol Chem**, 276: 24341-7 (2001).

MARSHALL, S.E. and WELSH, K.I.: The role of cytokine polymorphisms in rejection after solid organ transplantation. **Genes Immun**, 2; 297-303 (2001).

MODREK, B. and LEE, C.: A genomic view of alternative splicing. **Nat Genet**, 30: 13-9 (2002).

MORENO, M.U., SAN JOSE, G., ORBE, J., PARAMO, J.A., BELOQUI, O., DIEZ, J. and ZALBA, G.: Preliminary characterisation of the promoter of the human p22(PHOX) gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension. **FEBS Lett**, 542: 27-31 (2003).

NEWBURGER, P.E., SKALNIK, D.G., HOPKINS, P.J., EKLUND, E.A. and CURNUTTE, J.T.: Mutations in the promoter region of the gene for gp91-PHOX in X-linked chronic granulomatous disease with decreased expression of cytochrome b558. **J Clin Invest**, 94: 1205-11 (1994).

NISIMOTO, Y., OTSUKA-MURAKAMI, H. and LAMBETH, D.J.: Reconstitution of flavin-depleted neutrophil flavocytochrome b558 with 8-mercapto-FAD and characterization of the flavin-reconstituted enzyme. **J Biol Chem**, 270: 16428-34 (1995).

PATINO, P.J., RAE, J., NOACK, D., ERICKSON, R., DING, J., DE OLARTE, D.G. and CURNUTTE, J.T.: Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase component p67-PHOX. **Blood**, 94: 2505-14 (1999).

RAE, J., NEWBURGER, P.E., DINAUER, M.C., NOACK, D., HOPKINS, P.J., KURUTO, R. and CURNUTTE, J.T.: X-Linked chronic granulomatous disease: mutations in the CYBB gene encoding the gp91-PHOX component of respiratory-burst oxidase. **Am J Hum Genet**, 62: 1320-31(1998).

ROESLER, J., CURNUTTE, J.T., RAE, J., BARRETT, D., PATINO, P., CHANOCK, S.J. and GOERLACH, A.: Recombination events between the p47-PHOX gene and its highly homologous pseudogenes are the main cause of autosomal recessive chronic granulomatous disease. **Blood**, 95: 2150-6 (2000).

ROOS, D. The genetic basis of chronic granulomatous disease. **Immunol Rev**, 138: 121-57 (1994).

ROTROSEN, D., YEUNG, C.L., LETO, T.L., MALECH, H.L. and KWONG, C.H.: Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. **Science**, 256: 1459-62 (1992).

SEGAL, A.W.: The molecular and cellular pathology of chronic granulomatous disease. **Eur J Clin Invest**, 18: 433-43 (1988).

SEGAL, A.W.: Biochemistry and molecular biology of chronic granulomatous disease. **J Inherit Metab Dis**, 15: 683-6 (1992).

SEGAL, A.W. and ABO, A.: The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends Biochem Sci**, 18: 43-7 (1993).

SEGAL, B.H., LETO, T.L., GALLIN, J.I., MALECH, H.L. and HOLLAND, S.M.: Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. **Medicine (Baltimore)** 79: 170-200 (2000).

SKALNIK, D.G.: Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes. **Gene**, 284: 1-21 (2002).

THRASHER, A.J., KEEP, N.H., WIENTJES, F. and SEGAL, A.W.: Chronic granulomatous disease. **Biochim Biophys Acta**, 1227: 1-24 (1994).

UHLINGER, D.J., TAYLOR, K.L. and LAMBETH, J.D.: p67-PHOX enhances the binding of p47-PHOX to the human neutrophil respiratory burst oxidase complex. **J Biol Chem**, 269: 22095-8 (1994).

VAZQUEZ, N., LEHRNBECHER, T., CHEN, R., CHRISTENSEN, B.L., GALLIN, J.I., MALECH, H., HOLLAND, S., ZHU, S. and CHANOCK, S.J.: Mutational analysis of patients with p47-PHOX-deficient chronic granulomatous disease: The significance of recombination events between the p47-PHOX gene (NCF1) and its highly homologous pseudogenes. **Exp Hematol**, 29: 234-43 (2001).

VOLPP, B.D., NAUSEEF, W.M. and CLARK, R.A.: Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. **Science**, 242: 1295-7 (1988).

WALLACH, T.M. and SEGAL, A.W.: Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b558 of the NADPH oxidase of phagocytes. **Biochem J**, 320: (Pt 1) 33-8 (1996).

WINKELSTEIN, J.A., MARINO, M.C., JOHNSTON, R.B., JR., BOYLE, J., CURNUTTE, J., GALLIN, J.I., MALECH, H.L., HOLLAND, S.M., OCHS, H., QUIE, P., BUCKLEY, R.H., FOSTER, C.B., CHANOCK, S.J. and DICKLER, H.: Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. **Medicine (Baltimore)** 79: 155-69 (2000).

WOODMAN, R.C., RUEDI, J.M., JESAITIS, A.J., OKAMURA, N., QUINN, M.T., SMITH, R.M., CURNUTTE, J.T. and BABIOR, B.M.: Respiratory burst oxidase and three of four oxidase-related polypeptides are associated with the cytoskeleton of human neutrophils. **J Clin Invest**, 87: 1345-51 (1991).

ZHAN, S., VAZQUEZ, N., WIENTJES, F.B., BUDARF, M.L., SCHROCK, E., RIED, T., GREEN, E.D. and CHANOCK, S.J.: Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-PHOX, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. **Blood**, 88: 2714-21 (1996).

ANEXO

DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA DA INFÂNCIA: NOVOS POLIMORFISMOS NO GENE NCF2

CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE OF CHILDHOOD: NEW POLYMORPHISMS IN NCF2 GENE

Lina Andrea GÓMEZ¹
Maria Teresa RUGELES²
Pablo Javier PATIÑO²
Antonio CONDINO-NETO³

RESUMO

Objetivos

Mutações no gene NCF2 resultam na forma autossômica recessiva da doença granulomatosa crônica da infância. Além de mutações conhecidas, descreveu-se em pacientes com doença granulomatosa crônica da infância duas novas substituições no gene NCF2. O objetivo deste estudo foi investigar se estas substituições constituem polimorfismos do gene NCF2.

¹ Doutoranda, Faculdade de Ciências Médicas, Centro de Investigação em Pediatria, Universidade Estadual de Campinas, Brasil. E-mail: lgomez@fcm.unicamp.br

² Laboratório de Imunologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Antioquia, Medellín, Colômbia. E-mails: mtrugel@carios.udea.edu.co; ppatino@carios.udea.edu.co

³ Departamento de Pediatria, Centro de Investigação em Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6111, 13061-970, Campinas, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: A. CONDINO-NETO. E-mails: condino@lexca.com.br; condino@unicamp.br, Suporte Financeiro: FAPESP, Processos 01/14365-3 e 02/05880-4.

Métodos

Investigamos a frequência de duas substituições na sequência do gene NCF2 em 214 doadores sadios. A primeira é uma transição de C→T na posição -23 da região 5' reguladora. A segunda é uma transição de A→G na posição -21 da região 3' terminal do intron 10. Extraímos DNA genômico de células do sangue periférico. O DNA foi amplificado por meio de PCR com primers específicos para o gene NCF2, analisado quanto à presença de polimorfismos conformacionais de cadeias simples, digerido com endonucleases específicas e sequenciado. O cálculo das frequências genotípicas e alélicas seguiu a lei de Hardy e Weinberg.

Resultados

Cem indivíduos foram avaliados quanto à presença da transição C→T na posição -23 da região 5' reguladora; sendo 67% homozigotos para o alelo C, 32% heterozigotos, e apenas 1% homozigoto para T. Cento e quatorze indivíduos foram analisados quanto à presença da transição A→G na posição -21 da região 3' terminal do intron 10; dos quais 36% foram homozigotos para A, 43% heterozigotos e 21% homozigotos para G.

Conclusão

Considerando as frequências alélicas, concluímos que essas variantes correspondem a polimorfismos do gene NCF2. Suas possíveis implicações na expressão do gene NCF2 constituem objeto de pesquisa atual em nosso laboratório.

Termos de Indexação: imunodeficiências primárias, distúrbios fagocitários, criança, infecções de repetição.

ABSTRACT

Objectives

Mutations in the NCF2 gene result in an autosomical recessive form of chronic granulomatous disease of childhood. We have recently described nucleotide changes in p67-phox-deficient chronic granulomatous disease of childhood in patients that apparently were not responsible for their chronic granulomatous disease of childhood phenotype. To determine if two of these changes are genetic polymorphisms, we analyzed their occurrence in the general population.

Methods

We investigated the frequency of two substitutions in NCF2 gene in 214 healthy individuals. The first corresponded to a C→T transition at position -23 of the 5' regulatory region of the gene. The second corresponded to an A→G transition in position -21 of the 3' end of intron 10 (C210-21A→G). NCF2 gene fragments from genomic DNA were amplified by PCR with specific primers. These substitutions were detected in genomic DNA by conformational polymorphism analysis of PCR-generated fragments, restriction endonuclease digestion assays,

and DNA sequencing. Genotypes and allelic frequencies were calculated by the Hardy-Weinberg law equation.

Results

A total of 100 healthy subjects were analyzed for the presence of the C→T transition of the 5' regulatory region of the gene, 67% were homozygous for C, 32% were heterozygous, and 1% was homozygous for T. The A→G transition in intron 10 was analyzed in 114 subjects, 36% were homozygous for A, 43% were heterozygous, and 21% were homozygous for G.

Conclusion

Considering the allelic frequencies, we conclude that both substitutions correspond to polymorphisms of NCF2 gene. The possible implications for transcription or expression of NCF2 gene are under current investigation in our laboratory.

Index terms: primary immunodeficiencies, phagocytes disorders, child, recurrent infections.

INTRODUÇÃO

As células fagocíticas têm um papel fundamental na defesa inata do hospedeiro contra as infecções. Para esta função, os neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos possuem um eficiente sistema microbicida dependente do oxigênio, cuja atividade é conhecida como explosão respiratória dos fagócitos¹. A produção de reativos intermediários do oxigênio (ROS) ocorre como consequência da ativação de um complexo enzimático denominado NADPH oxidase, que está localizado principalmente na membrana fagolisossomal. Esse sistema transfere os elétrons do NADPH citosólico para o vacúolo, com a finalidade de reduzir o oxigênio a ânion superóxido, dando início aos eventos que levam a morte dos patógenos.²

O centro enzimático do complexo NADPH oxidase é constituído por vários elementos. A glicoproteína de 91 KDa (gp91-phox) e a proteína de 22 KDa (p22-phox) formam um heterodímero denominado flavocitocromo b₅₅₈, presente na membrana das células fagocíticas³. As proteínas de localização citosólica são a p47-phox, p67-phox e p40-phox, as quais se transladam para a membrana quando os fagócitos são ativados¹. Um defeito na

proteína gp91-, p22-, p47- ou p67-phox produz a Doença Granulomatosa Crônica da infância (DGC), uma imunodeficiência primária caracterizada por infecções graves e recorrentes causadas principalmente por bactérias catalase positiva e fungos⁴.

Além dessas mutações associadas com a DGC, são encontradas diversas substituições nos genes do sistema oxidase, algumas delas consideradas polimorfismos, pois sua frequência na população geral é mais elevada do que se esperaria apenas pela taxa de mutação recorrente⁵. No gene da p67-phox foram descritas várias mutações responsáveis pela DGC, em várias regiões da sequência deste gene.^{6,7} Recentemente foram encontradas algumas substituições não descritas previamente, durante a caracterização de pacientes com DGC, secundária a deficiência de p67-phox, os quais além das mutações responsáveis pelo fenótipo de DGC, apresentavam diferentes substituições de nucleotídeos, que também foram identificadas em indivíduos saudáveis, e que por sua localização na estrutura do gene, poderiam modificar parcialmente a expressão do mesmo⁸. Uma destas alterações corresponde à transição de C→T na posição -23 da região 5' reguladora do gene, que pode ter importância na regulação do promotor do gene⁹. A

outra substituição é uma transição de A→G no intron 10, na posição de 21 nucleotídeos antecedendo o início do éxon 11 (IVS10-21 A→G), focal de importância para o *splicing* da molécula e processamento do RNA maduro¹². O objetivo deste trabalho foi investigar a frequência destas variações alélicas na população geral, e determinar se estas constituem polimorfismos do gene NCF2.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados 214 indivíduos não relacionados, voluntários sadios da população geral, de ambos os sexos, com idades entre 18 e 40 anos. Após leitura e concordância com os termos do Consentimento Livre e Esclarecido foi realizada uma pequena entrevista inicial sobre seu estado de saúde e o registro de episódios infecciosos mais importantes. A seguir, foram coletados 10mL de sangue venoso periférico em tubos com heparina. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, em conformidade com a resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde do Brasil.

Obtenção de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído do sangue venoso periférico, utilizando-se o *kit* DNA Purification (Promega, Madison, WI), segundo as instruções do fabricante. O DNA foi ressuspensionado em 100µl de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM) e armazenado a 4°C até seu uso.

Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR)

As zonas do DNA genômico correspondentes à região 5' reguladora do gene NCF2 e ao extremo 3' do intron 10 do mesmo gene foram amplificadas a partir do DNA genômico obtido dos indivíduos sadios. Os oligonucleotídeos usados para a região 5'

foram: p67-5'LB 5'ACCTCTGGCTGGTGACAC3' e p67-EX1RB 5'CCTCCCTGGTGATAATGACA3'; enquanto que para o intron 11 foram p67-Ex11LA 5'GTGTTTCCCCACATCCAC3' e p67-Ex11RA 5'CAGGGAGAGGAAGCTCAGGA3'.

As reações de amplificação foram feitas num volume final de 50 µl utilizando *Amplitaq Gold* (Perkin Elmer). As condições da reação de amplificação foram de 30 ciclos de 96°C/2min, 63°C/15seg e 72°C/30seg, seguidos de um ciclo de extensão de 72°C por 7 minutos, o qual foi realizado num termociclador Gen[®] PCR Sistem 9600 (Perkin Elmer). Com a finalidade de confirmar a amplificação, os fragmentos foram visualizados por meio de luz ultravioleta, depois sua separação por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

Análises de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP)

Com a finalidade de identificar polimorfismos conformacionais nos fragmentos de amplificação correspondente à região 5' do gene NCF2 (oligonucleotídeos p67-5'LB e p67-EX1RB) e ao extremo 3' do intron 10 (oligonucleotídeos p67-Ex11LA e p67-Ex11RB), os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em condições nativas utilizando uma câmara de sequenciamento. Para isso misturou-se 5µl da reação de PCR com azul de bromofenol dissolvido em formamida, o DNA foi desnaturado por 2min a 80°C, em seguida foi colocado sobre um gel de poliacrilamida a 6% e foi corrida uma eletroforese a 35 Watts por 3 horas. A seguir, o gel foi corado com uma solução de prata seguindo protocolo previamente descrito¹¹.

Identificação do polimorfismo na posição -23 da região 5'

O fragmento de DNA obtido depois da amplificação da região 5' do gene NCF2 foi digerido com a enzima de restrição Mae III, 2U/µl (Boehringer Mannheim), a 55°C durante 3 horas, em um volume final de 25µl, em tampão específico

(20mM Tris-HCL, 275mM NaCL, 6mM MgCL₂, 7mM 2-mercaptoetanol, pH 8.2). Esta enzima reconhece e corta no sítio GTNAC, onde N significa qualquer nucleotídeo. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose NuSieve (FMC BioProducts, Rockland, Maine) a 2,5%. O gel foi corado com brometo de etídio (1µg/ml), e as bandas foram visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta.

Seqüenciamento enzimático do DNA

As amostras de DNA amplificadas por PCR foram purificadas utilizando o *Concert Rapid PCR Purification System* (Life Technologies, Gibco) e seqüenciadas pelo método enzimático de incorporação de dideoxinucleotídeos, utilizando o *kit DNA sequencing Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction for ABI 377* (PE Applied Biosystems). Quando indicado, o fragmento foi subclonado no vetor pBlueScript conforme ensaios padronizados¹². Uma vez obtidas as seqüências alteradas, estas foram comparadas com as seqüências normais a partir dos dados do GenBank.

Estatística

As freqüências dos polimorfismos foram determinadas a partir das leis de Hardy-Weinberg, que são uma extensão das leis Mendelianas e descrevem as freqüências de alelos e de genótipos para populações em equilíbrio gênico. A lei de Hardy e Weinberg estabelece que $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, onde p = freqüência do alelo dominante e q = freqüência do alelo recessivo¹³.

RESULTADOS

Transição de C por T na posição -23 da região promotora do gene NCF2

Para determinar a freqüência desta substituição, o fragmento de 465 pb que inclui a região 5'

promotora do gene, foi obtido do DNA genômico amplificado por meio de PCR, de 100 indivíduos sadios. Esse fragmento foi digerido com a enzima de restrição Mae III, que corta a citosina na posição -23. A Figura 1A mostra o padrão de digestão deste fragmento nos diferentes indivíduos. Os homozigotos para o alelo C geraram fragmentos de 138pb e 316pb, os heterozigotos (C/T) geraram fragmentos de 138, 316 e 454pb.

Embora os indivíduos homozigotos para o alelo referido (C/C) pudessem gerar três fragmentos (316pb, 138pb e 11pb), somente dois deles são visíveis, pois o terceiro é muito pequeno para ser observado. Os indivíduos homozigotos para o novo alelo (T/T) devem gerar dois fragmentos (454pb e 11pb) e os heterozigotos podem apresentar os 4 possíveis fragmentos.

A análise SSCP do produto de PCR revelou diferentes padrões eletroforéticos para cada genótipo (Figura 1B). Cada produto de amplificação é desnaturado, migra nas suas condições nativas, permitindo observar três bandas nos indivíduos heterozigotos e apenas duas nos homozigotos. Para confirmar esses resultados, seqüenciamos a região que contém a substituição (Figura 1C). Sessenta e sete dos 100 sujeitos foram homozigotos para C, 32 foram heterozigotos, e somente um deles foi homozigoto para T (Tabela 1).

Tabela 1. Freqüências fenotípicas e alélicas dos polimorfismos -23C>T e IVS10-21A>G, calculadas por meio da lei de Hardy-Weinberg.

		5'-23C>T		IVS10-21A>G	
Freqüências	n (freqüência)				
genotípicas	C/C	67	(0,67)	A/A	41 (0,36)
	C/T	32	(0,32)	A/G	49 (0,43)
	T/T	1	(0,01)	G/G	24 (0,21)
Freqüências alélicas	C	163	(0,83)	A	131 (0,575)
	T	33	(0,17)	G	97 (0,425)

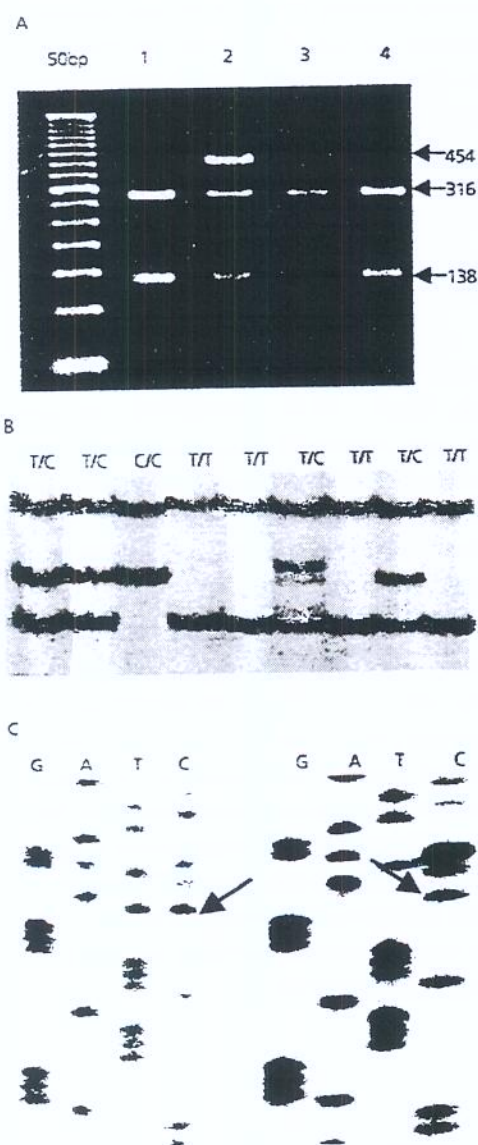


Figura 1. Transição de C por T na posição -23 da região promotora do gene NCF2.

Painel A. Eletroforese dos fragmentos de PCR da região 5' do gene NCF2 digeridos com Mae III. As linhas 1, 3 e 4 mostram o padrão de digestão dos homozigotos para C na posição -23. A linha 2 mostra o heterozigoto (C/T).

Painel B. Análise de SSCP dos fragmentos de PCR da região 5' do gene NCF2 em 9 indivíduos estudados. A concordância desses padrões de migração com os diferentes genótipos na posição -23 do promotor foi confirmada pela digestão com Mae III e sequenciamento do DNA.

Painel C. Sequência de DNA da região 5' do gene NCF2 de indivíduos apresentando diferentes genótipos. As setas indicam os nucleotídeos presentes na posição -23.

Transição de A por G na posição -21 do intron 10 (IVS10-21A→G) no gene NCF-2

O ensaio SSCP usando um fragmento de PCR de 200pb contendo o final 3' do intron 10 foi realizado para identificar a substituição de A por G na posição -21 do intron 10, já que não achamos uma enzima de restrição para a identificação da substituição.

Observamos um padrão de quatro bandas para os indivíduos heterozigotos (G/A), e duas bandas para os homozigotos (A/A) ou (G/G) (Figura 2A). Essa substituição nucleotídica foi confirmada por sequenciamento, usando o método enzimático de incorporação de dideoxynucleotídeos como mencionado nos materiais e métodos (Figura 2B). Uma completa correlação entre o sequenciamento e os dados da migração do SSCP foi observada. Dos 114 sujeitos analisados para essa transição nucleotídica, 41% foram homozigotos para A, 49% foram heterozigotos e 24% foram homozigotos para G (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Somente 2% a 3% do DNA humano se expressa. Assim, o maior parte do genoma humano não é composto por genes que transcrevem um RNA importante para a produção de uma proteína fundamental. Mutações neste DNA não chegam a ter um efeito no fenótipo do indivíduo e por este motivo não são eliminadas da população. Em outras palavras, o DNA que não é transcrito está mais sujeito a acumular mutações, constituindo uma grande fonte de variabilidade no DNA dos indivíduos. Estas variações genéticas sem consequências aparentes, precisam ser diferenciadas daquelas que causam o aparecimento de doenças genéticas, por afetarem regiões importantes de genes fundamentais para o indivíduo¹⁴.

O objetivo deste trabalho foi determinar a frequência de duas substituições de nucleotídeos localizadas em regiões não transcritas do gene NCF2. Estas regiões são importantes para o começo da

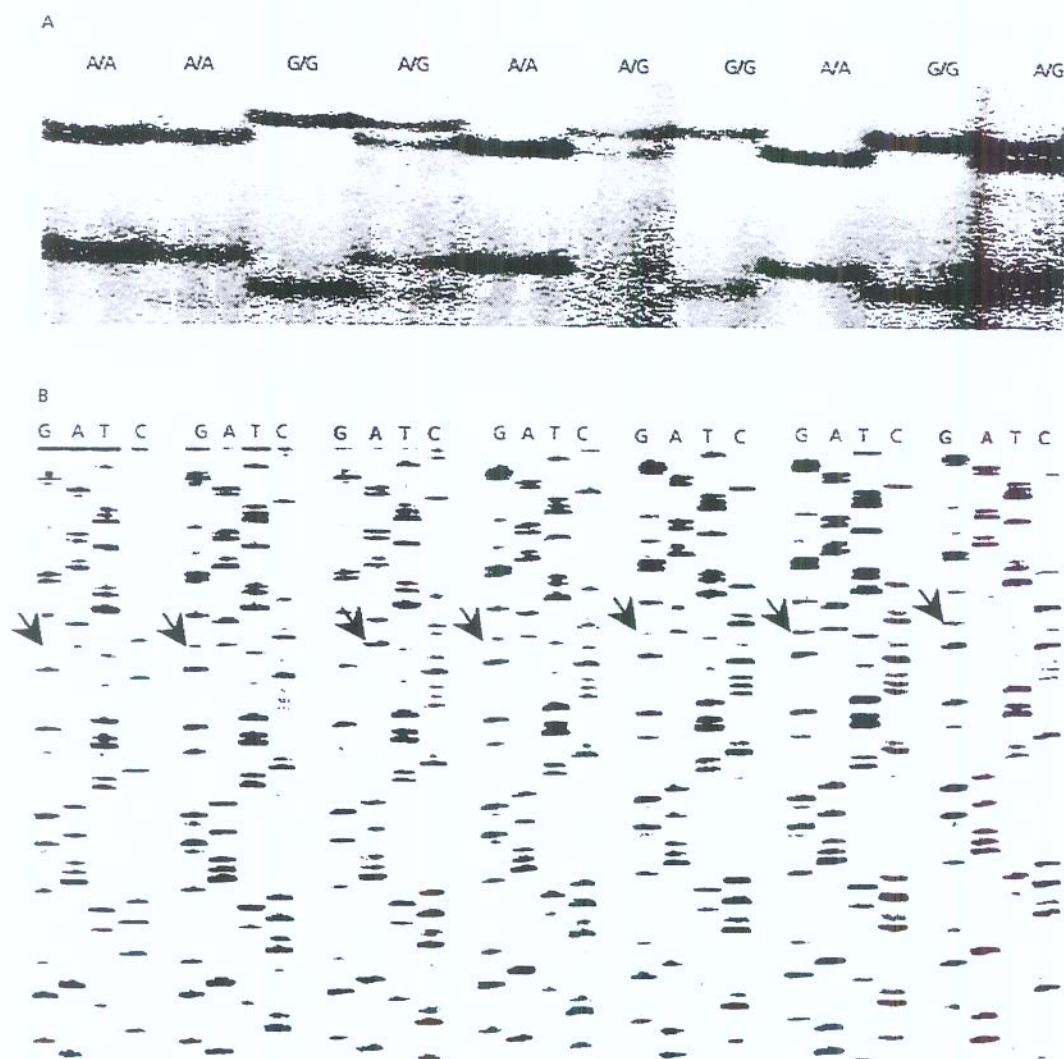


Figura 2. Transição de A por G na posição -21 do intron 10 (IVS10-21A®G) no gene NCF2.

Painel A. Análise por SSCP da região do intron 10-exon 11 do gene NCF2 de 10 indivíduos sadios. Esse Padrão de migração concorda com os diferentes genótipos na posição -21 do intron 10, identificados por sequenciamento do DNA.

Painel B. Sequência do DNA da região do intron 10-exon 11 do gene NCF2. As setas indicam os nucleotídeos presentes na posição -21 do intron 10.

transcrição gênica (região 5' reguladora) ou para o *splicing* do RNA (seqüência receptora do intron 10), e portanto, uma variação nessa seqüência pode resultar numa alteração da expressão gênica, reduzindo a síntese da *p67-phox* e conseqüente diminuição da atividade microbicida das células fagocíticas.

A transição na posição -23 na região 5' do gene NCF2 foi detectada na maioria dos indivíduos sadios estudados com uma freqüência alélica de 17% para o alelo T, o que corresponde a um polimorfismo no gene NCF2. Embora outros polimorfismos tenham sido descritos neste gene⁶, a mudança -23C®T é a primeira a ser descrita na região promotora do gene

NCF2, e pode ter implicações para o início de sua transcrição.

A eficiência da transcrição está sujeita a regulação por proteínas ativadoras ou supressoras da transcrição. Sugere-se que os fatores de transcrição unidos ao DNA influenciam a transcrição por meio de interação proteína-proteína, com fatores de iniciação geral, resultando na potencialização do recrutamento ou estabilização do complexo do promotor basal ao molde. Um desses ativadores é o Sp1, que se liga às chamadas caixas GC. O Sp1 é universalmente expresso, sendo necessário para a expressão constitutiva e induzível de uma variedade de genes. Outros fatores de transcrição descritos no promotor do gene NCF2 incluem o Sp1/Sp3, PU.1, AP-1, PU.1/HAF1, importantes para a atividade do promotor^{9,15}. Embora o polimorfismo aqui apresentado não esteja localizado em nenhuma sequência reguladora conhecida do promotor do gene NCF2, sua proximidade ao sítio de início de transcrição, sugere que este possa alterar a expressão do RNA.

Também foi investigada a frequência alélica de uma segunda mudança substituição, a transição de A por G na posição -21 (IVS10-21A→G) no gene NCF2. Esta alteração pode modificar o *splicing* do exon 11 neste gene⁸. A substituição -21A foi encontrada no *branch acceptor sequence* do intron 10, o qual é necessário para a formação do laço entre a extremo 5' livre e o extremo 3' terminal do intron^{16,17}.

Durante o *splicing* do RNAm, o sítio doador no extremo 5' do intron é cortado por ribonucleoproteínas que constituem o *esplaisossomo*, gerando um exon com um extremo 3' livre e um intron com uma guanina livre no extremo 5'. O grupo fosfato desta guanina livre é esterificado com um grupo hidroxila de uma adenina conservada, localizada na sequência *branch acceptor*, entre os nucleotídeos -18 e -37 do extremo 3' do intron. Estes acontecimentos permitem a formação do laço e o corte do extremo 3' do intron. Simultaneamente com a excisão do intron, ambos os exons são unidos e a sequência do intron é removida¹⁶.

A substituição descrita no intron 10, pode alterar o *splicing* do RNA do gene NCF2 no intron 10 e no exon 12. Em alguns casos o *splicing* normal está presente, pois o extremo 5' no intron 10 reconhece o sítio aceptor de *splicing* no mesmo intron. Entretanto, em outras circunstâncias, a formação do laço ocorre entre o extremo 5' do intron 10 e a sequência aceptor de *splicing* no intron 11, a qual resulta em exclusão do exon 11. A eliminação deste exon pode mudar o marco de leitura e resultar em uma proteína truncada (Figura 3).

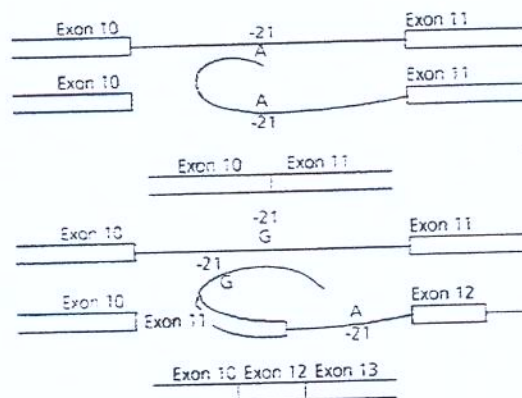


Figura 3. Splicing Alternativo. A transição de A por G na posição -21 do intron 10 (IVS10-21A→G) no gene NCF-2 pode modificar parcialmente o *splicing* do exon 11 neste gene (8). A posição -21 está localizada na sequência *branch acceptor* do intron 10, que é necessária para a formação do laço entre a região 5' e o extremo 3' do intron 10.

No grupo de indivíduos sadios analisados para essa transição, 36% foram homozigotos para A, 21% foram homozigotos para G, e o restante foi heterozigoto. Estes dados indicaram uma frequência alélica para G de 42,5%. Como este alelo está presente em quase metade da população sadia, pode ter um papel importante na expressão da p67-phox.

Estudos preliminares de nosso grupo indicam que algumas espécies de RNAm não possuem o exon 11¹⁸. A redução de moléculas de RNAm normais em células que carregam um dos polimorfismos que descrevemos pode diminuir a expressão da p67-phox. Entretanto, na maioria dos casos, a redução do

número de moléculas de RNAm pode não alterar a função do sistema NADPH oxidase, já que um número reduzido de moléculas de p67-phox é suficiente para a ativação completa e normal deste sistema. Porém, estes polimorfismos podem ser deletérios se presentes simultaneamente com mutações no gene, afetando drasticamente a expressão ou a função da proteína p67-phox ou de outros genes envolvidos na resposta imune. Além disso, efeitos adicionais ou diferentes destes, podem ser causados por polimorfismos, conduzindo a uma resposta imune anormal em indivíduos normais. Em pacientes que já apresentam resposta imune defeituosa, os efeitos sinérgicos poderiam ser ainda piores^{19,22}.

Considerando as frequências alélicas observadas nesta pesquisa, concluímos que essas variantes constituem polimorfismos do gene NCF2. Suas possíveis implicações sobre a expressão do gene NCF2, funcionamento da proteína p67-phox, por ele codificada, atividade do sistema NADPH oxidase, por ela integrado, e conseqüentemente sobre a resposta imunológica, constituem objeto de pesquisa atual em nosso laboratório.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem Jussara Rehder e Diana Castaño pela assistência técnica.

REFERÊNCIAS

1. Chanock SJ, el Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 1994; 269(40):24519-22.
2. Curnutte JT. Chronic granulomatous disease: the solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 67(3 Pt 2):S2-S15.
3. Smith RM, Curnutte JT. Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 1991; 77(4): 673-86.
4. Ezekowitz RA. Update on chronic granulomatous disease: the concept of the near-normal host. *Curr Clin Top Infect Dis* 2000; 20:325-34.
5. Lewin B. *Genes*. 5th ed. Oxford: Oxford University; 1994.
6. Aoshima M, Nunoi H, Shimazu M, Shimizu S, Tatsuzawa O, Kenney RT, et al. Two-exon skipping due to a point mutation in p67-phox-deficient chronic granulomatous disease. *Blood* 1996; 88(5):1841-5.
7. Tanugi-Cholley LC, Issartel JP, Lunardi J, Freycon F, Morel F, Vignais PV. A mutation located at the 5' splice junction sequence of intron 3 in the p67phox gene causes the lack of p67phox mRNA in a patient with chronic granulomatous disease. *Blood* 1995; 85(1):242-9.
8. Patino PJ, Rae J, Noack D, Erickson R, Ding J, de Olarte DG, et al. Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase component p67-phox. *Blood* 1999; 94(7):2505-14.
9. Eklund EA, Jalava A, Kakar R. PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase gp91(phox) expression. *J Biol Chem* 1998; 273(22):13957-65.
10. Hornig H, Aebi M, Weissmann C. Effect of mutations at the lariat branch acceptor site on beta-globin pre-mRNA splicing *in vitro*. *Nature* 1986; 324(6097):589-91.
11. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5(4):874-9.
12. Condino-Neto A, Newburger PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood* 2000; 95(11):3548-54.

13. Monje S. Genética. Barcelona: Omega; 1982.
14. Bento S. DNA: segredos e mistérios. São Paulo: Sarvier; 1997.
15. Lania L, Majello B, De Luca P. Transcriptional regulation by the Sp family proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(12):1313-23.
16. Krainer AR MT. *RNA splicing*. Washington DC: IRL Press; 1998.
17. Kuivenhoven JA, Weibusch H, Pritchard PH, Funke H, Benne R, Assmann G, et al. An intronic mutation in a lariat branchpoint sequence is a direct cause of an inherited human disorder (fish-eye disease). *J Clin Invest* 1996; 98(2):358-64.
18. Gómez LARM, Patino PJ, Condino-Neto A. A polymorphism in intron 10 of the NCF2 gene leading to alternative *splicing*. In: Meeting of the Brazilian Society of Immunology 2003 Oct 5-8; Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Imunologia; 2003. p.153.
19. Foster CB, Lehnbecher T, Mol F, Steinberg SM, Venzon DJ, Walsh TJ, et al. Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1998; 102(12):2146-55.
20. Foster CB, Chanock SJ. Mining variations in genes of innate and phagocytic immunity: current status and future prospects. *Curr Opin Hematol* 2000; 7(1):9-15.

Recebido e aceito para publicação em 14 de abril de 2004.