

## Estudio de la asociación de la proteína Nef del VIH con componentes del complejo NADPH-oxidasa de neutrofilos humanos

### RESUMEN

Durante la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la presencia de un número disminuido de neutrófilos en estos pacientes se acompaña por múltiples anormalidades de la función de estas células, lo que compromete su capacidad para eliminar bacterias y elementos fúngicos. Estas anormalidades incluyen: el deterioro de la quimiotaxis y fagocitosis, alteración en la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular, producción de ROS e incremento de la muerte celular programada. La función defectuosa de estas células ha sido demostrada tanto en pacientes sintomáticos como en asintomáticos portadores del virus y existen evidencias de efectos directos de proteínas del virus sobre la función de estas células. La proteína accesoria Nef del VIH, es esencial para la progresión de la infección, es requerida para la asociación del virus con membranas celulares y es crítica para gran parte de sus actividades biológicas. Sus características estructurales le permiten interactuar con múltiples elementos celulares ocasionando diversas funciones. Basándonos en las características estructurales y funcionales de Nef y en evidencias previas que indican que esta proteína ejerce efectos diversos sobre la línea celular HL-60 se decidió estudiar su efecto sobre la producción de superóxido. Para este propósito, la proteína Nef fue expresada y purificada mediante módulos de glutation/sefarosa hasta obtener GST-Nef soluble. Una vez obtenida la proteína GST-Nef fue utilizada en ensayos *in vitro* para medir su efecto en la producción de superóxido en PMN humanos, utilizando como señal de lectura la oxidación de dihidrorodamina. Se observó que los neutrófilos previamente incubados con GST-Nef, mostraron una reducción significativa de la producción de superóxido, al ser estimulados con fMLP, diferencias contrastantes con las observadas cuando los PMN fueron tratados con GST solo ( $28\% \pm 12$  vs  $40\% \pm 22$ , respectivamente). Para indagar sobre posibles mecanismos de acción de Nef sobre la función de los PMN, se utilizó el módulo GST-Nef/sefarosa para realizar ensayos de precipitación en búsqueda de proteínas asociadas, especialmente las proteínas del complejo NADPH-oxidasa. Estos ensayos permitieron la detección de una asociación específica entre GST-Nef y la proteína p22-phox del complejo proteico. Estos resultados sugieren que Nef actúa sobre el complejo NADPH-oxidasa y modula la producción de superóxido, probablemente a través de su interacción con p22-phox, interfiriendo con el ensamblaje apropiado del complejo enzimático.

## SUMMARY

During human immunodeficiency virus (HIV) infection, the presence of a reduced number of neutrophils (PMN) along with multiple dysfunctions of these cells affects their ability to eliminate bacterial and fungus. These abnormalities include: a detriment of chemotaxis and phagocytosis, altered adhesion molecules expression on cell surface, altered superoxide production and elevated cell death. A defective function of these cells has been proved both in symptomatic and asymptomatic carriers of the virus and, there are evidences of direct effects of viral proteins on neutrophils function. The accessory protein from HIV named Nef is essential for the progression of the infection, it is required for viral association to cell membranes and, it is critical for a significant amount of viral biological activities. The structural characteristics of Nef allow its interaction with multiple cell substrates producing several effects. Based on Nef structural and functional distinctiveness and because previous evidences suggested a direct effect of Nef on the HL-60 cell line, we decide to study Nef effects on human PMN superoxide production. To this purpose, Nef was expressed and purified using glutathione/sepharose affinity columns to obtain GST-Nef. Once eluted from the column, soluble GST-Nef was used in *in vitro* assays to determinate its effect on PMN superoxide production, using the oxidation of Dihydrorhodamine as a redout. A significant reduction of superoxide production was observed in neutrophils pre-incubated with GST-Nef, following by stimulation with fMLP, in contrast to the superoxide production observed in neutrophils pre-incubated with GST alone ( $28\% \pm 12$  vs  $40\% \pm 22$ , respectively). To explore about possible action mechanisms of GST-Nef on PMN function, we performed pull down experiments using glutathione/sepharose/GST-Nef to search for associated proteins, particularly components of the NADPH-oxidase complex. The performed assays demonstrated that GST-Nef specifically associates with the p22-phox membrane component of the complex. These results suggest that Nef acts on the NADPH-oxidase complex modulating the superoxide production, perhaps trough its association with p22-phox, interfering with the assemble of the enzymatic complex.