



The microbicidal activity of neutrophils : cellular and molecular mechanisms and their dysfunctions

Federica Defendi

► **To cite this version:**

Federica Defendi. The microbicidal activity of neutrophils : cellular and molecular mechanisms and their dysfunctions . Life Sciences [q-bio]. Universite Joseph Fourier; Università degli studi di Trieste, italie, 2010. Italian. <tel-01147407>

HAL Id: tel-01147407

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01147407>

Submitted on 30 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE GRENOBLE
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

THESE

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Grenoble

Spécialité : Physiologie, Physiopathologies et Pharmacologie

Présentée et soutenue publiquement par

Federica DEFENDI

Le 22 avril 2010

**LA BACTERICIDIE DES NEUTROPHILES :
MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES
ET LEURS DYSFONCTIONS**

Thèse encadrée par le Docteur Marie-José Stasia et le Professeur Pietro Dri

Composition du jury :

| | |
|-------------|-------------------------------------------------------------|
| Président | Professeur Giuliano ZABUCCHI |
| Rapporteurs | Professeur Flavia BAZZONI Professeur Giuseppe LUNGARELLA |
| Examineurs | Docteur Bernard LARDY Docteur Marie-José STASIA |

Thèse préparée au sein du **Centre Diagnostic et Recherche sur la CGD**
- Equipe TheREX , Laboratoire TIMC-Imag UMR CNRS 5525 -
et du **Département de Sciences de la vie** - Université de Trieste

Table des matières

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| I. INTRODUCTION..... | I |
| I.A Les polynucléaires neutrophiles (PMN) | I |
| I.A.1 Phagocytose et « killing » des microorganismes pathogènes..... | I |
| I.A.2 Mécanismes bactéricides oxygène dépendants..... | II |
| I.A.2.1 La NADPH oxydase des phagocytes..... | II |
| I.A.2.2.La myeloperoxydase..... | IV |
| I.A.3 Mécanismes bactéricides oxygène indépendants..... | V |
| I.A.3.1 Composition et génération des granules cytoplasmiques..... | V |
| I.A.3.2 Significat de la dégranulation dans la réponse inflammatoire aigüe..... | VII |
| I.A.4 Les NETs (<i>Neutrophils Extracellular Traps</i>)..... | VIII |
| I.A.5 Rôle de la compensation de charge dans la bactéricidie des neutrophiles..... | IX |
| I.B La granulomatose septique chronique (CGD)..... | IX |
| I.B.1 Base physiopathologiques de la CGD..... | X |
| I.C Les PLB-985 comme modèle cellulaire..... | XII |
| II OBJECTIFS DE LA THESE..... | XIII |
| III RESULTATS – Partie A..... | XV |
| III.A Rôle de la myeloperoxydase dans la bactéricidie des neutrophiles..... | XV |
| III.A.1 Rôle de la NADPH oxydase dans le killing de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> et <i>C.</i> <i>albicans</i> | XVI |
| III.A.2 Rôle des flux de K ⁺ | XVII |
| III.A.3 Rôle de l’alcalinization intraphagosomale..... | XVIII |
| III.A.4 Rôle du système MPO-H ₂ O ₂ -Cl ⁻ | XIX |
| III.A.4.1 Effet de l’inhibition du système MPO-dépendant sur le killing de <i>S. aureus</i> et <i>C. albicans</i> | XIX |
| III.A.4.2 Bactéricidie des neutrophiles des sujets MPO-déficients..... | XIX |
| III.A.5 “Killing” MPO-indépendant..... | XX |
| III RESULTATS – Partie B..... | XXI |
| III.B Etude des mécanismes moléculaires de la bactéricidie des neutrophiles dans les cellules PLB-985..... | XXI |
| III.B.1 Le mutant Dloop _{Nox4} -Nox2..... | XXI |
| III.B.2 Vérification de l’expression de la NADPH oxydase..... | XXII |
| III.B.3 Evaluation simultanée de l’expression de Nox2 et de l’activité oxydase par cytométrie en flux..... | XXIII |
| III.B.4 Mésure du métabolisme oxydatif par chimioluminescence..... | XXIII |
| III.B.5 Evaluation de la bactéricidie des cellules PLB-985 WT-Nox2 et Dloop _{Nox4} -Nox2..... | XXIV |
| III.B.6 Caractérisation des compartiments intracellulaires des cellules PLB- 985..... | XXV |
| III.B.6.1 Test d’exocytose..... | XXVI |
| III.B.6.2 Dosage des protéines..... | XXVI |
| III.B.6.3 Test de viabilité cellulaire : dosage de la LDH..... | XXVII |
| III.B.6.4 Granules primaires..... | XXVII |
| III.B.6.5 Granules secondaires..... | XXIX |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| III.B.6.6 Granules tertiaires..... | XXXI |
| III.B.6.7 Vésicules sécrétoires..... | XXXII |
| III RESULTATS – Partie C..... | XXXIV |
| III.C Identification d'une nouvelle mutation ponctuelle dans le promoteur du gène <i>CYBB</i> responsable d'un cas rare de CGD X91..... | XXXIV |
| III.C.1 Diagnostic de CGD..... | XXXV |
| III.C.2 Mesure de l'activité NADPH oxydase..... | XXXV |
| III.C.3 Vérification de l'expression de <i>gp91phox</i> dans les neutrophiles et les éosinophiles..... | XXXVI |
| III.C.4 Identification du défaut moléculaire..... | XXXVI |
| III.C.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)..... | XXXVII |
| III.C.6 PCR semi-quantitative..... | XXXVII |
| III.C.7 Mesure de la bactéricidie des neutrophiles du patient..... | XXXVIII |
| IV CONCLUSIONS..... | XXXIX |

Indice degli argomenti

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUZIONE..... | 1 |
| 1.A I leucociti polimorfonucleati neutrofili (PMN)..... | 1 |
| 1.A.1 I PMN nella risposta infiammatoria acuta..... | 2 |
| 1.A.2 Fagocitosi e uccisione dei microorganismi patogeni..... | 4 |
| 1.B Meccanismi microbicidi ossigeno dipendenti..... | 6 |
| 1.B.1 La NADPH ossidasi dei fagociti..... | 6 |
| 1.B.1.1 Struttura del complesso NADPH ossidasi..... | 7 |
| 1.B.1.2 Attivazione del complesso NADPH ossidasi..... | 11 |
| 1.B.2 La Mieloperossidasi (MPO)..... | 12 |
| 1.C Meccanismi microbicidi ossigeno indipendenti..... | 13 |
| 1.C.1 Composizione dei granuli citoplasmatici..... | 13 |
| 1.C.1.A Granuli primari o <i>azurofili</i> | 15 |
| 1.C.1.B Granuli secondari o <i>specifici</i> | 17 |
| 1.C.1.C Granuli terziari o <i>ricchi in gelatinasi</i> | 19 |
| 1.C.1.D Vescicole secretorie..... | 20 |
| 1.C.2 Granulogenesi..... | 20 |
| 1.C.3 Trasporto e fusione membrana/granuli..... | 22 |
| 1.C.4 Significato della degranolazione nella risposta infiammatoria acuta neutrofilo-mediata..... | 25 |
| 1.C.5 Meccanismi di degranolazione..... | 26 |
| 1.D NETs (<i>Neutrophil extracellular traps</i>)..... | 27 |
| 1.E Ruolo della compensazione di carica nell'attività microbicida dei neutrofili.... | 28 |
| 1.E.1 Compensazione di carica via ioni H ⁺ | 29 |
| 1.E.2 Compensazione di carica via ioni K ⁺ | 29 |
| 1.E.3 Compensazione di carica via ioni Cl ⁻ | 30 |
| 1.F La malattia granulomatosa cronica (CGD)..... | 30 |
| 1.F.1 Basi fisiopatologiche della CGD..... | 31 |
| 1.F.2 Diagnosi clinica della CGD..... | 33 |
| 1.F.3 Diagnosi biochimica..... | 33 |
| 1.F.4 Trattamento, prognosi e prospettive terapeutiche..... | 35 |
| 1.G Gli omologhi di Nox2: Nox e Duox..... | 37 |
| 1.H Le PLB-985 come modello cellulare..... | 39 |
| | |
| 2. OBIETTIVI DELLA TESI..... | 42 |
| | |
| 3. MATERIALI E METODI..... | 44 |
| 3.A Cellule e anticorpi..... | 44 |
| 3.A.1 Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofili da sangue venoso umano..... | 44 |
| 3.A.1a Metodo modificato da Böyum et al., 1968..... | 44 |
| 3.A.1b Metodo modificato da Metcalf et al., 1986..... | 45 |
| 3.A.2 Coltura della linea cellulare PLB-985..... | 46 |
| 3.A.3 Differenziazione delle cellule PLB-985..... | 47 |
| 3.A.4 Congelamento e scongelamento delle cellule PLB-985..... | 47 |
| 3.A.5 Immortalizzazione di linfociti B con il virus di Epstein-Barr..... | 48 |
| 3.A.6 Preparazione di <i>Candida albicans</i> | 49 |
| 3.A.7 Preparazione di <i>Staphylococcus aureus</i> ed <i>Escherichia Coli</i> | 49 |
| 3.A.8 Anticorpi..... | 51 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.B Preparazione degli estratti cellulari..... | 51 |
| 3.C Analisi proteica..... | 52 |
| 3.C.1 Dosaggio delle proteine..... | 52 |
| 3.C.1a Metodo di Bradford..... | 52 |
| 3.C.1b Metodo dell'acido biconinico, BCA..... | 53 |
| 3.C.2 Separazione delle proteine in gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE)..... | 53 |
| 3.C.2.1 Preparazione del gel di poliacrilammide..... | 53 |
| 3.C.2.2 Preparazione dei campioni e migrazione elettroforetica..... | 54 |
| 3.C.2.3 Rivelazione di proteine su gel di poliacrilammide..... | 55 |
| 3.C.3 Western Blotting..... | 55 |
| 3.C.3.1 Trasferimento di proteine su membrana..... | 55 |
| 3.C.3.2 Rivelazione delle proteine..... | 56 |
| 3.C.4 Spettro di assorbimento differenziale del citocromo b ₅₅₈ | 56 |
| 3.D Valutazione dell'espressione e dell'attività NADPH-ossidasi..... | 57 |
| 3.D.1 Citometria a flusso..... | 57 |
| 3.D.1.1 Valutazione dell'espressione di Nox2..... | 58 |
| 3.D.1.2 Misura della produzione di perossido di idrogeno (test di ossidazione della DHR)..... | 58 |
| 3.D.1.3 Valutazione simultanea dell'espressione di Nox2 e dell'attività NADPH ossidasi..... | 59 |
| 3.D.1.4 Valutazione dell'espressione di Nox2 in neutrofili ed eosinofili.. | 60 |
| 3.D.2 Test del Nitroblu di Tetrazolio (NBT)..... | 61 |
| 3.D.3 Misura della chemiluminescenza..... | 62 |
| 3.D.4 Misura della produzione di anione superossido..... | 63 |
| 3.E Metodiche di biologia molecolare..... | 64 |
| 3.E.1 Reazione polimerasica a catena (PCR)..... | 64 |
| 3.E.2 Preparazione e dosaggio degli acidi nucleici..... | 65 |
| 3.E.2.1 Preparazione degli RNA totali..... | 65 |
| 3.E.2.2 Preparazione del DNA complementare (cDNA) di gp91 <i>phox</i> , amplificazione e sequenziamento..... | 66 |
| 3.E.2.3 Dosaggio degli acidi nucleici..... | 67 |
| 3.E.2.4 Amplificazione del DNA genomico..... | 67 |
| 3.E.2.5 PCR semiquantitativa..... | 67 |
| 3.E.3 Estrazione del DNA plasmidico e digestione dell'inserito con enzimi di restrizione BamH1..... | 68 |
| 3.E.4 Transfezione stabile dei plasmidi pEF-PGKneo nella linea cellulare PLB-985 X-CGD..... | 69 |
| 3.F Valutazione dell'attività microbica mediante conta delle unità formanti colonie..... | 70 |
| 3.G Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)..... | 72 |
| 3.G.1 Preparazione degli estratti nucleari..... | 72 |
| 3.G.2 Preparazione degli oligonucleotidi marcati..... | 72 |
| 3.G.3 Saggio EMSA..... | 72 |
| 3.H Saggio di degranolazione..... | 73 |
| 3.H.1 Dosaggio della lattato deidrogenasi (LDH)..... | 74 |
| 3.H.2 Dosaggio della mieloperossidasi (MPO)..... | 75 |
| 3.H.3 Dosaggio dell'elastasi..... | 75 |
| 3.H.4 Dosaggio della catepsina G..... | 76 |
| 3.H.5 Dosaggio della β -glucuronidasi..... | 76 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.H.6 Dosaggio del lisozima..... | 77 |
| 3.H.7 Dosaggio della lattoferrina (LF)..... | 78 |
| 3.H.8 Dosaggio della collagenasi (MMP-8)..... | 78 |
| 3.H.9 Dosaggio della gelatinasi (MMP-9) | 79 |
| 3.H.10 Dosaggio del CD11b..... | 80 |
| 4. RISULTATI – Parte A..... | 82 |
| 4.A Ruolo della Mieloperossidasi nell'attività microbica dei neutrofilo..... | 83 |
| 4.A.1 Ruolo della NADPH ossidasi nel killing di <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> | 84 |
| 4.A.2 Ruolo dei flussi di K ⁺ | 86 |
| 4.A.3 Ruolo dell'alcalinizzazione intrafagosomale..... | 87 |
| 4.A.4 Ruolo del sistema MPO-H ₂ O ₂ -Cl ⁻ | 89 |
| 4.A.4.1 Effetto dell'inibizione del sistema MPO-dipendente sul killing di <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> | 89 |
| 4.A.4.2 Attività microbica dei neutrofilo di soggetti MPO-deficienti.... | 90 |
| 4.A.5 Killing MPO-indipendente..... | 92 |
| 4.A.6 Discussione – Parte A..... | 94 |
| 4. RISULTATI – Parte B..... | 98 |
| 4.B Studio dei meccanismi molecolari dell'attività microbica dei neutrofilo nelle cellule PLB-985..... | 99 |
| 4.B.1 La scelta della linea cellulare PLB-985..... | 99 |
| 4.B.2 Il mutante Dloop _{Nox4} -Nox2..... | 100 |
| 4.B.3 Verifica dell'espressione di Nox2..... | 102 |
| 4.B.4 Valutazione simultanea dell'espressione di Nox2 e dell'attività ossidativa tramite citometria a flusso..... | 105 |
| 4.B.5 Misura del metabolismo ossidativo per chemiluminescenza..... | 106 |
| 4.B.6 Valutazione dell'attività microbica di cellule WT-Nox2 e Dloop _{Nox4} -Nox2..... | 110 |
| 4.B.7 Caratterizzazione dei compartimenti intracellulari delle cellule PLB-985. | 114 |
| 4.B.7.1 Valutazione della differenziazione delle cellule PLB-985 WT.... | 116 |
| 4.B.7.3 Dosaggio delle proteine..... | 116 |
| 4.B.7.4 Test di vitalità cellulare: dosaggio della LDH..... | 117 |
| 4.B.7.5 Dosaggio della mieloperossidasi (MPO)..... | 118 |
| 4.B.7.6 Dosaggio dell'elastasi..... | 120 |
| 4.B.7.7. Dosaggio della catepsina G..... | 122 |
| 4.B.7.8 Dosaggio della β-glucuronidasi..... | 124 |
| 4.B.7.9 Dosaggio della lattoferrina (LF)..... | 126 |
| 4.B.7.10 Dosaggio del lisozima..... | 126 |
| 4.B.7.11 Dosaggio della collagenasi (MMP-8)..... | 128 |
| 4.B.7.12 Dosaggio della gelatinasi (MMP-9)..... | 128 |
| 4.B.7.13 Dosaggio di CD11b..... | 129 |
| 4.B.8 Discussione – Parte B..... | 131 |
| 4. RISULTATI – Parte C..... | 138 |
| 4.C Identificazione di una nuova mutazione puntiforme nel promotore del gene <i>CYBB</i> responsabile di un raro caso di CGD X91' | 139 |
| 4.C.1 Descrizione dei casi clinici..... | 140 |
| 4.C.2 Diagnosi di CGD..... | 142 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.C.3 Misura dell'attività ossidasica..... | 144 |
| 4.C.4 Verifica dell'espressione di gp91 <i>phox</i> in neutrofili ed eosinofili..... | 145 |
| 4.C.5 Identificazione del difetto molecolare..... | 149 |
| 4.C.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) | 151 |
| 4.C.7 PCR semiquantitativa..... | 152 |
| 4.C.8 Misura dell'attività microbica dei neutrofili del paziente..... | 153 |
| 4.C.9 Discussione – Parte C..... | 154 |
| 5. CONCLUSIONE..... | 158 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 160 |

ALLEGATI

Allegato 1: Attività stafilocida di neutrofili di madri portatrici della CGD X91⁰

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI

Indice delle Figure

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1: Fasi dell'extravasazione dei neutrofili..... | Pag. 3 |
| Figura 2: Rappresentazione schematica della struttura di Nox2..... | 8 |
| Figura 3: Modello di assemblaggio del complesso NADPH ossidasi dei fagociti..... | 11 |
| Figura 4: Formazione dei granuli e delle vescicole secretorie durante la differenziazione della cellula mieloide..... | 21 |
| Figura 5: Killing extracellulare di <i>S. aureus</i> intrappolato da fibre neutrofiliche..... | 28 |
| Figura 6: Compensazione della carica elettrica nel funzionamento del complesso ossidasi..... | 29 |
| Figura 7 : Modello strutturale dei diversi sottotipi di enzimi Nox e Duox..... | 38 |
| Figura 8: Morfologia delle cellule PLB-985 in microscopia a trasmissione elettronica..... | 40 |
| Figura 9: Costruzione della linea cellulare PLB-985 X-CGD (KO)..... | 41 |
| Figura 10: Digestione enzimatica da parte dell'enzima di restrizione BamH1 del plasmide BlueScriptKS ⁺ contenente il cDNA di Nox2..... | 69 |
| Figura 11: Cinetiche di killing di <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> da parte di neutrofili di controllo, trattati con DPI e neutrofili CGD..... | 85 |
| Figura 12: Ruolo dei flussi di potassio nell'attività microbica dei neutrofili..... | 87 |
| Figura 13: Ruolo dell'alcalinizzazione fagosomale nell'attività microbica dei neutrofili..... | 88 |
| Figura 14: Ruolo del sistema MPO-alogenuro nell'attività microbica dei neutrofili... | 89 |
| Figura 15: Cinetica di killing di <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> da parte di neutrofili di controllo, neutrofili trattati con KCN e neutrofili di soggetti MPO ⁻ deficienti..... | 90 |
| Figura 16: Attività stafilocida e candidacida di neutrofili di controllo, neutrofili di soggetti CGD e neutrofili di soggetti MPO-deficienti..... | 91 |
| Figura 17: Effetto di inibitori della MPO e scavengers di HOCl sull'attività stafilocida e candidacida di neutrofili trattati con DPI in presenza di GO.... | 92 |
| Figura 18: Killing MPO-indipendente..... | 93 |
| Figura 19: A) Rappresentazione schematica della struttura di Nox2. B) Mutagenesi del loop D citosolico ¹⁹¹ TSSTKTIRRS ²⁰⁰ | 101 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 20: Espressione della proteina Nox2 wild type e mutata nelle cellule PLB-985 transfettate. A) Analisi citofluorimetrica. B) Immunorivelazione tramite western blot della proteina Nox2..... | 103 |
| Figura 21 : Misura simultanea dell'espressione di Nox2 e dell'attività NADPH ossidasica di cellule differenziate PLB-985 WT- Nox2, Dloop _{Nox4} -Nox2 e X-CGD..... | 106 |
| Figura 22 : Produzione di ROS nelle cellule differenziate PLB-985 transfettate e nei neutrofili umani dopo stimolazione con <i>S. aureus</i> | 108 |
| Figura 23: Produzione di ROS nelle cellule differenziate PLB-985 transfettate e nei neutrofili umani dopo stimolazione da <i>C. albicans</i> | 110 |
| Figura 24: Attività staffilocida di PMN umani, cellule PLB-985 WT-Nox2 e Dloop _{Nox4} -Nox2..... | 111 |
| Figura 25: Cinetiche di attività staffilocida (A) e candidacida (B) di cellule PLB-985 transfettate e neutrofili umani..... | 112 |
| Figura 26: Cinetiche di killing di <i>E. coli</i> da parte di cellule PLB-985 transfettate e neutrofili umani..... | 114 |
| Figura 27: Metabolismo ossidativo di cellule PLB-985 WT indifferenziate (G0) e differenziate (G2 – G6) stimulate con fMLF..... | 116 |
| Figura 28: Rilascio della MPO nei surnatanti di esocitosi di PMN umani e cellule PLB-985 WT..... | 120 |
| Figura 29: Rilascio dell'elastasi nei surnatanti di esocitosi di cellule PLB-985 WT e PMN umani..... | 122 |
| Figura 30: Rilascio della catepsina G nei surnatanti di esocitosi di cellule PLB-985 WT e PMN umani..... | 124 |
| Figura 31: Rilascio della β -glucuronidasi nei surnatanti di esocitosi di cellule PLB-985 WT e PMN umani..... | 125 |
| Figura 32: Rilascio del lisozima nei surnatanti di esocitosi di cellule PLB-985 WT e PMN umani..... | 127 |
| Figura 33: Zimogramma dell'attività gelatinasica di cellule PLB-985 WT..... | 129 |
| Figura 34: Espressione di superficie di CD11b nelle cellule PLB-985 WT e PMN umani..... | 130 |
| Figura 35: Albero genealogico della famiglia C..... | 140 |
| Figura 36: Test NBT su neutrofili del paziente II-2..... | 143 |
| Figura 37: Istogrammi citofluorimetrici della produzione di perossido di idrogeno da parte di pazienti CGD..... | 144 |
| Figura 38: Analisi citofluorimetrica della produzione di perossido di idrogeno da parte di neutrofili ed eosinofili nella popolazione di granulociti di un soggetto di controllo e del paziente II-2 a riposo o dopo stimolazione da PMA..... | 146 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 39: Spettro ridotto meno ossidato e western blot del citocromo b_{558} di neutrofilo di pazienti CGD..... | 147 |
| Figura 40: Analisi citofluorimetrica dell'espressione di superficie di $gp91^{phox}$ in neutrofilo ed eosinofilo..... | 149 |
| Figura 41: Analisi della mutazione nel gene <i>CYBB</i> del paziente II-2..... | 150 |
| Figura 42: Electrophoretic Mobility Shift Assay..... | 151 |
| Figura 43: Amplificazione tramite RT-PCR semiquantitativa del mRNA di $gp91^{phox}$ del paziente II-2..... | 152 |
| Figura 44: Attività microbica di neutrofilo di pazienti CGD X..... | 153 |

Indice delle Tabelle

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tabella 1. Proteine granulari dei neutrofilo..... | Pag.14 |
| Tabella 2. Le diverse forme di CGD..... | 32 |
| Tabella 3: Quantità di citocromo b_{558} (espressa in pmoli/mg di proteine) nelle cellule PLB-985 transfettate e nei neutrofilo umano..... | 104 |
| Tabella 4: Attività NADPH ossidasi di cellule PLB-985 e di neutrofilo umano indotta da stimoli solubili..... | 107 |
| Tabella 5: Concentrazione proteica dei campioni provenienti dall'esocitosi di PMN e cellule PLB-985..... | 117 |
| Tabella 6: Dosaggio della lattato deidrogenasi (LDH) nei campioni di esocitosi dei PMN e delle cellule PLB WT..... | 118 |
| Tabella 7: Dosaggio della MPO nei neutrofilo umano e nelle cellule PLB-985 WT..... | 119 |
| Tabella 8: Dosaggio dell'elastasi in neutrofilo umano e cellule PLB-985 WT..... | 121 |
| Tabella 9: Dosaggio della catepsina G in neutrofilo umano e cellule PLB-985 WT..... | 123 |
| Tabella 10: Dosaggio della β -glucuronidasi in neutrofilo umano e cellule PLB-985 WT..... | 125 |
| Tabella 11: Dosaggio del lisozima in neutrofilo umano e cellule PLB-985 WT..... | 127 |
| Tabella 12: Produzione di anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), riduzione del NBT e contenuto di citocromo b_{558} dei neutrofilo dei membri della famiglia C e della famiglia di un paziente CGD affetto dalla forma classica X91 ⁰ | 142 |

I. INTRODUCTION

I.A Les polynucléaires neutrophiles (PMN)

Les polynucléaires neutrophiles (PMN) représentent la principale défense de l'organisme contre les microorganismes pathogènes. En tant que phagocytes professionnels, les PMN sont en effet capables de phagocyter et de détruire les agents infectieux. Les neutrophiles sont synthétisés dans la moelle osseuse et sont libérés dans la circulation sanguine après plusieurs étapes de maturation et de différenciation (Imhof et al., 2004): les cellules destinées à former la lignée granulocytaire évoluent en myéloblastes, promyélocytes, métamyélocytes, granulocytes non segmentés et, finalement, en PMN matures. Les neutrophiles représentent environ 70% de la population des granulocytes circulants.

Au microscope optique elles apparaissent comme des cellules de 12-14 μm de diamètre, avec un noyau multilobé. Le cytoplasme est riche en granules contenant différents enzymes et protéines antibactériennes qui jouent un rôle essentiel dans la dégradation des microorganismes internalisés mais également dans la réponse inflammatoire. En particulier, quatre populations de granules ont été identifiées: les granules primaires ou azurophiles, les secondaires ou spécifiques, les tertiaires ou riches en gélatinase, et les vésicules sécrétoires.

1.A.1 Phagocytose et «killing» des microorganismes pathogènes

Le processus qui conduit à la bactéricidie des pathogènes se décompose en plusieurs étapes: reconnaissance et adhésion à la particule, ingestion, «killing» et digestion des microorganismes. L'internalisation des bactéries s'accompagne de la production de molécules pro-inflammatoires et de l'activation des mécanismes bactéricides. Les neutrophiles sont en effet capables de tuer les pathogènes internalisés grâce à la coopération des plusieurs processus:

- la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS), déclenchée par l'activation du complexe enzymatique de la NADPH oxydase (mécanismes oxygène-dépendants);
- la dégranulation des compartiments intra-cytoplasmique dans le phagolysosome, avec le relargage des protéases et des protéines antibactériennes (mécanismes oxygène indépendants);

- la formation, récemment mise en évidence, des *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs).

Une particule opsonisée est internalisée dans le phagosome en environ 20 secondes, et tuée quasi immédiatement (Segal AW et al., 1981).

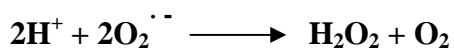
I.A.2 Mécanismes bactéricides oxygène dépendants

I.A.2.1 La NADPH oxydase des phagocytes

La phagocytose des microorganismes pathogènes s'accompagne d'une augmentation du métabolisme oxydatif, événement défini comme le "*burst*", ou explosion respiratoire. L'enzyme responsable de cette activité est la NADPH oxydase. En réponse à un stimulus inflammatoire, la NADPH oxydase catalyse le transfert des électrons, du donneur d'électron le NADPH, provenant du "shunt" des pentose-phosphates, vers l'accepteur, l'oxygène moléculaire, dans le phagosome ou dans l'espace extracellulaire, ce qui permet ainsi la génération d'anions superoxyde:

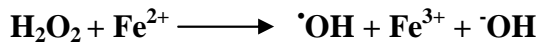


Les neutrophiles produisent de grandes quantités d'anions superoxyde, qui atteint dans la vacuole une concentration correspondante à 1-4 moles/litre (Klebanoff et al., 1969; Reeves et al., 2002). La concentration de $\text{O}_2^{\cdot -}$ à l'équilibre est de l'ordre du micro-molaire (Hampton et al., 1998) à cause de la rapide dismutation du superoxyde, spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) pour produire le peroxyde d'hydrogène

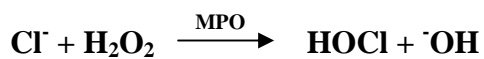


Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) généré est une forme réduite de l'oxygène moyennement toxique; sa concentration dans les neutrophiles est régulée par des enzymes telles que la catalase (présente dans les peroxysomes) et la glutathion peroxydase (dans le cytoplasme). La toxicité du

peroxyde d'hydrogène est due à sa capacité de générer le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) en présence des cations métalliques comme le fer (Fe^{2+}) dans la réaction de Fenton:



Le peroxyde d'hydrogène peut être transformé en acide hypochloreux (HOCl) dans la réaction catalysée par la myeloperoxydase (MPO) en présence d'halogénure, comme le chlorure (Cl^-):



L'acide hypochloreux possède un fort pouvoir bactéricide: grâce à l'interaction avec les acides aminés de la paroi bactérienne, il forme des chloramides, molécules très instables qui se transforment en aldéhydes; ces dernières, en créant des liaisons croisées entre les protéines, forment des pores dans la paroi du microorganisme.

Structure et activation du complexe NADPH oxydase

La NADPH oxydase est un complexe multi-protéique composé d'un élément membranaire, le cytochrome b_{558} , de protéines cytosoliques $p47phox$, $p67phox$ et $p40phox$ (*phox* pour « phagocytic oxidase ») et de deux petites protéines G Rac1/2 et Rap1A (Figure 2).

Dans les phagocytes au repos, les différentes sous-unités de l'oxydase sont dissociées et réparties dans leurs compartiments respectifs. Les trois protéines cytosoliques sont associées sous forme d'un hétéro-trimère dans le cytosol ; la protéine Rac cytosolique est associée à son inhibiteur RhoGDI , tandis que Rap1A est ancrée dans la membrane. L'activation du complexe oxydase nécessite la translocation des facteurs cytosoliques vers le dimère $gp91phox/p22phox$, composant le cytochrome b_{558} . En parallèle, Rac échange son GDP contre le GTP , ce qui provoque un changement conformationnel qui ne favorise l'interaction avec les lipides de la membrane et l'association à $p67phox$. La phosphorylation de $p47phox$ détermine un changement conformationnel qui favorise son interaction avec $p22phox$. La localisation de $p47phox$ à la membrane plasmique permet la liaison de la sous-unité $p67phox$ à Nox2 dans un processus diphasique composé premièrement par l'interaction directe avec $gp91phox$, suivi par l'interaction avec $p67phox$. Une fois assemblé, le complexe oxydase est actif et capable de

générer des anions superoxyde en transférant des électrons de du NADPH cytoplasmique à l'oxygène dans la lumière phagosomal ou dans le milieu extracellulaire (Figure 3).

I.A.2.2 La Myeloperoxydase (MPO)

La myeloperoxydase est synthétisée à partir d'un seul gène de 11 kb environ, composé par 11 introns et 12 exons, localisé au niveau du bras long du chromosome 17. La traduction conduit à la formation d'une protéine de 80 kDa, qui après clivage protéolytique d'un peptide signal de 41 acides aminés, puis une N-glycosylation avec incorporation d'une chaîne riche en résidus mannose, génère la apo-pro-MPO enzymatiquement inactive d'environ 89-90 kDa.

Ce précurseur forme dans le réticulum endoplasmique un complexe avec deux protéines qui lient le calcium, la calreticuline et la calnexine, qui agissent comme chaperonnes. Avec l'insertion d'une molécule d'hème, la apo-pro-MPO est convertie en pro-MPO enzymatiquement active. Les deux clivages protéolytiques suivants permettent la formation d'une chaîne lourde α de 51 kDa et une chaîne légère β de 12 kDa. La myeloperoxydase mature est une hémoprotéine composée par deux hétérodimères identiques; les deux moitiés sont liées avec des ponts disulfures entre les deux chaînes lourdes. Les deux hèmes présentent des propriétés spectrales assez originales qui produisent une couleur verte: la MPO était en effet initialement nommée verdoperoxydase (Agner, 1941; Klebanoff SJ., 2005).

La MPO représente environ 5% des protéines totales des neutrophiles, localisée à concentration élevée dans les granules azurophiles. La MPO représente environ 25% des protéines granulaires. Une fois sécrétée dans la vacuole de phagocytose, pendant l'activation cellulaire, sa concentration est de l'ordre de 100 mg/mL (1 mM). La myeloperoxydase catalyse l'oxydation H_2O_2 -dépendante de plusieurs substrats, tels que les chlorures, fluorures, bromures et iodures. Les acides correspondants formés sont fortement réactifs et mortels pour la plupart des microorganismes. Vu les concentrations élevées des chlorures dans le cytoplasme et dans le phagosome, l'acide hypochloreux (HOCl) est l'acide produit en majorité. L'HOCl est un agent fortement oxydant qui réagit avec un large spectre de molécules biologiques, principalement les thiols, thioesters, amines, phénols et liaisons insaturées; de plus, il est capable de traverser les membranes.

I.A.3 Mécanismes bactéricides oxygène indépendants

Les différentes populations granulaires des neutrophiles constituent un important réservoir de protéines antibactériennes, protéases, composants du *burst* respiratoire, récepteurs membranaires pour molécules d'adhésion endothéliales, protéines de la matrice extracellulaire et médiateurs solubles de l'inflammation. La mobilisation contrôlée de ces composants cytoplasmiques permet la transformation des neutrophiles en puissants effecteurs de l'immunité innée. De plus, l'exocytose finement réglée des granules permet aux neutrophiles de libérer de façon précise leur arsenal de protéines granulaires potentiellement cytotoxiques.

Dans les neutrophiles à repos, les compartiments granulaires sont dispersés dans le cytoplasme; suite à l'activation par les stimuli solubles ou particuliers, les granules fusionnent avec la membrane plasmique et/ou avec le phagosome, en libérant leur contenu. Quatre compartiments granulaires cytoplasmiques ont été identifiés:

- granules primaires ou azurophiles ;
- granules secondaires ou spécifiques;
- granules tertiaires ou riche en gélatinase ;
- vésicules sécrétoires.

I.A.3.1 Composition et génération des granules cytoplasmiques

Le Tableau 1 montre la localisation des principales protéines contenues dans les granules et dans les vésicules sécrétoires des neutrophiles. Les granules des neutrophiles sont formés pendant la différenciation de la cellule myéloïde (Figure 4). La synthèse des granules débute précocement dans la phase de transition du précurseur neutrophile immature au stade de promyélocyte, quand les vésicules de transport immatures sortent de l'appareil de Golgi et fusionnent entre elles (Baiton et al., 1966 et 1971; Hartmann et al., 1995). Les premiers granules à apparaître ont au départ été définis comme « granules peroxydase positifs », sur la base de leur contenu élevé en myeloperoxydase ou « granules azurophiles » sur la base de leur affinité pour le colorant basic azur A, ou plus simplement comme « granules primaires ». La production de MPO s'arrête au stade de différenciation entre promyélocyte et myélocyte. Par conséquence, les granules formés dans les phases suivantes de la myélopoïèse sont nommés peroxydase-négatifs : il s'agit des granules secondaires ou spécifiques et tertiaires ou riches en gélatinase.

Tableau 1. Protéines granulaires des neutrophiles^{a,b} (D'après Borregaard et al., 2007)

| | Granules azurophiles | Granules spécifiques | Granules tertiaires | Vésicules sécrétoires |
|------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Protéines membranaires | CD63, CD68 Preseniline | CD11b/CD18, CD66, CD67 | CD11b/CD18, CD67 | CD11b/CD18, CD67 |
| | | Cytochrome b ₅₅₈ | Cytochrome b ₅₅₈ | Cytochrome b ₅₅₈ |
| | | | MMP25 | MMP25 |
| | | TNFRc, uPAR | TNFRc | CD35, CD16, C1q-R LIR1-4,-6,-7,-9 ^c IFN-αE1, IFN-αR2 ^c IFN-γR1, IFN-γR2 ^c TNFR1, TNFR2 ^c ; IL-(1,4,6,10,13,17,18)R ^c TGF-βR2 ^c ; CXCR-1 ^c , -2 ^c , -4 ^c CCR-1, -2, -3 ^c Ig(G,A,E)FcR ^c TLR-1, -2, -4, -6, -8 ^c CD14 ; MyD88 ^c MD-2 ^c ; fMLFR, TREM1 ^c |
| | SNAP-23, VAMP-2 Stomatine, PGLYRPc | SNAP-23, VAMP-2 Nramp-1 | SNAP-23, VAMP-2 Nramp1 PA, DAF, CD10, CD13 | |
| Protéines de matrice | Élastase, Cathepsine G; Proteinase 3 | MMP8, MMP9 uPA, cistatina C ^c e Fc | MMP9 Arginase 1 | Protéine du plasma |
| | Defensine BPI, MPO Lysozyme Sialidase | hCAP18, NGAL, B12BP, lysozyme, lactoferrine, pentraxine 3, prodefensine, α1-anti-trypsine, SLPI | <lysozyme | |
| | Azurocidine β-glucuronidase | eparinase, CRISP3 β ₂ -microglobuline | β ₂ -microglobuline CRISP3 | |

^aAbbreviations: B12BP, vitamine B12 binding protein, CRISP, cystein-rich secretory protein; PA, phosphatase alcaline; DAF, decay-accelerating factor; LIR, immunoglobulin-like receptor; uPA, urokinase plasminogen activator.

^bLocalisation des protéines dans la membrane et dans la matrice des granules et des vésicules sécrétoires.

^cLa localisation a été déduite en fonction du profil d'expression génique en accord avec l'hypothèse du "targeting by timing", mais elle n'a pas été confirmée au niveau protéique.

Les granules spécifiques sont formés entre l'étape de myélocyte et métamyélocyte, les granules tertiaires sont formés dans les cellules segmentées; celles-ci sont libérées dans le flux sanguin et la formation du neutrophile mature différencié est complétée par l'apparition des vésicules sécrétoires.

Les différentes populations granulaires montrent des caractéristiques structurales communes telles que, une double membrane phospholipidique et une matrice intra-granulaire qui contient des protéines destinées à l'exocytose ou à la sécrétion dans le phagosome. Cependant, ils existent des différences substantielles concernant leur contenu protéique. Plusieurs études ont démontré que les protéines synthétisées lors d'une étape précise du développement myéloïde sont localisées dans la même population granulaire apparaissant au même stade de développement (Borregaard et al., 1995; Arnljots et al., 1998).

Ce mécanisme constitue l'hypothèse dite du “**targeting by timing**”, selon laquelle la présence d'une protéine dans un compartiment granulaire est due au moment où elle a été synthétisée.

L'extraordinaire hétérogénéité du contenu des granules est donc possible grâce à une action finement réglée et fortement spécialisée des facteurs de transcription présents pendant les différentes phases du développement de la cellule myéloïde.

Cette régulation raffinée de la synthèse et de l'accumulation des protéines granulaires permet aux molécules qui ont une fonction effectrice similaire d'être stockées dans le même compartiment granulaire ; par conséquent, la mobilisation d'un sous-type précis de granules détermine la sécrétion simultanée des molécules essentielles pour une fonction précise. Par exemple, les vésicules sécrétoires contiennent des récepteurs de surface et des molécules d'adhésions qui rendent le neutrophile capable de répondre aux signaux et commencer la migration trans-endothéliale à travers les tissus. Les granules tertiaires sont impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire et permettent un chimiotactisme efficace; les granules spécifiques et azurophiles contiennent un large spectre de protéines antibactériennes et enzymes essentielles pour le «killing» et la dégradation des microorganismes internalisés.

I.A.3.2 Signification de la degranulation dans la réponse inflammatoire aigue

Le recrutement des neutrophiles dans les tissus inflammatoires se vérifie en quelques heures et représente un événement fondamental dans la réponse aigue de l'hôte contre les pathogènes.

La mobilisation des neutrophiles implique plusieurs processus sécrétoires qui modifient graduellement l'état fonctionnel de la cellule. Suite à la stimulation par les médiateurs

inflammatoires, les cellules endothéliales vasculaires adjacentes au site d'infection transloquent à la membrane de leur pôle vasculaire la P-selectine qui s'associe à une glycoprotéine de surface des neutrophiles (la PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand 1); cette interaction facilite le *rolling* des neutrophiles le long de la surface endothéliale et détermine la sécrétion des vésicules sécrétoires, ce qui permet l'expression de l'intégrine β_2 CD11b/CD18 à la surface des neutrophiles. La liaison des intégrines β_2 aux molécules d'adhésion intracellulaire (ICAM-1) permet l'adhésion stable du neutrophile à l'endothélium et favorise leur transmigration.

L'exocytose des granules tertiaires libère les métalloprotéines (gélatinase et leucolysine) qui interviennent dans la dégradation de la membrane vasculaire basale pendant la phase d'extravasation. La migration des neutrophiles à travers les tissus interstitiels est accompagnée par la sécrétion des granules spécifiques et azurophiles, qui permet la libération des récepteurs pour les composantes de la matrice extracellulaire et d'enzymes capables de dégrader la matrice même, telles que la collagénase et les serine-protéases. Suite à la rencontre avec le pathogène, les neutrophiles activent leurs systèmes antibactériens oxygène-dépendants et indépendants grâce à l'exocytose des granules primaires et secondaires dans le phagosome ou à l'extérieur de la cellule.

I.A.4 Les NETs (*Neutrophil extracellular traps*)

Récemment il a été démontré l'existence d'un nouveau mécanisme antibactérien des neutrophiles : les NETs, ou *neutrophil extracellular traps* (Brinkmann et al., 2004), structures qui seraient à l'origine d'un «killing» extracellulaire (Figure 5). Ces auteurs ont démontré que les neutrophiles activés libèrent des fibres extracellulaires, composées par la chromatine et par des protéines granulaires, qui seraient capables de tuer les bactéries et les champignons. La formation de ces structures fibreuses est un processus actif qui peut être déclenché par différents stimuli (PMA, IL-8, LPS ou bactéries) et qui semblerait modifier la morphologie des neutrophiles avec changement de la forme cellulaire, condensation de l'hétéro et eu-chromatine, désintégration de la membrane nucléaire et granulaire avec homogénéisation de leur contenu. La rupture de la membrane plasmique permet la libération des NETs. Les auteurs distinguent le mécanisme qui permet la formation des NETs (ou « nétose ») par rapport aux processus de mort cellulaire par nécrose et apoptose : les formes réactives de l'oxygène, produites suite à l'activation du complexe oxydase, seraient en effet impliquées dans la génération des NETs,

comme démontré par l'incapacité des neutrophiles de patients CGD à les produire (Fuchs et al., 2007).

I.A.5 Rôle de la compensation de charge dans la bactéricidie des neutrophiles

Le transfert d'électrons *via* Nox 2 provoque un flux net de charges négatives à travers la membrane ; ce courant électrique cause une variation du potentiel de membrane qui passe de -60 mV dans les neutrophiles à repos à +60 mV ou 0 mV après respectivement, stimulation par le PMA ou le fMLF (Jankowski e Grinstein, 1999). Ce courant électrique dépend de la différence de potentiel transmembranaire et s'interrompt lorsque le potentiel rejoint des valeurs entre +160 et +200 mV. Compte tenu de la vitesse de production des anions superoxyde et de la capacité électrique de la membrane, il a été calculé que l'activité enzymatique de la NADPH oxydase des neutrophiles devrait s'arrêter en 250 millisecondes (DeCoursey et al., 2003). Bien évidemment, la durée du burst respiratoire induit par les stimuli solubles ou particuliers est plus longue ; par conséquent, une compensation de charge appropriée représente le facteur critique pour préserver la production d'anions superoxyde.

Théoriquement, cette compensation du flux d'électrons pourrait dériver soit d'un mouvement de cations dans la même direction (H^+ , K^+), soit d'un mouvement d'anions dans la direction opposée (Cl^-), ou de la combinaison de ces deux processus (Figure 6 ; Pour revue, Rada et al., 2008).

I.B La granulomatose septique chronique

(pour revue cfr. Stasia et al., 2009 ; van den Berg, 2009)

La granulomatose septique chronique (ou CGD, *chronic granulomatose disease*) est un désordre rare de l'immunité innée, d'origine génétique, dû à un défaut du métabolisme oxydatif des polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages et éosinophiles (phagocytes ou granulocytes) (Segal et al., 2000). Ces cellules phagocytaires sont incapables de produire les formes réactives de l'oxygène (FRO) à cause d'anomalies du complexe NADPH oxydase.

Cette maladie orpheline est caractérisée par des infections bactériennes et fongiques et par la formation de granulomes (d'où le nom de cette pathologie). La CGD se manifeste habituellement dans les 5 premières années de vie, mais peut être diagnostiquée à l'âge adulte (Liese et al., 1996). Récemment, la découverte de l'origine génétique de la maladie, et en particulier la caractérisation des gènes impliqués, a amélioré la compréhension de l'hétérogénéité clinique de cette pathologie. Dans le 75% des cas de CGD, la transmission de la maladie est liée à l'X ; dans le reste, 25% des cas, la transmission est autosomale récessive, et plus rarement, autosomale dominante (Segal BH et al., 2000; Seiger, 2008). La mise en évidence du défaut fonctionnel des phagocytes et la caractérisation des mutations génétiques à l'origine de la CGD sont indispensables pour permettre le diagnostic de la maladie.

I.B.1 Bases physiopathologiques de la CGD

Les manifestations cliniques de la CGD dérivent du dysfonctionnement du complexe enzymatique de la NADPH oxydase : on parle donc d'une enzymopathie héréditaire. Les mutations responsables de la réduction ou de l'absence d'activité enzymatique peuvent concerner cinq gènes différents : *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* et *NCF4*, qui codent respectivement pour gp91*phox*, p22*phox*, p47*phox*, p67*phox* et p40*phox* (Tableau 2).

La CGD à transmission liée à l'X (CGDX) dérive des mutations dans le gène *CYBB*, localisé au niveau du bras court du chromosome X, et code pour la sous-unité gp91*phox* du cytochrome b₅₅₈. Un défaut dans le gène *CYBB* correspond à 60% des cas de CGD. Dans cette forme de transmission, les sujets masculins affectés par la maladie naissent de mères hétérozygotes porteuses saines qui exhibent une activité NADPH oxydase réduite (environ de 50%) et qui, dans la plupart de cas ne présentent aucun symptôme, par rapport à une population témoin.

Les formes de CGD à transmission autosomale récessive (CGDAR) sont dues aux mutations des gènes *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* et *NCF4* (Parkos et al, 1988; Dinauer et al. 1990; Lomax et al. 1989; Volpp et al. 1989; Let et al. 1990; Kenney et al. 1993). Récemment l'équipe de Mary Dinauer a identifié et décrit le premier cas de CGD dû à une mutation autosomale récessive dans le gène *NCF4*, codant pour la protéine p40*phox* (Matute et al., 2009). Seulement un cas d'immunodéficience primaire dû à une mutation autosomale dominante de la protéine G Rac2 a été décrite (Ambruso et al., 2000; Williams et al., 2000).

Les mutations des cinq gènes à l'origine des différentes formes de CGD n'ont pas une localisation spécifique ; la caractérisation moléculaire de la maladie reste donc difficile. Ces

mutations peuvent être situées dans les zones de jonction intron-exon ou dans la partie codante ou encore dans la région promotrice du gène. Plusieurs types de mutation sont possibles : mutations ponctuelles, délétions ou insertions. Dans la plupart des cas, les mutations génétiques provoquent l'absence de la protéine correspondante soit à cause d'un défaut de synthèse de l'ARN messager, soit à cause de l'instabilité de la protéine mutée (coupée ou avec une conformation erronée) qui sera ensuite rapidement éliminée (CGDX⁰ ou CGDAR⁰).

La forme CGDX⁰, la plus courante, se caractérise par l'absence des deux sous-unités du cytochrome b₅₅₈, même si la mutation ne concerne que le gène *CYBB*. En effet, il semblerait qu'il existe une stabilisation réciproque des deux sous-unités du cytochrome b₅₅₈, vu que dans le cas des CGDAR avec un défaut de *p22phox*, la sous unité *gp91phox* est absente. Il existe des variants rares, caractérisés par une expression réduite (CGDX⁻) ou normale de la protéine *gp91phox* mutée et non fonctionnelle (CGDX⁺). Les cas de CGD X⁻ sont principalement dus à des mutations anti-sens qui provoquent la perte de la conformation stable de *gp91phox* ou, plus rarement, à des mutations au niveau du promoteur du gène *CYBB*. Des mutations anti-sens dans la région codante du gène *CYBB* sont généralement à la base des cas de CGDX⁺ (Stasia et Li, 2008).

Ces cas rares ont permis de mettre en évidence des nouveaux aspects fonctionnels des protéines composantes le complexe oxydase, grâce surtout aux études de relation structure-activité (Stasia, 2007).

| Nom | Gène impliqué | Protéine touchée | Sous-type | Modalité de transmission | Localisation chromosomique | Fréquence (%) |
|----------------|---------------|------------------|------------------|--------------------------|----------------------------|---------------|
| CGD91X | <i>CYBB</i> | <i>Gp91phox</i> | X91 ⁰ | X-linked récessive | Xp21.1 | 50 |
| | | | X91 ⁻ | | | <5 |
| | | | X91 ⁺ | | | <5 |
| CGD22AR | <i>CYBA</i> | <i>p22phox</i> | A22 ⁰ | Autosomale rec. | 16q24 | 5 |
| | | | A22 ⁺ | | | 1 cas |
| CGD47AR | <i>NCF1</i> | <i>p47phox</i> | A47 ⁰ | Autosomale rec. | 7q11.23 | 32 |
| CGD67AR | <i>NCF2</i> | <i>p67phox</i> | A67 ⁰ | Autosomale rec. | 1q25 | 5 |
| | | | A67 ⁻ | | | 1 cas |
| CGD40AR | <i>NCF4</i> | <i>P40phox</i> | A40 ⁰ | Autosomale rec. | 22q13.1 | 1 cas |

Tableau 2. Les différentes formes de CGD.

I.C Les PLB-985 comme modèle cellulaire

La lignée promyélocytaire PLB-985 a été établie par l'équipe du professeur Rado en 1987 (Tucker et al., 1987). Les cellules PLB-985 dérivent d'une lignée des cellules humaines, myéloïdes, diploïdes, obtenue à partir du sang périphérique d'une patiente atteinte de leucémie aigue non lymphoïde.

Il s'agit des cellules mono-myéloblastiques à une phase de maturation plus précoce par rapport à la lignée promyélocytaire HL-60 (elles-mêmes souvent utilisées dans le cadre des études sur le complexe NADPH oxydase). Les cellules PLB-985 peuvent être différenciées en granulocytes ou en monocytes/macrophages en présence de certains agents inducteurs (PMA, DMSO, acide rétinoïque, DMF, cAMP) (Figure 8). Après traitement par l'agent de différenciation, le noyau des cellules apparaît réduit et multilobé, et dans le cytoplasme on constate la présence de nombreux granules.

Les cellules PLB-985 différenciées avec le DMF en granulocytes ou "neutrophil-like", expriment toutes les sous-unités du complexe NADPH oxydase (*gp91phox*, *p22phox*, *p40phox*, *p47phox* et *p67phox*) (Zhen et al., 1993 ; Pedruzzi et al., 2002).

En 1993 les chercheurs de l'équipe de Mary Dinauer ont établi une lignée de PLB-985 dans laquelle le gène *CYBB* codant pour *gp91phox* ou Nox2 a été inactivé par recombinaison homologue (Zhen et al., 1993). Cette lignée, nommée X-CGD ou KO a été obtenue grâce à l'insertion d'une cassette codant l'hygromycine B phosphotransférase au niveau du troisième exon du gène *CYBB*. Dans ce modèle, l'expression de Nox2 est totalement abolie et l'activité NADPH oxydase absente. Une activité oxydase équivalente à celle des cellules PLB-985 sauvages (WT) peut alors être reconstituée par transfection stable de l'ADNc sauvage (*wild type*) de Nox2 (cellules **WT-Nox2**) (Zhen et al., 1993).

II. OBJECTIFS DE LA THESE

L'élimination des bactéries et champignons par les neutrophiles est le résultat de la coopération entre les formes réactives de l'oxygène (FRO), produites suite à l'activation de la NADPH oxydase, dont la toxicité est sensiblement augmentée par la MPO (**mécanismes oxydatifs**) et les protéines bactéricides contenues dans les granules cytoplasmiques (**mécanismes non oxydatifs**).

L'implication directe des FRO et de la MPO dans la bactéricidie des PMN a été récemment remise en question. De nouvelles données supporteraient en fait l'hypothèse selon laquelle la NADPH oxydase et les FRO joueraient dans la bactéricidie un rôle indirecte, fonctionnel à l'activation des mécanismes non oxydatifs; ceci grâce à des modifications chimio-physiques du micro environnement phagosomal (pH et tonicité) qui favoriseraient le relargage et l'activation des protéines granulaires (Reeves et al., 2002; Ahliwalia et al., 2004; Segal AW, 2005).

Récemment, dans le laboratoire dirigé par le professeur Dri où j'ai effectué une partie de ce travail de thèse, il a été démontré que la technique utilisée pour évaluer la bactéricidie des PMN était erronée par un défaut méthodologique (Decleva et al., 2006). En adoptant une méthode corrigée, nous nous sommes proposés de réévaluer le rôle relatif des mécanismes oxydatifs et non oxydatifs dans la bactéricidie des PMN par rapport à différents types de microorganismes: bactéries Gram négatives (*Escherichia coli*), bactéries Gram positives (*Staphylococcus aureus*) et champignons (*Candida albicans*). Nous avons en particulier vérifié la possible implication:

- des flux de ions K^+ ;
- des modifications du pH intraphagosomal ;
- du système myeloperoxydase- H_2O_2 -chlorure.

L'utilisation des lignées cellulaires différenciables en granulocyte, telles que les cellules PLB-985, représente un outil particulièrement utile dans l'étude de l'activité NADPH oxydase et de la production des FRO (Bouleven et al., 2006; Fay et al., 2006; Taylor et al., 2006; van Bruggen et al., 2004; Bionda et al., 2004; Li et al., 2005 e 2007). Récemment, les recherches effectuées au sein du laboratoire dirigé par le Docteur Stasia dans le cadre de l'étude du rapport structure-fonction de la protéine Nox2 dans le modèle cellulaire PLB-985, ont permis d'obtenir pour la première fois une lignée de cellules mutantes caractérisées par une activité oxydase supérieure à celles des cellules témoin (Li et al., 2005). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à:

- caractériser cette superproduction d'anions superoxyde par les cellules mutantes en réponse aux stimuli particuliers;
- déterminer l'impact de la superproduction des FRO sur l'activité bactéricides des cellules mutantes vis à vis des différents microorganismes;
- analyser la composition des granules cytoplasmiques des cellules PLB-985 en suivant leur progression dans le phénotype granulocyte, pour estimer l'importance des protéines granulaires (représentant les mécanismes de «killing» oxygène indépendants) dans la bactéricidie de ces cellules et caractériser l'efficacité de la différenciation des cellules PLB-985 en *neutrophils-like*.

Le dysfonctionnement des mécanismes bactéricides des phagocytes est à la base de nombreuses infections bactériennes et fongiques chez les patients atteints de granulomatose septique chronique (CGD). Une partie de ce travail de thèse a été dédiée à la caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'un cas de CGD X91¹. Voici les objectifs que nous nous sommes proposés d'atteindre:

- caractériser l'expression et l'activité oxydase des granulocytes du patient;
- identifier la mutation responsable de la maladie et en déterminer les conséquences sur la synthèse de la protéine;
- évaluer l'effet de la mutation identifiée sur la bactéricidie des neutrophiles du patient vis-à-vis de *S. aureus*, *C. albicans* et *E. coli*.

III. RESULTATS – Partie A

Ce travail a été réalisé au sein du *Département de Science de la Vie* de l'Université de Trieste, sous la direction du Professeur Pietro Dri.

III.A Rôle de la Myéloperoxydase dans la bactéricidie des neutrophiles

Le «killing» des microorganismes pathogènes est le résultat d'une coopération complexe et raffinée de plusieurs mécanismes: production de métabolites réactifs de l'oxygène, sécrétion des enzymes et peptides antibactériennes, courant ionique de compensation de charge et formations des *neutrophil extracellular traps*.

Jusqu'à il y a quelques années, l'opinion la plus largement diffusée était que les formes réactives de l'oxygène (FRO), générées par l'activation du complexe oxydase, représentaient les principaux acteurs du «killing» des microorganismes (Babor et al., 1973; Klebanoff et al., 1975). La myéloperoxydase sécrétée à partir des granules azurophiles dans le phagosome augmentent de façon considérable les effets antibactériens des FRO en catalysant la conversion du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en acide hypochloreux (HOCl), un puissant agent ionisant. Le rôle central de la NADPH oxydase est confirmé par la découverte de la granulomatose septique chronique (CGD), un désordre génétique rare, caractérisé par l'augmentation de la susceptibilité aux infections dues essentiellement aux bactéries catalase-positives comme *S. aureus* et aux champignons comme *A. fumigatus*, à cause de l'incapacité des phagocytes à produire les FRO.

Dernièrement, un modèle alternatif a été proposé, selon lequel le complexe NADPH oxydase aurait un rôle intimement lié à l'action antibactérienne des protéases sécrétées dans le phagosome (Reeves et al., 2002; Ahluwalia et al., 2004). Sur la base de ce modèle, en effet, l'activation de l'oxydase, ayant comme conséquence la génération de FRO, permettraient la création dans le phagosome d'un microenvironnement optimal (pH et tonicité) à l'action des protéines antibactériennes contenues dans les granules cytoplasmiques (entre autres, élastase et cathepsine G), responsables du «killing» et de la dégradation des microorganismes internalisés. Selon cette hypothèse, l'excès des charge négatives dans le phagosome dû au transfert des électrons à travers la NADPH oxydase, serait compensé par l'influx d'ions potassium K⁺ du cytosol vers le phagosome, à travers des canaux à large conductance, activés par le calcium et dépendants du voltage (canaux nommés BK_{Ca}). En

même temps, on assisterait à une augmentation du pH intraphagosomal à cause de la consommation d'ions H^+ dans la réaction de dismutation des anions superoxyde en peroxyde d'hydrogène. L'hypertonie générée par l'influx de potassium et l'alcalinisation favoriseraient l'activité antibactérienne en induisant la sécrétion des protéases granulaires. Récemment ces mêmes auteurs ont proposé qu'un flux d'ions chlorure du phagolysosome au cytoplasme contribuerait à la compensation de charges nécessaire pour préserver l'activité NADPH oxydase et le «killing». Différentes critiques de ce modèle et de ses bases expérimentales ont été publiées par la suite, avec la démonstration d'un côté de la non implication des canaux BK_{Ca} et, de l'autre côté, de la nécessité du rôle des canaux à protons dans le *burst* respiratoire et dans l'activité antibactérienne des PMN (Femling et al., 2006; Murphy et al., 2006; Essin et al., 2007; Nauseef 2007; Rada et al., 2008; Morgan et al., 2009). Dans ce contexte, il apparaît difficile d'établir avec clarté les événements associés à l'activation de l'oxydase (flux de ions K^+ ou H^+ ou Cl^- , modifications du pH vacuolaire, production de FRO et action de la MPO) qui sont effectivement importants dans le processus de bactéricidie.

Nous avons récemment démontré que la procédure communément utilisée pour l'évaluation de la bactéricidie des neutrophiles est inadéquate : une faute méthodologique dans l'étape des lyse des neutrophiles ayant phagocyté les bactéries, conduisait en effet à une surestimation du pouvoir bactéricide (Decleva et al., 2006). Nous avons donc réexaminé le rôle des différents mécanismes impliqués dans le processus de la bactéricidie, grâce à l'application d'une méthode correcte d'évaluation de l'activité bactéricide des neutrophiles.

III.A.1 Rôle de la NADPH oxydase dans le «killing» de *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*

Dans le but de comprendre le rôle des systèmes oxydatifs et non oxydatifs dans la bactéricidie, nous avons d'abord effectué une série d'expériences dans lesquelles différents microorganismes sont testés pour évaluer leur susceptibilité aux processus de «killing» NADPH oxydase dépendantes. Nous avons comparé l'activité bactéricide de neutrophiles normaux et de neutrophiles «NADPH oxydase déficientes», c'est à dire, des neutrophiles issus des patients atteints de granulomatose septique chronique et des neutrophiles normaux traités avec un inhibiteur de l'oxydase, le diphenyliodonium (DPI). Les microorganismes cibles utilisés ont été, une bactérie gram négative (*E. coli*), une gram positive (*S. aureus*) et un champignon (*C. albicans*).

La Figure 11 montre que le «killing» de *E. coli* par les neutrophiles NADPH oxydase déficients est partiellement déficitaire dans les premières 5-30 minutes de contact cellules/bactéries, mais il devient comparable à celui des neutrophiles normaux quand les temps d'incubation sont prolongés (45-60 minutes). Cela suggère que l'activité du complexe oxydase est nécessaire pour un «killing» optimale de *E. coli* dans les phases précoces de la bactéricide, mais que dans les neutrophiles, d'autres mécanismes fonctionnels peuvent contribuer à l'élimination de ce microorganisme, même en absence de NADPH oxydase.

Au contraire, les neutrophiles CGD ou neutrophiles traités au DPI ne sont pas capables de tuer *S. aureus* et *C. albicans* pendant les 60 minutes d'incubation, ce qui indique que le «killing» de ces microorganismes, contrairement à *E. coli*, dépend entièrement de l'activité NADPH oxydase.

III.A.2 Rôle des flux de K^+

Après avoir établi que l'activité du complexe oxydase est une condition indispensable pour l'élimination de *S. aureus* et *C. albicans*, nous avons investigué la possible contribution des courants d'ions potassium K^+ , un des mécanismes qui a été récemment proposé comme étant impliqué dans le phénomène de la bactéricidie, par activation de l'oxydase (Reeves et al., 2002; Ahluwalia et al., 2004). Ces flux de ions K^+ seraient médiés par des canaux activés par le calcium et dépendants du voltage (nommés BK_{Ca}): nous avons donc voulu tester l'effet de deux inhibiteurs sélectifs des BK_{Ca} , l'iberiotoxine et la paxilline, sur le «killing» de *S. aureus* et *C. albicans*. Nous avons aussi utilisé un inhibiteur à large spectre des canaux K^+ , le tetraethylammonium chlorure (TEA). La Figure 12A montre qu'aucun de ces inhibiteurs ne modifie le «killing» de *S. aureus* et *C. albicans* par les neutrophiles humains.

En utilisant une approche complémentaire, nous avons ensuite voulu vérifier si l'induction des flux de potassium pouvait rétablir la bactéricidie des neutrophiles traités au DPI. Dans ce but, nous avons utilisé un activateur sélectif des BK_{Ca} , le composé NS1619. Les résultats sont montrés dans la Figure 12B Il est évident que cet activateur des canaux à potassium n'améliore pas la bactéricidie des neutrophiles dans lesquels l'activité NADPH oxydase est inhibée par le DPI.

III.A.3 Rôle de l'alcalinisation intraphagosomale

La dismutation des anions superoxyde, accompagnée par la consommation des protons, rend le microenvironnement phagosomal fortement alcalin: dans les neutrophiles humains, on assiste, en effet, à une augmentation transitoire du pH jusqu'à 7.8-8 dans les minutes qui suivent la formation du phagosome; cet événement est considéré comme important pour l'activité des protéines antibactériennes contenues dans les granules cytoplasmiques, qui expliqueraient leur action de façon optimale à pH légèrement alcalin. Cependant, le « *burst* respiratoire » est accompagné par l'activation d'un système antiport Na^+/H^+ , d'une pompe ATP-ase à protons et d'un mécanisme de conductance à ions H^+ (Nanda et al., 1994) qui déterminent un influx de protons du cytoplasme au phagosome; ce courant d'ions H^+ contraste avec l'alcalinisation observée initialement, et, par conséquence, le pH diminue jusqu'à environ 6.0 après 1 heure (Segal et al., 1981; Cech et al., 1984). Dans les neutrophiles NADPH oxydase déficients, l'absence de cette alcalinisation initiale, suivie par une acidification rapide et soutenue du pH intraphagosomal, semble être, au moins en partie, responsable du défaut de bactericidie qui caractérise ces cellules. Sur la base de cette hypothèse, nous avons essayé de rétablir l'activité bactéricide des neutrophiles NADPH oxydase déficients en induisant une augmentation du pH vacuolaire, qui permettrait l'activation des protéases granulaires antibactériennes. Pour cela, nous avons utilisé deux bases faibles lysosomotropiques, le chlorure d'ammonium et la méthylamine, substances qui s'accumulent préférentiellement dans les compartiments acides des cellules (Poole et al., 1981), un inhibiteur de la pompe vacuolaire H^+ -ATPase, la bafilomycine, et l'inhibiteur de l'antiport Na^+/H^+ , 5-(N,N-esaméthylène) amyloride, HMA, substances capables d'inhiber l'acidification phagosomale précoce observée dans les neutrophiles NADPH oxydase déficients (Grinstein et al., 1988). La Figure 13 montre qu'aucune de ces substances n'est capable d'améliorer l'activité bactéricide ou fongicide des neutrophiles traités au DPI, ce qui suggère que l'alcalinisation intraphagosomale n'est pas suffisante, par elle-même, à l'activité bactéricide.

III.A.4 Rôle du système MPO-H₂O₂-Cl⁻

III.A.4.1 Effet de l'inhibition du système MPO-dépendant sur le «killing» de *S. aureus* et de *C. albicans*

Les radicaux de l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène produits pendant l'activation du complexe oxydase ont une faible activité antibactérienne; nous avons donc examiné la contribution du système bactéricide dépendant de la MPO, qui, en présence de H₂O₂ et d'ions chlorure catalyse la formation d'acide hypochloreux, un réactifs fortement toxique. Le rôle du système MPO-halogène dans la bactéricidie des neutrophiles a été initialement étudié en utilisant des inhibiteurs de la myéloperoxydase et des composés qui neutralisent l'acide hypochloreux, HOCl. Les neutrophiles normaux ont été traités avec du KCN, un inhibiteur aspécifique de la MPO, avec l'acide salicylhydrossamic (SHAM), un inhibiteur sélectif de la MPO (Davies et al., 1989) et avec les acides aminés méthionine et taurine, substances capables de réagir rapidement avec HOCl (Jelrich et al., 2000). La Figure 14 montre que le «killing» de *S. aureus* et *C. albicans* est sensiblement inhibé par les inhibiteurs de la myéloperoxydase (KCN et SHAM) et par les composés scavengers de HOCl.

III.A.4.2 Bactéricidie des sujets MPO-déficients

Nous avons aussi utilisé une autre approche expérimentale : la mesure de la bactéricidie des neutrophiles des sujets MPO-déficients. La Figure 15 montre que, comme prévu, le «killing» des neutrophiles témoin traités avec l'inhibiteur de la MPO, le KCN, est comparable à celui des sujets MPO déficients : le «killing» des deux microorganismes est virtuellement absent après une courte incubation (10-20 min) et reste significativement inférieure au «killing» des neutrophiles témoin même en prolongeant le temps d'incubation à 45-60 min. Ceci est particulièrement évident dans le cas de *C. albicans*, dont le «killing» par les PMN MPO⁻ est fortement inhibé même après 60 min de contact cellules/pathogènes.

Il est important de souligner que le KCN ne modifie pas l'activité bactéricide des neutrophiles MPO⁻, ce qui permet d'exclure la possibilité que l'inhibition observée sur le «killing» de PMN témoin soit due à des mécanismes autres que l'inhibition de la MPO.

Nous avons ensuite étudié le rôle du système MPO-H₂O₂-Cl⁻ en essayant de reconstituer l'activité bactéricide des neutrophiles traités au DPI avec un système générant de l'H₂O₂ (glucose/glucose oxydase). Comme l'on peut voir dans la Figure 16, ce système régénère partiellement l'activité de

«killing» des neutrophiles témoin traités au DPI et des neutrophiles de patients CGD, mais il n'a aucun effet sur les neutrophiles de sujets MPO- traités au DPI. Ce «killing» restauré est totalement aboli quand l'activité peroxydase est inhibée (avec KCN ou SHAM) ou quand l'acide hypochloreux est neutralisé (avec méthionine ou taurine) (Figure 17). Cela indique que le système dépendant de la myéloperoxydase est suffisant pour assurer une activité bactéricide, même en absence d'autres mécanismes antibactériennes activés par la NADPH oxydase.

III.A.5 «killing» MPO-indépendant

Les neutrophiles MPO⁻ et les neutrophiles normaux traités avec l'inhibiteur de la myéloperoxydase, le KCN, qui ne sont pas capables de tuer les microorganismes après une incubation courte, montrent une bactéricidie « résiduelle » par rapport à *S. aureus* (moins évidente par rapport à *C. albicans*) quand les temps d'incubation sont prolongés (Figure 15). Les formes réactives de l'oxygène et les protéases contenues dans les granules cytoplasmiques activées par les modifications chimio-physiques du phagolysosome, induites par l'activation du complexe oxydase, pourraient théoriquement expliquer cette activité bactéricide résiduelle. Nous avons donc effectué des expériences pour mieux définir les mécanismes responsables de cette bactéricidie MPO-indépendante. Pour cela nous avons utilisé des neutrophiles normaux traités au KCN et des neutrophiles MPO déficients.

Pour tester la contribution des FRO nous avons utilisé un système qui élimine les radicaux libres de l'oxygène, le couple Glutathion/Glutathion peroxydase (GSH/GSHPO): la glutathion peroxydase, en présence de H₂O₂ oxyde le glutathion. La contribution des flux de potassium a été analysée en utilisant l'iberiotoxine et la paxilline, deux inhibiteurs sélectifs de canaux BK_{Ca}, et le tetraethylammonium (TEA), un inhibiteur aspécifique des canaux à potassium.

Les résultats obtenus sont montré dans la Figure 18 : le système GSH/GSHPO ne modifie pas l'activité bactéricide des cellules dépourvues d'activité peroxydase. L'iberiotoxine et la paxilline ne sont pas capables d'améliorer l'activité de «killing»; par contre le TEA produit une inhibition significative de l'activité bactéricide.

En conclusion, le « killing » résiduel observé avec les neutrophiles MPO-déficients semble être dû aux courants d'ions potassium.

III. RESULTATS – Partie B

Ce travail a été réalisé au sein du Centre Diagnostic et Recherche sur la CGD (CeDiRec – équipe TheREX) sous la direction du Docteur Marie-José Stasia.

III.B Etude des mécanismes moléculaires de la bactéricidie des neutrophiles dans les cellules PLB-985

III.B.1 Le mutant **Dloop_{Nox4}-Nox2**

Les recherches effectuées au laboratoire CeDiRec dirigées par le Docteur Stasia ont récemment mis en évidence rôle de la 2ème boucle intracellulaire (*o loop D*, ¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰, Fig. 19) dans l'activation du complexe oxydase. Les résultats ont montré que la boucle D est nécessaire pour le transfert d'électrons du FADH à l'oxygène moléculaire par le biais des hèmes ; de plus, la substitution de la séquence de la boucle D avec celle de l'oxydase homologue, Nox4, a mis en évidence une augmentation significative de l'activité oxydase par rapport aux stimuli solubles (Li et al., 2005; Carrichon, Defendi et al., 2010; en révision BBActa).

Dans ce contexte, le but de ce travail a été celui de caractériser la super-activité oxydase en réponse aux stimuli particuliers et à déterminer son impact dans la bactéricidie vis-à-vis de différents microorganismes.

Dans ce travail, nous avons utilisé des cellules **PLB-985 WT**, **X-CGD** (cellules transfectées avec le vecteur vide, sans activité oxydase), cellules **WT-Nox2** (cellules PLB-985 transfectées avec l'ADNc de Nox2) et cellules **Dloop_{Nox4}-Nox2** (cellules PLB-985 KO transfectées avec l'ADNc de Nox2, dans lequel la séquence de la boucle D a été remplacée par celle de l'oxydase homologue, Nox4).

III.B.2 Vérification de l'expression de la NADPH oxydase

Les cellules PLB-985 sont différenciées en granulocytes ou *neutrophil-like* en présence de 0,5% de DMF. Cette différenciation permet d'induire l'expression endogène des facteurs membranaires (p22*phox* et Nox2) et des facteurs cytosoliques (p47*phox*, p67*phox* e p40*phox*) de la NADPH oxydase (Zhen et al., 1993; Pedruzzi et al., 2002).

La vérification de l'expression de Nox2, dépendante de l'efficacité de la transfection du vecteur d'expression, est identique dans toutes nos cellules transfectées (WT-Nox2 et Dloop_{Nox4}-Nox2); de cette façon, nous sommes certains que les variations du phénotype observées sont dues à la mutation de Nox2 et pas à une différence dans le taux d'expression de la protéine.

L'expression de gp91*phox* est vérifiée grâce à deux méthodes:

A) par cytométrie en flux, en utilisant l'anticorps monoclonal 7D5, dirigé contre un epitope externe de Nox2 (Mat. e met. § 3.D.1.1);

B) par western blot (Mat. e met. § 3.C.3).

La Figure 20A montre les résultats d'une expérience représentative: la protéine gp91*phox* est absente dans les cellules PLB-985 X-CGD, obtenues par transfection avec le vecteur vide; l'expression de Nox2 est comparable dans les deux types cellulaires PLB-985 WT-Nox2 et Dloop_{Nox4}-Nox2.

En parallèle, la présence des deux sous-unités du cytochrome b₅₅₈, Nox2 et p22*phox*, est vérifiée par western blot réalisé sur les extraits solubles de membranes préparées à partir des cellules PLB-985 transfectées. Les résultats de la Figure 20B confirment que l'expression de la protéine Nox2 est équivalente dans les cellules PLB-985 WT-Nox2 et Dloop_{Nox4}-Nox2.

La mesure du spectre d'absorption différentiel du cytochrome b₅₅₈ permet de révéler l'incorporation correcte des hèmes et de confirmer que la quantité de cytochrome b₅₅₈ est équivalente dans toutes nos lignées cellulaires transfectées avec l'ADNc de Nox2 sauvage (wild type) ou muté (Tableau 3). Il est important de souligner que le contenu en cytochrome b₅₅₈ dans les cellules PLB-985 est 10 fois plus faible que dans les PMN humains.

III.B.3 Evaluation simultanée de l'expression de Nox2 et de l'activité oxydase par cytométrie en flux

Afin de faciliter la caractérisation des mutants élaborés dans notre laboratoire, nous avons développé une technique de double marquage permettant d'accéder simultanément à l'expression de Nox2 et à l'activité oxydase *ex vivo*. Le double marquage consiste en une première étape de marquage de Nox2 par l'intermédiaire de l'anticorps monoclonal 7D5. Dans une seconde étape, les cellules sont chargées en DHR123 avant d'être stimulées par les bactéries opsonisées. La production d' O_2^- est alors évaluée grâce à l'oxydation de la DHR123 en rhodamine 123. La Figure 21 montre les résultats d'une expérience représentative, obtenus analysant au FACS les cellules PLB-985 X-CGD, WT-Nox2 et Dloop_{Nox4}-Nox2, après double marquage et activation par *S. aureus*. Les dotplots obtenus confirment que l'expression de Nox2 est équivalente dans les cellules Dloop_{Nox4}-Nox2 et WT-Nox2 : en effet, la moyenne géométrique (G mean) de la fluorescence, relative à la distribution de la population cellulaire en fonction de l'expression de Nox2 (en abscisse) dans les cellules activées correspond à 30.8 ± 2.5 pour les cellules WT-Nox2 et 28.5 ± 2.9 pour les cellules Dloop_{Nox4}-Nox2 (la population des cellules X-CGD a une G mean de 3.1 ± 0.8) (n=2-4). Suite à la stimulation avec les bactéries opsonisées, la production des métabolites réactifs de l'oxygène produits par les cellules Dloop_{Nox4}-Nox2 est supérieure aux cellules WT-Nox2 : la G mean associée à la fluorescence de la DHR oxydé (en ordonnée) augmente environ d'un facteur 5 pour les cellules Dloop_{Nox4}-Nox2 et seulement d'un facteur 2 pour les cellules WT-Nox2. Il est intéressant de souligner que l'expression de Nox2 n'est pas modifiée suite à la stimulation par les microorganismes opsonisés.

III.B.4 Mesure du métabolisme oxydatif par chimiluminescence

- **Stimuli solubles**

Les expériences effectuées dans notre laboratoire ont mis en évidence une super-activité oxydase de la part des cellules mutantes PLB-985 Dloop_{Nox4}-Nox2 en réponse aux stimuli solubles (PMA, fMLF) (Tableau 4; d'après Carrichon, Defendi et al., 2010, en révision BBActa).

- **Stimuli particuliers**

Sur la base des résultats précédemment obtenus avec les stimuli solubles, nous nous sommes intéressés à évaluer l'effet de la stimulation par les activateurs particuliers (microorganismes) sur le métabolisme oxydatif des cellules PLB.

La Figure 22A montre la cinétique de production des FRO par les cellules PLB-985 WT-Nox2, Dloop_{Nox4}-Nox2 et X-CGD en réponse à *S. aureus*. Les résultats obtenus sont exprimés en unités de luminescence relatives (RLU) obtenues en mesurant la production totale des FRO.

La vitesse et la durée de la cinétique sont comparables dans les neutrophiles humains et dans les cellules PLB: dans tous les types cellulaires le pic d'activité est atteint après 20 min de l'activation (Figure 22A). Il est évident que l'activité oxydase de la lignée cellulaire PLB-985 est très faible par rapport aux neutrophiles (environ 180 fois plus faible). Cependant, la « super-activité » oxydase des cellules PLB-985 Dloop_{Nox4}-Nox2 observée en réponse aux stimuli solubles est confirmée même en réponse aux bactéries. En effet, la différence entre la production totale des ROS des cellules PLB Dloop_{Nox4}-Nox2 et celle de cellules WT-Nox2 est statistiquement significative. Des résultats similaires ont été obtenus suite à l'activation des cellules par les champignons *C. albicans* (Figure 23).

III.B.5 Evaluation de la bactéricidie des cellules PLB WT-Nox2 et Dloop_{Nox4}-Nox2

Après avoir démontré que le mutant Dloop_{Nox4}-Nox2 présente une super-activité oxydase par rapport aux cellules WT-Nox2 en réponse aux stimuli particuliers, nous avons voulu vérifier si cette production augmentée de ROS engendrait un accroissement de la capacité bactéricide de ces cellules par rapport à ces mêmes microorganismes, dont le «killing» est dépendant des processus oxydatifs (cette thèse, § III.A.1; Rada et al., 2004). Ces expériences ont été conduites en appliquant la méthode de mesure de la bactéricidie récemment mise au point par le laboratoire du Département de Sciences de la Vie de l'Université de Trieste (Decleva et al. 2006), avec une MOI (*multiplicity of Infection*) de 0.5 correspondant à 1 bactérie pour 2 cellules. La Figure 25A montre les résultats obtenus avec la bactérie *S. aureus* : l'activité bactéricide des cellules PLB-985 est inférieure à celle des neutrophiles à chaque intervalle d'incubation, sauf à 10 min de phagocytose. En effet, dans les premières minutes d'incubation avec les bactéries, le «killing» des cellules PLB-985 WT-Nox2 et

Dloop_{Nox4}-Nox2 est superposable à celui des neutrophiles humains. Toutefois, la bactéricidie des PMN se poursuit après 30, 45 et 60 min d'incubation, alors que celle des cellules PLB-985 WT-Nox2 et Dloop_{Nox4}-Nox2 s'arrête après 10 min de contact.

Cependant, aucune différence entre le «killing» des cellules mutantes Dloop_{Nox4}-Nox2 et celui des cellules WT-Nox2 a été mise en évidence.

Une série d'expérience analogues a été réalisée en utilisant comme pathogène le champignon *C. albicans* (Figure 25B). Le «killing» de *C. albicans* par les cellules WT-Nox2 et Dloop_{Nox4}-Nox2 est plus faible par rapport à celui observé avec les neutrophiles humains, à chaque intervalle de phagocytose. Comme précédemment observé avec les *S. aureus*, le «killing» des cellules PLB s'atténue après 10 min de contact, alors que celui des PMN se poursuit après 45 et 60 min d'incubation avec les champignons. Encore une fois, le «killing» de *C. albicans* par les cellules WT-Nox2 est comparable à celui observé avec les cellules mutantes Dloop_{Nox4}-Nox2.

Finalement, nous avons testé la bactéricidie des cellules PLB-985 par rapport à un microorganisme dont le «killing» est efficace même en absence d'activité NADPH oxydase, la bactérie *E. coli* (cette thèse, § III.A.1; Rada et al., 2004; Decleva et al., 2006).

La Figure 26 montre que toutes les cellules PLB-985 transfectées, y compris les cellules X-CGD dépourvues d'une NADPH oxydase fonctionnelle, sont capables de tuer ce microorganisme de façon comparable; cependant, le «killing» des cellules PLB-985 apparaît plus faible par rapport aux neutrophiles.

III.B.6 Caractérisation des compartiments intracellulaires des cellules PLB-985

Sur la base des résultats obtenus, nous avons supposé que le défaut de bactéricidie observé pour les cellules PLB-985 était dû soit au contenu réduit en cytochrome b₅₅₈ (un dixième par rapport aux PMN), et donc à un métabolisme oxydatif diminué soit à un défaut de contenu et/ou d'activation des protéines bactéricides des granules cytoplasmiques, qui dans l'ensemble, représentent les mécanismes bactéricides oxygène-indépendants.

Nous nous sommes donc proposé d'étudier les granules intracytoplasmiques de la lignée cellulaire PLB-985 en analysant:

- Dans les granules primaires: le contenu et la sécrétion de myéloperoxydase (MPO), élastase, cathepsine G et β -glucuronidase;

- Dans les granules secondaires: le contenu et la sécrétion de lactoferrine, lysozyme et collagénase (ou MMP8);
- Dans les granules tertiaires: le contenu et la sécrétion des gélatinase (ou MMP9);
- Dans les vésicules sécrétoires: le contenu du CD11b

La caractérisation des granules a été réalisée parallèlement à la progression de leur différenciation (induite en présence de DMF): ceci dans le but d'examiner l'évolution de l'apparition des différents marqueurs granulaires avec la diversification des cellules en phénotype de granulocytes.

III.B.6.1 Test d'exocytose

Pour comparer l'exocytose des différents compartiments granulaires, les résultats ici présentés sont exprimés en:

➤ **Activité Totale (A. tot):** Unités totales d'enzyme ou quantité d'enzyme qui catalyse la conversion d'une micromole de substrat par minute.

➤ **Pourcentage de sécrétion :**
$$\frac{\text{A. Tot surnageant activé} \times 100}{\text{A. Tot surnageant et culot activés}}$$

III.B.6.2 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode utilisant l'acide bicinconinique décrite (cfr 3.C.1b§) Les résultats présentés dans le tableau 5 montrent que dans les cellules indifférenciées et à chaque phase de la différenciation (entre le jour 2 et le jour 6, J2-J6) la concentration protéique des surnageants d'exocytose après stimulation avec fMLF augmente mais elle est environ 5 fois plus faible par rapport à celle retrouvée dans les neutrophiles; par contre, la quantité des protéines dans les culots des cellules PLB est comparable à celle des PMN.

III.B.6.3 Test de viabilité cellulaire: dosage de la LDH

Pour vérifier l'absence de perturbation de perméabilité de la membrane cellulaire pendant le test d'exocytose, un test de viabilité cellulaire a été effectué par dosage de la LDH (Tableau 6). Nous avons pu remarquer que le test de degranulation ne cause pas une libération extracellulaire significative de la LDH, donc il ne modifie pas la perméabilité membranaire.

III.B.6.4 Granules primaires

- **Dosage de la myeloperoxydase**

La quantité de MPO retrouvée dans les surnageants des cellules PLB activées par le fMLF et dans les lysats cellulaires est nettement inférieure par rapport aux neutrophiles, à chaque étape de la différenciation (Tableau 7, Figure 28). Par ailleurs, si l'on considère les valeurs de l'activité peroxydase dans les surnageants des cellules activées, on observe une augmentation de l'activité enzymatique parallèlement à la progression de la maturation cellulaire (de J2 à J6) : en effet, l'activité totale de la MPO à J2 de différenciation est environ 12 fois inférieure par rapport à l'activité enzymatique mesurée dans les PMN (55.4 ± 11.7 et 665.0 ± 82.0 mmoles/min/ 10^6 cellules, respectivement); toutefois, dans les cellules terminalement différenciées (J6) l'activité peroxydase est environ 2 fois plus faible que dans les PMN (282.7 ± 63.4 et 665.0 ± 82.0 mmoles/min/ 10^6 cellules, respectivement). Par ailleurs, dans les lysats des cellules à repos la différence entre la quantité de MPO dans les cellules PLB-985 et celle retrouvée dans les PMN est moins évident: en effet, dans les cellules matures (J6) l'activité peroxydase est comparable à celle des neutrophiles. La Figure 28 montre qu'il y a aussi un défaut de sécrétion de la MPO dans cette lignée cellulaire activée par le fMLF, avec un accroissement de la capacité d'exocytose au fur et à mesure que les cellules matures.

- **Dosage de l'élastase**

L'activité de l'élastase est absente dans les étapes initiales de la maturation granulocyte (entre J0 et J3); quand les cellules rejoignent les phases tardives de la maturation (entre J4 et J6) il est possible de mesurer une activité enzymatique. La quantité d'élastase dans les lysats des neutrophiles à repos ($4366.9 \pm 173.5 \mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellules) est entre 6 (PLB WT J6, $679.3 \pm 50.1 \mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellules) et 20 fois (PLB WT J2, $201.7 \pm 24.6 \mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellules) supérieure. Comme on l'observé précédemment avec la MPO, la sécrétion de l'élastase par la lignée cellulaire PLB-985 activée par le fMLF est aussi fortement compromise (Figure 29, Tableau 8).

- **Dosage de la cathepsine G**

L'activité enzymatique de la cathepsine G dans les cellules PLB WT est fortement déficitaire, à toutes les étapes de la maturation en *neutrophile-like*. (Figure 30, Tableau 9). Si l'on considère les valeurs d'activité enzymatique totale obtenues à partir des lysats des cellules non stimulées, la quantité de cathepsine G retrouvée dans les PLB WT est entre 3 (WT J6, $14.2 \pm 4.3 \mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellules) et 30 fois (WT J0, $1.7 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellules) inférieure par rapport aux PMN ($50.9 \pm 8.7 \mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellules). Encore une fois, la différence est importante avec les neutrophiles humains concernant l'activité enzymatique dans les surnageants d'exocytose : dans ces échantillons en effet l'activité enzymatique est 0 dans les cellules WT indifférenciées (J0) et dans les premières étapes de la différenciation (J2) ; également, dans les cellules matures (J6) la quantité de cathepsine G est extrêmement faible si comparée aux PMN (en moyenne, 9 fois plus faible)

- **Dosage de la β -glucuronidase**

Le tableau 10 montre qu'il existe une augmentation progressive de l'activité enzymatique de la β -glucuronidase parallèlement à la maturation en granulocyte. Par rapport aux neutrophiles humains, la différence d'activité devient moins importante dans les étapes finales de la maturation cellulaire. La Figure 31 montre que le relargage de cet enzyme est minimal dans les cellules indifférenciées (WT J0, $2.0 \pm 0.4\%$) et il augmente parallèlement à la maturation des cellules, pour atteindre, dans

les étapes finales de la différenciation, valeurs de sécrétion superposables à celles des neutrophiles (WT J6: 18.4 ± 3.5 ; PMN: $21.4 \pm 3.3\%$).

Nos résultats confirment la présence des granules primaires dans le cytosol des cellules PLB-985 WT, comme précédemment décrit par d'autres chercheurs (Tucker et al., 1987; Gaudreault et al., 2005; Kaldi et al., 2003; Pedruzzi et al., 2002; Pivot-Pajot et al., 2010). Tous les marqueurs des granules azurophiles sont déjà présents dans les cellules indifférenciées qui correspondent à l'étape de différenciation myéloïde de myéloblaste/promyélocyte. Nous avons toutefois mis en évidence pour la première fois un défaut d'activité pour tous ces enzymes des granules primaires, dans chaque étape de la maturation; ce défaut semble être extrêmement grave dans les phases précoces de la différenciation et s'atténue seulement partiellement au fur et à mesure que les cellules mûrissent en granulocytes: dans les cellules différenciées, en effet, seulement la myéloperoxydase atteint des valeurs d'activité comparables à celles des neutrophiles humains. Pour les autres marqueurs, l'activité reste fortement déficiente (5% pour l'élastase, 30% pour la cathepsine G et 50% pour la β -glucuronidase, par rapport aux activités mesurées dans les neutrophiles).

On peut donc conclure que dans la lignée cellulaire PLB-985, la mobilisation des granules primaires et la biogénèse des protéines bactéricides sont sensiblement déficientes par rapport aux neutrophiles humains. Cela pourrait contribuer au défaut d'activité bactéricide observé avec cette lignée; en particulier, la faible activité peroxydase compromettrait le "killing" de *S. aureus* et *C. albicans*, microorganismes dont l'élimination est fortement dépendante de l'activité de la MPO (voir résultats III.A).

III.B.6.5 Granules secondaires

- **Dosage de la lactoferrine**

Lors de 6 expériences indépendantes aucune trace de lactoferrine n'a été retrouvée dans les échantillons d'exocytose (surnageant, culot), ni dans le lysat cellulaire.

- **Dosage du lysozyme**

Le lysozyme est un enzyme présent principalement au niveau des granules secondaires mais aussi dans les granules primaires et tertiaires. Le tableau 11 montre encore une fois une augmentation de l'activité enzymatique en fonction de la différenciation en granulocyte: le lysozyme est absent entre J0 et J2 et son activité est maximale dans les cellules présentant une différenciation terminale, même si elle reste toujours inférieure par rapport à l'activité des neutrophiles. Pour ce qui concerne l'efficacité de l'exocytose, on observe que seulement les cellules qui ont atteintes un certain degré de maturation granulocyte (J5-J6) sont capables de libérer le lysozyme dans le milieu extracellulaire ; le pourcentage de relargage dans les cellules à J5 et J6 de différenciation est environ la moitié par rapport aux PMN.

- **Dosage de la collagénase (MMP-8)**

5 expériences ont été faites au laboratoire pour doser la collagénase et aucune trace de cet enzyme n'a été retrouvé dans nos échantillons d'exocytose (ni dans les surnageants ni dans les culots) ou dans les lysats cellulaires. Pour ce qui concerne les neutrophiles humains, l'activité totale de la collagénase dans le surnageant d'exocytose est de $1375,7 \pm 114,2$ ng/mL/ 10^6 cellules, avec un pourcentage de relargage correspondant à $74,2 \pm 5,1\%$ (n=4).

Dans l'ensemble, l'absence de lactoferrine et collagénase, les faibles quantités de lysozyme, du CD11b et, on le rappelle, de cytochrome b_{558} , supportent l'idée que les cellules PLB-985 présentent un défaut au niveau de la biogénèse des granules secondaires. L'activité du lysozyme que nous avons pu mesurer est probablement dû à l'enzyme libéré par les granules primaires (on rappelle que, dans les neutrophiles, le lysozyme est un enzyme ubiquitaire que l'on retrouve dans toutes les populations granulaires).

Nous pouvons supposer un défaut des granules secondaires aussi bien au niveau de la synthèse des marqueurs granulaires que de leur stockage dans les compartiments intracitoplasmiques. Ceci déterminerait d'un côté, l'absence partiel ou total des protéines solubles (dans le cas du lysozyme, lactoferrine et collagénase) et, de l'autre côté, l'association à la membrane plasmique des protéines qui dans les PMN sont confinées préférentiellement au niveau de la membrane des granules peroxydase-négatifs (CD11b et cytochrome b_{558}).

Nos conclusions sont en accord avec les observations précédemment effectuées pour la lignée promyelocitaire humaine HL-60: en effet, il a été démontré que dans ces cellules, le cytochrome b_{558} est localisé presque exclusivement au niveau de la membrane plasmique, ainsi que dans les structures qui participent à la synthèse et à l'adressage des protéines. Ceci témoignerait l'incapacité de cette lignée cellulaire de générer les granules spécifiques et laisserait entendre que quand la voie normale de stockage dans les granules est bloquée, la voie alternative amène à la surface de la cellule, avec sécrétion des protéines solubles (telles que la NGAL, *neutrophil-gelatinase associated lipocalin*) et incorporation au niveau de la membrane plasmique des protéines membranaires (telles que le cytochrome b_{558}) (LeCabec et al., 1997).

Une autre confirmation à notre hypothèse est fournie par les données concernant l'expression de surface du cytochrome b_{558} . On sait que dans les PMN à repos, cet hétérodimère est principalement associé à la membrane des granules spécifiques (85%) ainsi qu'à la membrane plasmique (15%); quand les cellules sont stimulées, la sécrétion des granules spécifiques détermine la libération du cytochrome b_{558} et la conséquente augmentation de son expression au niveau de la membrane plasmique et/ou phagosomale (Borregaard et al., 1983 e 1984). Contrairement à ce qui se vérifie dans les PMN, pendant les nombreuses expériences effectuées au laboratoire nous avons observé que l'expression de surface de Nox2 dans les cellules PLB-985 n'est pas modifiée avant ou après activation (cfr Figure 21).

III.B.6.6 Granules tertiaires

- **Dosage de la Gélatinase (MMP-9)**

L'exocytose de granules tertiaires a été évaluée en mesurant l'activité de la MMP9 par zymographie, comme décrit dans matériels et méthodes, § 3.H.9. Pour ces expériences nous avons choisi de tester aussi les surnageants des milieux de culture des cellules, ainsi que les surnageants d'exocytose et les lysats cellulaires. La Figure 33 montre les résultats d'une expérience représentative, dans laquelle nous avons testé pour l'activité gélatinase les milieux de culture, les surnageants d'exocytose et les lysats des cellules indifférenciées (J0) et après 6 jours de traitement au DMF. Le control positif étant représenté par le surnageant d'exocytose des PMN.

Dans les lysats cellulaires l'activité gélatinase est absente (cellules indifférenciées, J0) ou extrêmement faible (cellules différenciées, J6: la pro-MMP9 était $112.6 \text{ pg}/10^7$ cellules). Dans les

surnageants obtenus du test d'exocytose (SNT) la quantité de MMP9 retrouvée est extrêmement faible, pour les deux types cellulaires. De façon surprenant, nous avons retrouvée l'activité enzymatique la plus élevée dans les milieux de culture (MC): dans ces échantillons en effet, la bande relative à la MMP9 latente (pro-MMP9) était visible dans les cellules indifférenciées ($173.0 \text{ pg}/5 \times 10^6$ cellules J0) et dans les cellules différenciées au stade terminal ($740.4 \text{ pg}/5 \times 10^6$ cellules J6); pour ces dernières, on observe aussi la bande à 85 kDa caractéristique de la MMP9 active ($132.7 \text{ pg}/5 \times 10^6$ cellules J6) ainsi que la bande à 72 kDa environ, correspondante à la MMP2 latente ($88.2 \text{ pg}/5 \times 10^6$ cellules J6).

Dans la piste relative au surnageant d'exocytose des PMN on distingue la bande à 130 kDa, correspondante à la MMP9 associée à la NGAL. La quantité de MMP9 dans le surnageant d'exocytose des PMN à $10^7/\text{mL}$ est de $500 \text{ mg}/\text{mL}$

La sécrétion de gélatinase dans le milieu de culture suggère que les cellules PLB-985 ne stockent pas ou accumulent partiellement la gélatinase avant de la libérer, contrairement aux neutrophiles qui exocytose le contenu granulaire suite à la stimulation (Borregaard et al., 1997; Morel et al., 1994). Similairement à ce que nous avons observé pour les PLB, il a été démontré que les lymphocytes B (qui ne possèdent pas granules cytoplasmiques), synthétisent et libèrent à l'extérieur la gélatinase MMP-9, sans l'accumuler dans les compartiments cytoplasmiques. (Trocmé et al., 1998). Ces données sembleraient indiquer que la lignée cellulaire PLB-985 présente un défaut au niveau de la biogénèse des granules tertiaires.

III.B.6.7 Vésicules sécrétoires

- **Dosage du CD11b**

Nous avons vérifié l'exocytose des granules spécifiques et des vésicules sécrétoires sur la base de l'expression de surface du CD11b, la chaîne légère α de l'intégrine $\beta 2$.

La Figure 34 montre que l'expression de ce récepteur est plus élevée dans les cellules WT différenciées par rapport aux cellules indifférenciées; l'expression augmente avec la maturation des cellules en *neutrophile-like*, même si elle reste toujours inférieure à celle des PMN.

De plus, dans les cellules PLB WT, l'expression du marqueur CD11 est faiblement augmentée suite à la stimulation par le fMLF, alors que dans les neutrophiles, l'activation produit une augmentation significative de l'expression du CD11b, par rapport aux cellules non stimulées.

En conclusion, les résultats présentés dans cette thèse montrent que, dans nos conditions de différenciation, les cellules PLB-985 possèdent la plupart des caractéristiques fonctionnelles des granulocytes matures, tels que *burst* respiratoire et exocytose; toutefois, leur réponse fonctionnelle est généralement plus faible par rapport aux neutrophiles humains. Le degré de maturation atteint par les cellules PLB-985 (métamyélocyte, probablement), qui est caractérisé par une faible dégranulation, rend cette lignée inadaptée à l'étude des mécanismes microbicides; toutefois, elle représente un modèle efficace pour l'étude des mécanismes du complexe NADPH oxydase.

III. RESULTATS – Partie C

Ce travail réalisé en collaboration entre le Département de Science de la Vie de l'Université de Trieste et le Centre CGD de l'équipe TheREX. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication internationale [*Defendi F. et al, Biochimica et Biophysica Acta 1792 (2009) 201-210*].

III.C Identification d'une nouvelle mutation ponctuelle dans le promoteur du gène *CYBB* responsable d'un cas rare de CGD X¹⁻

La granulomatose septique chronique est une immunodéficiences primaire dans laquelle les phagocytes sont incapables de produire les dérivées réactives de l'oxygène. Il s'agit d'un désordre très hétérogène, causé par différentes mutations –délétions, mutations faux-sens ou non-sens, altérations des sites d'épissage, insertions – localisées dans l'un de cinq gènes codants pour les sous-unités de la NADPH oxydase.

Deux types de transmission de la maladie sont possibles: la forme autosomale récessive (qui concerne des mutations dans les gènes codants pour les sous-unités p40*phox*, p47*phox*, p67*phox* ou p22*phox*) et la forme la plus commune, avec une transmission liée à l'X (ou X-linked) due aux défauts dans le gène *CYBB* codants pour gp91*phox* ou Nox2. La plupart des cas de CGD diagnostiqués (environ 60%) sont dues à un défaut du gène *CYBB* ; dans ce contexte, les mutations génétiques entraînent dans la plupart des cas la perte de la protéine correspondante : la forme CGD X⁰, la plus fréquente, se traduit par l'absence des deux sous-unités du cytochrome b₅₅₈ et par conséquent de l'absence d'activité oxydase. Une forme plus rare de CGD a été aussi décrite dans la littérature, nommée CGD X⁻, caractérisée par une expression réduite du cytochrome b₅₅₈ et par une réduction proportionnelle de l'activité NADPH oxydase (Stasia et Li, 2008)

L'étude de ces variantes rares de CGD est intéressante car elle permet de mettre en évidence les régions génétiques impliquées dans la régulation de la synthèse de gp91*phox*, dans la stabilisation de la protéine ou encore dans les processus d'activation du complexe oxydase.

Une partie de ce travail de thèse a été dédiée à la caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'un cas rare de granulomatose septique chronique qui depuis quelques années fait l'objet d'étude dans le laboratoire du Département de Sciences de la vie. Il s'agit d'une variante atypique de CGD de type X-linked, caractérisée par une expression diminuée de *gp91phox* (forme nommée CGD X91⁻).

III.C.1 Diagnostic de la CGD

L'arbre généalogique de la famille est montré en Figure 35.

Le diagnostic de la granulomatose septique chronique a été effectué sur la base du test de réduction du Nitrobleu de Tetrazolium (NBT), de la mesure de la production d'anions superoxyde PMA-induite et du contenu en cytochrome b_{558} . Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 12 où l'on peut voir que les valeurs d'activité NADPH oxydase et la concentration du cytochrome b_{558} sont comparables pour les deux patients II-2 et III-5. La production de $O_2^{\cdot-}$ des neutrophiles des patients, activés par le PMA correspond respectivement à 5 et 7% de l'activité des neutrophiles témoin (« control »). La Figure 36 montre les images du test NBT effectué pour les deux patients: on peut distinguer des cellules faiblement positives (neutrophiles) et d'autres cellules fortement positives, qui, sur la base de la forme du noyau, dimensions et coloration orange des granules cytoplasmiques, peuvent être identifiées comme des éosinophiles.

III.C.2 Mesure de l'activité NADPH oxydase

L'activité NADPH oxydase des patients a été évaluée avec le test d'oxydation de la dihydrorhodamine (DHR), par cytométrie en flux. Les résultats sont montrés dans la Figure 37: les neutrophiles du patient II-2 répondent de façon homogène avec un pic unique de fluorescence, qui correspond en intensité à 5% de la fluorescence des neutrophiles « control ».

III.C.3 Vérification de l'expression de *gp91phox* dans les neutrophiles et les éosinophiles

Pour vérifier si la population des éosinophiles observée au cours du test NBT montrait une activité NADPH oxydase, nous avons réalisé une expérience de “double marquage” dans laquelle les cellules étaient marquées avec la DHR pour évaluer la réponse oxydative métabolique et avec l'anticorps monoclonal anti-CRTH2, pour identifier les éosinophiles. Les résultats sont présentés dans la Figure 38 dans laquelle on observe un petit pourcentage d'éosinophiles présent dans la préparation de granulocytes du patient II-2 (< 5%, cellules positives à la DHR et au CRTH2).

Le spectre différentiel réduit moins oxydé du cytochrome b_{558} et le western blot montrent la présence d'une faible quantité de cytochrome b_{558} dans les neutrophiles du patient II-2 et III-5 (14 et 10% respectivement par rapport aux neutrophiles « control ») (Figure 39 A et B). Les facteurs cytosoliques du complexe oxydase, détectés par western blot, sont présents en quantité normale dans l'extrait soluble réalisé à partir des neutrophiles du patient II-2 (données non montrées).

La Figure 40 montre les résultats obtenus de l'analyse cytofluorimétrique des granulocytes « control » et du patient II-2, après incubation simultanée en présence de l'anticorps anti-*gp91phox* (mAb 7D5) et de l'anticorps anti-éosinophiles (mAb CRTH2): pour le témoin, les neutrophiles ainsi que les éosinophiles expriment la protéine *gp91phox*, par contre, pour le patient II-2, seul les éosinophiles sont Nox2-positifs.

III.C.4 Identification du défaut moléculaire

La RT-PCR conduite à partir de l'ARNm du patient II-2 et l'analyse de la séquence obtenue n'ont pas mis en évidence de mutation dans l'ADNc de la protéine *gp91phox*; l'amplification par PCR de la région promotrice du gène *CYBB* et le séquençage ont permis d'identifier l'insertion d'une thymidine (T) en position -54T à -56T. (Figure 41A) Cette mutation est localisée dans la région entre les séquences “CCAAT” et “TATA” dans un site consensus pour les facteurs de transcription de la famille *ets* (Figure 41B).

III.C.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

La Figure 42 montre les résultats obtenus avec les expériences d'EMSA, effectuées pour évaluer l'effet de la mutation identifiée dans le promoteur sur l'association d'un extrait nucléaire de cellules PLB-985 avec les facteurs de transcription de *gp91phox*. Il s'agit d'une technique utilisée pour étudier les interactions ADN-protéines et basée sur le fait que les complexes ADN-protéines migrent, sur un gel de polyacrilamide, plus lentement par rapport à l'ADN non lié, en produisant un « shift » dans la migration de l'ADN marqué.

L'incubation des oligonucléotides double brins marqués à la biotine, correspondants à la région promotrice (de -68 à -30) avec l'extrait nucléaire obtenu dans les cellules PLB-985 permet de visualiser dans le gel la bande relative au complexe ADN/protéines. La formation de ce complexe est progressivement inhibée en ajoutant les oligonucléotides sauvages (WT) non marqués à concentrations croissantes (20-, 50- et 100- fois plus concentrés par rapport aux oligonucléotides marqués). Par contre, le complexe ADN/protéines reste inaltéré en ajoutant des quantités croissantes d'oligonucléotides "mutés" (CGD X91⁻) non marqués.

Ces résultats démontrent que la mutation localisée dans cette région est corrélée à l'inhibition de l'association des protéines liantes l'ADN et empêchent par conséquence l'expression normale et complète du gène *CYBB*.

III.C.6 PCR semi quantitative

Une estimation de la quantité d'ARNm pour *gp91phox* présent dans les neutrophiles du patient II-2 a été possible grâce aux expériences de RT-PCR semi quantitative, réalisées en présence de β -actine comme gène de ménage et en conditions non-saturantes: la PCR a été conduite pour 25 cycles (au lieu de 35); de cette façon, l'amplification des ARN (pour *gp91phox* et pour la β -actine) s'arrête au cours de la phase exponentielle, avant de rejoindre le plateau de saturation. La Figure 43 montre que, dans ces conditions, l'amplification de l'ARNm pour *gp91phox* du patient II-2 est sensiblement inférieure à celle obtenue pour le témoin et pour les patients CGD X91⁺ et CGD X91⁰. Le signal correspondant au gène de la β -actine est comparable dans tous les ARNm testés.

III.C.7 Mesure de la bactéricidie des neutrophiles du patient

Enfin, dans le but d'évaluer l'impact de l'activité NADPH oxydase réduite sur l'activité bactéricide des neutrophiles *in vitro*, nous avons mesuré le «killing» de ces cellules vis à vis de *S. aureus*, *C. albicans* et *E. coli*: la Figure 44 montre que l'activité bactéricide des neutrophiles du patient II-2 est superposable à celle d'un patient CGD X⁰ (caractérisé par l'absence du cytochrome b₅₅₈): les neutrophiles du patient CGD X⁻ ne sont pas capables de tuer les microorganismes *S. aureus* e *C. albicans*, même en prolongeant les temps d'incubation (90 minutes); le «killing» de *E. coli*, qui est connu pour être indépendant de l'activité NADPH oxydase, est comparable à celui des neutrophiles « control ».

IV. CONCLUSIONS

Dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à évaluer finement les mécanismes de bactéricidie des neutrophiles humains; pour cela, nous avons donné 3 volets à cet étude :

- 1) Réexaminer les processus de bactéricidie dans les neutrophiles humains normaux, ainsi que dans les neutrophiles de patients atteints de CGD X⁰ et neutrophiles de patients avec une déficience en MPO.
- 2) Les mécanismes impliqués dans la bactéricidie des neutrophiles ont été étudié en utilisant également un modèle expérimental très connu en littérature pour les recherches sur le fonctionnement du complexe NADPH oxydase: la lignée cellulaire PLB-985 différentiable en « pseudo-neutrophiles ». En particulier nous avons voulu déterminer si les cellules PLB-985 Dloop_{Nox4}-Nox2 (dans lesquelles la séquence correspondante à la 2^{ème} boucle intracellulaire de Nox2 a été remplacée par celle de l'oxydase homologue, Nox4), caractérisées par une « super-activité » oxydase, étaient pourvues d'un pouvoir bactéricide augmenté.
- 3) Nous avons également étudié un cas rare de granulomatose septique chronique, la forme X91⁻, caractérisé par une activité oxydase réduite (environ 5% du témoin), pour comprendre si cette faible production d'O₂⁻ était suffisante à soutenir l'activité de « killing ».

1) Nous avons d'abord réexaminé les mécanismes impliqués dans la bactéricidie des neutrophiles, sur la base des nouvelles hypothèses récemment proposées (Reeves et al., 2002; Ahliwalia et al., 2004; Segal, 2005) en appliquant la méthode correcte pour la mesure du «killing» des microorganismes récemment mise au point (Decleva et al., 2006). Les résultats que nous avons obtenus démontrent que:

- a. L'activité NADPH oxydase est indispensable pour le «killing» de certains microorganismes (tels que *S. aureus* et *C. albicans*) mais pas pour d'autres (tels que *E. coli*) qui sont efficacement tués même en absence d'explosion respiratoire.
- b. Les flux d'ions potassium et l'alcalinisation du pH intraphagosomal, induits par l'activation du complexe oxydase, ne sont pas nécessaires au «killing» de *S. aureus* et *C. albicans*.
- c. L'activité antibactérienne NADPH oxydase-dépendante est médiée presque exclusivement par la myeloperoxydase.
- d. Les courants d'ions K⁺ semblent être responsables de l'activité antibactérienne résiduelle des neutrophiles MPO-déficientes, après un long temps d'incubation; ces flux

de potassium seraient toutefois médiés par des canaux autres que ceux identifiés par le groupe du professeur Segal (canaux BK_{Ca}) dont la présence n'a pas été confirmée dans les neutrophiles humains.

- 2) Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude des mécanismes de bactéricidie dans le modèle cellulaire PLB-985 ; les résultats que nous avons obtenus en ce contexte suggèrent que:
- a. La production des FRO par la lignée cellulaire PLB-985 en réponse aux stimuli particuliers (microorganismes opsonisés) est sensiblement plus faible que pour les neutrophiles humains.
 - b. Ce *burst* respiratoire est responsable d'une activité bactéricide, pour les microorganismes sensibles aux mécanismes de «killing» oxygène-dépendants (*S. aureus* e *C. albicans*), comparable à celle des PMN pour des court temps d'incubation; toutefois, en prolongeant l'incubation, le pouvoir bactéricide de ces cellules est aboli.
 - c. Par rapport à *E. coli*, bactérie sensible aux processus de «killing» oxygène-indépendants, l'activité bactéricide des cellules PLB-985 est partiellement déficitaire, comparée aux PMN.
 - d. La superproduction d'anions superoxyde, mise en évidence dans les cellules PLB-985 Dloop_{Nox4}-Nox2 en réponse aux stimuli solubles et particuliers (*S. aureus*, *C. albicans*), n'est pas accompagnée par une augmentation de la capacité bactéricides des cellules vis à vis de *S. aureus*, *C. albicans* et *E. coli*.

Ces résultats ont plusieurs explications :

- a. dans les cellules PLB-985, les processus bactéricides non oxydatifs sont très diminués, à cause du défaut partiel (MPO, élastase, cathepsine G, β -glucuronidase, lysozyme, CD11b) ou totale (lactoferrine, MMP8, MMP9) des enzymes et des protéines granulaires impliqués dans l'activité bactéricide. Nos résultats suggèrent en particulier un défaut au niveau de la synthèse des granules spécifiques et tertiaires.
 - b. Le contenu en cytochrome b₅₅₈ des cellules PLB-985 est très faible (un dixième par rapport aux PMN) à cause de l'absence des granules secondaires, qui constituent le principal réservoir de l'hétérodimère (85%).
- 3) Le dysfonctionnement du complexe enzymatique de la NADPH oxydase est à la base d'une maladie génétique rare, la granulomatose septique chronique. Nous nous sommes intéressés à la

caractérisation d'un cas atypique de CGD, la forme X91⁻. Les résultats obtenus nous ont permis de démontrer que:

- a. la nouvelle mutation que nous avons identifiée dans le promoteur du gène *CYBB* (insertion d'une thymidine dans la position -54T/-56T) est responsable de la diminution de l'association des facteurs de transcription de la famille *ets* avec la région promotrice. Cette mutation empêche donc l'expression normale du gène dans les neutrophiles des patients et détermine une activité oxydase réduite, mesurée dans l'ensemble de la population des granulocytes.
- b. L'expression et l'activité fonctionnelle de la NADPH oxydase apparaît normale dans les éosinophiles, ce qui indique que l'expression de *gp91phox* dans ces cellules est régulée par des facteurs de transcription autres que ceux qui opèrent dans les neutrophiles;
- c. L'activité oxydase résiduelle (5-7% du control) n'est pas suffisante pour garantir, *in vitro*, une activité de «killing» vis à vis de *S. aureus* e *C. albicans* ni pour protéger le patient des infections sévères et récidivantes, caractéristiques de la CGD.

1.A I leucociti polimorfonucleati neutrofilici (PMN)

I leucociti polimorfonucleati neutrofilici (PMN) e i monociti macrofagi rappresentano la principale difesa contro i microrganismi patogeni: quali fagociti professionali, sono infatti in grado di fagocitare e distruggere gli agenti infettivi.

I PMN e i monociti circolanti sono generati nel tessuto ematopoietico e vengono rilasciati nel circolo sanguigno dopo molteplici passaggi di maturazione e differenziazione (Imhof et al., 2004). I granulociti e monociti si differenziano a partire da un precursore mieloide comune, grazie all'influenza di fattori di crescita come il G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) per i granulociti, e il M-CSF (monocyte colony-stimulating factor) per i monociti (Ogawa, 1993). Le cellule dirette verso la linea granulocitica evolvono successivamente in mieloblasti, promielociti, metamielociti, granulociti non segmentati e infine, in PMN maturi. I neutrofilici maturi sono suddivisi in un pool circolante e in un pool marginale, risultante dal confinamento dei PMN nei capillari polmonari. Questo secondo pool può essere rapidamente ed efficientemente mobilitato in seguito ad infiammazione. Diversamente dai PMN, i monociti circolanti sono rilasciati dal midollo osseo come cellule non terminalmente differenziate.

I neutrofilici rappresentano circa il 70% della popolazione di granulociti circolanti. In seguito al danno tissutale essi sono mobilitati in proporzioni massicce a partire dal pool marginale, generando di conseguenza una rapida neutrofilia che è caratteristica del processo di infiammazione acuta. Al microscopio ottico i neutrofilici appaiono come cellule di 12-14 µm di diametro, caratterizzate da un nucleo multilobato, con 2-5 lobi distinti uniti da sottili fili di materiale nucleare, costituito da cromatina altamente condensata, indice di un basso grado di sintesi proteica; il numero di lobi varia a seconda dell'età della cellula. Il citoplasma appare di colore chiaro, contiene pochi organelli tra cui alcuni resti del reticolo endoplasmatico rugoso, ribosomi liberi e resti del complesso di Golgi. Nel citoplasma si ritrovano anche granuli dotati di membrana propria che grazie al contenuto di una varietà di enzimi e proteine antimicrobiche svolgono un ruolo cruciale nell'uccisione e degradazione dei microrganismi fagocitati e nella risposta infiammatoria neutrofilo-mediata. Sono state identificate quattro popolazioni di granuli: i primari, o azurofilici, i secondari o specifici, i terziari, o ricchi in gelatinasi, e le vescicole secretorie.

1.A.1 I PMN nella risposta infiammatoria acuta

Il duplice ruolo dei neutrofili nell'immuno-sorveglianza e nell'eliminazione in situ dei microorganismi, richiede una rapida transizione da uno stato circolante non aderente ad uno stato aderente, che permette loro di migrare attraverso i tessuti, ove necessario. Nelle prime fasi della risposta infiammatoria si assiste infatti ad un rallentamento del flusso sanguigno, a livello del microcircolo del sito di flogosi, che determina l'avvicinamento e l'accumulo dei PMN in prossimità dell'endotelio: questa prima fase viene definita "*marginazione*". Le cellule endoteliali, in risposta a citochine proinfiammatorie e sostanze vasoattive si attivano e, in primo luogo, producono molecole ad azione vasodilatatoria che provocano un aumento locale del flusso ematico e favoriscono quindi l'arrivo dei leucociti nel sito d'infiammazione; in secondo luogo, aumentano l'espressione di molecole, le selettine, che mediano una rapida adesione a bassa affinità tra leucociti e endotelio.

La maggior parte dei leucociti esprimono la L-selettina, mentre le cellule endoteliali esprimono la P- e la E-selettina, in grado di interagire con uno specifico ligando (PSGL1, P-selectin glycoprotein ligand 1), localizzato sui leucociti, a livello delle estremità dei microvilli. Questa interazione transitoria si traduce nel rotolamento (*rolling*) dei neutrofili circolanti sulla superficie delle cellule endoteliali. Durante questa fase, in risposta a citochine sintetizzate da leucociti già presenti nel sito di flogosi o da cellule endoteliali attivate, i neutrofili vanno incontro ad attivazione: attraverso il riarrangiamento del citoscheletro modificano la propria forma sferica assumendone una più piatta. L'esocitosi dei granuli intracitoplasmatici determina poi l'iperespressione e/o l'attivazione delle integrine β_2 , recettori che mediano l'adesione stabile alla superficie endoteliale (**Figura 1**).

In questa fase, i leucociti fissati all'endotelio devono attraversare la barriera vascolare per raggiungere il tessuto infiammato. Questo passaggio è reso possibile grazie alla migrazione delle cellule, mediata dalle integrine, che necessita di una polarizzazione del corpo cellulare e della creazione di lamellipodi e uropodi in corrispondenza della coda dei leucociti; la formazione di queste strutture è guidata dalle integrine e dal citoscheletro. In questo stadio, i leucociti migrano quindi lentamente sulla superficie luminale e in corrispondenza delle giunzioni interendoteliali trasmigrano raggiungendo il tessuto.

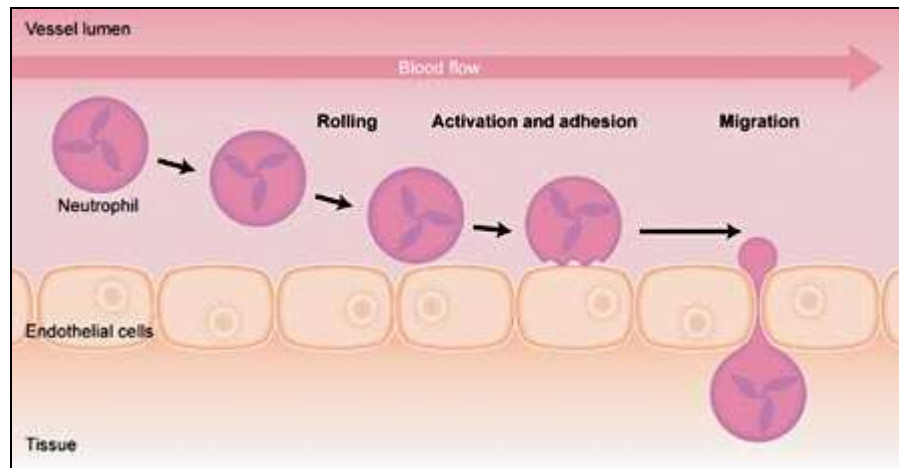


Figura 1: Fasi dell'extravasazione dei neutrofili. L'endotelio vascolare adiacente alla sede di flogosi secerne sostanze attivanti i neutrofili e mobilizza selettine che stabiliscono interazioni stabili con specifici ligandi presenti sulla superficie dei neutrofili. Tale interazione promuove il *rolling* dei neutrofili lungo l'endotelio e induce l'attivazione e l'iperespressione delle integrine: queste mediano la fase di adesione all'endotelio e promuovono la trasmigrazione.

La fuoriuscita dei neutrofili dal circolo sanguigno é un processo noto come *diapedesi*. In questa fase, tre categorie di molecole sembrano essere implicate: le JAM (junctional adhesion molecule), le PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1), entrambe appartenenti alla superfamiglia delle IgG, e il CD99. La famiglia delle JAM comprende tre molecole, denominate JAM-A, JAM-B e JAM-C che sono concentrate nelle "tight junction"; JAM-A é coinvolta nella migrazione transendoteliale dei leucociti grazie alla sua interazione con l'integrina LFA1 (lymphocyte function-associated antigen 1, nota anche come integrina $\alpha_L\beta_2$). Le molecole JAM-B e JAM-C interagiscono rispettivamente con le integrine $\alpha_4\beta_1$ e CD11b/CD18, presenti sulla superficie dei leucociti. PECAM-1, espressa sulla superficie dei leucociti e delle cellule endoteliali, in particolare a livello delle giunzioni intercellulari, media l'extravasazione dei neutrofili attraverso interazioni di tipo omofilico PECAM-1/PECAM-1. Allo stesso modo, CD99 é concentrata a livello delle regioni tra le cellule endoteliali.

Una volta fuoriusciti dal circolo sanguigno, i neutrofili raggiungono il focolaio infiammatorio guidati da fattori chemiotattici quali citochine (IL-8), componenti del complemento (C5a), metaboliti batterici (peptidi formilati, endotossine) o prodotti del metabolismo dell'acido arachidonico (leucotriene B4). Tra le citochine, l'interleuchina 8 é il principale agente chemioattrattore per i neutrofili: l'uso di anticorpi monoclonali anti IL-8 in modelli animali inibisce completamente il reclutamento dei neutrofili nel sito dell'infiammazione (Folkesson et al., 1995; Matsumoto et al., 1997).

I.A.2 Fagocitosi e uccisione di microorganismi patogeni

Il processo che porta all'uccisione, da parte dei PMN, dei microorganismi patogeni presenti nella sede di flogosi può essere suddiviso in più fasi: riconoscimento e adesione alla particella da fagocitare, ingestione, uccisione e digestione dei microorganismi. I fagociti esprimono molteplici recettori di superficie che partecipano al riconoscimento e all'internalizzazione delle particelle. Alcuni di questi recettori sono implicati nella trasmissione di segnali intracellulari che innescano la fagocitosi, altri sembrano essenzialmente coinvolti nel legame delle particelle o nell'aumento dell'efficacia dell'internalizzazione.

Si riportano qui di seguito le principali classi di recettori presenti sulla membrana plasmatica dei PMN, implicati nel processo di fagocitosi (Kantari et al., 2008).

- ***Recettori per Fc γ***

I recettori Fc γ sono recettori di superficie in grado di legare la porzione Fc delle Immunoglobuline G e che consentono ai fagociti di riconoscere particelle opsonizzate da IgG. L'attivazione di recettori ad alta affinità (Fc γ -RI) e a bassa affinità (Fc γ -RII e Fc γ -RIII), innesca la fagocitosi attraverso la polimerizzazione dell'actina, che permette l'estensione della membrana plasmatica e la formazione di protrusioni che circondano la particella e ne determinano l'ingestione.

- ***Recettori del complemento***

I PMN esprimono tre tipi differenti di recettori per il complemento: CR1 (anche noto come CD35), CR3 (integrina CD11b/CD18) e CR4 (integrina CD11bc/CD18). Attraverso questi recettori i neutrofili legano microorganismi opsonizzati da fattori del complemento. Il CR1 lega componenti del complemento quali C1q, C4b e C3b. Citochine infiammatorie quali il TNF α e prodotti batterici quali il lipopolisaccaride (LPS) stimolano la fagocitosi *via* il recettore CR3. In vitro, questa cascata di attivazione del segnale può essere stimolata dal forbol miristato acetato (PMA) e porta quindi all'attivazione della protein chinasi C. La contemporanea implicazione dei recettori CR e Fc γ si traduce in un effetto "cooperativo" sul processo di internalizzazione delle particelle.

- ***Recettori Scavengers***

Inizialmente definiti in base alla loro capacità di legare e internalizzare lipoproteine modificate, i recettori *scavengers* sono inoltre in grado di riconoscere ligandi come poliribonucleotidi, LPS o particelle di silice (Platt et. al., 1999).

- ***Lectine***

Le lectine mediano il riconoscimento di carboidrati endogeni ed esogeni cooperando al riconoscimento dei microorganismi; in particolare, risultano coinvolti nell'internalizzazione dello zymosan.

- ***Recettori Toll-Like e Nod-Like***

Si tratta di due famiglie di recettori dell'immunità innata richieste per il riconoscimento di un ampio spettro di metaboliti batterici, tra cui il LPS, peptidoglicani e lipopeptidi batterici (Akira et al., 2001; Aderem et al., 2000).

L'adesione tra la cellula bersaglio opsonizzata e i recettori presenti sulla superficie dei PMN dà inizio al processo di avvolgimento della membrana del fagocita attorno alla particella. Tale interazione recettoriale avvia infatti un riarrangiamento nel citoscheletro actinico dei neutrofili che permette loro di avvolgersi attorno alla particella da fagocitare con un meccanismo definito "a cerniera": le estroflessioni citoplasmatiche (*pseudopodi*) si estendono in continuo contatto con la superficie microbica fino a fondersi tra loro formando il cosiddetto *fagosoma* (o vacuolo di fagocitosi). La formazione di pseudopodi, indotta dal riconoscimento, é, come detto, legata a modificazioni del citoscheletro actinico; infatti, sostanze in grado di interferire con l'assemblaggio e il disassemblaggio di componenti citoscheletriche (quali le citocalasine B e D) esercitano un effetto inibitorio sul processo di fagocitosi.

L'internalizzazione dei microorganismi attraverso la fagocitosi é accompagnata dalla produzione di molecole di segnale proinfiammatorie e dall'attivazione di meccanismi antimicrobici. I neutrofili sono infatti in grado di uccidere i patogeni internalizzati grazie alla simultanea cooperazione di più processi:

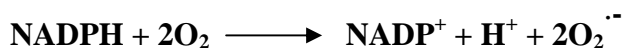
- la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), scatenata dall'attivazione del complesso enzimatico NADPH ossidasi (*meccanismi ossigeno-dipendenti*);
- la degranolazione dei compartimenti citoplasmatici nel fagolisosoma, che porta al rilascio di proteasi preformate e proteine antibiotiche (*meccanismi ossigeno-indipendenti*);
- la formazione, recentemente evidenziata, di *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs).

Una particella opsonizzata viene internalizzata nel vacuolo di fagocitosi in circa 20 secondi, e la sua uccisione è quasi immediata (Segal et al., 1981).

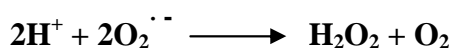
1.B. Meccanismi microbicidi ossigeno dipendenti

1.B.1 La NADPH ossidasi dei fagociti

La fagocitosi dei microorganismi patogeni si accompagna ad un aumento del metabolismo ossidativo, evento definito “burst” (esplosione) respiratorio. Questa attività venne inizialmente associata alla respirazione mitocondriale, ma si rivelò insensibile agli inibitori mitocondriali tradizionali (cianuro, azide, antimicina) e strettamente collegata ad un aumento della glicogenolisi, ad un’accelerazione del ciclo dei pentoso-fosfati, e alla produzione di metaboliti reattivi dell’ossigeno. L’enzima responsabile di questa esplosione respiratoria è la NADPH ossidasi. In risposta ad uno stimolo infiammatorio, infatti, la NADPH ossidasi catalizza il trasferimento di elettroni, derivati dallo “shunt” dei pentoso-fosfati, dal donatore nel citoplasma (l’NADPH) all’acceptore nel fagosoma o nello spazio extracellulare (l’ossigeno molecolare), permettendo così la formazione di anioni superossido:

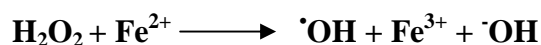


I neutrofili generano grandi quantità di anioni superossido, che raggiunge nel vacuolo concentrazioni comprese tra 1 e 4 moli/litro (Klebanoff SJ et al., 1969; Reeves EP et al., 2002). La sua concentrazione allo *steady state* è dell’ordine del micromolare (Hampton MB et al., 1998) a causa della rapida dismutazione del radicale superossido spontanea o catalizzata dalla superossido dismutasi (SOD) per produrre perossido di idrogeno:



Il perossido di idrogeno (H_2O_2) così formato è un intermedio ridotto dell’ossigeno moderatamente tossico; la sua concentrazione nei neutrofili è regolata da enzimi quali la catalasi (presente nei perossisomi) e le glutatione perossidasi (localizzate essenzialmente nel citoplasma). La tossicità del perossido di idrogeno è attribuibile alla sua capacità di generare il

radicale idrossile ($\cdot\text{OH}$) in presenza di cationi metallici quali il ferro (Fe^{2+}) nella reazione di Fenton:



Il perossido di idrogeno può essere inoltre trasformato in acido ipocloroso (HOCl) nella reazione catalizzata dalla mieloperossidasi (MPO), in presenza di alogenuri, tra cui il più comune è il cloruro (Cl^-):



L'acido ipocloroso è una specie chimica dotata di una notevole capacità microbica: interagendo con i residui amminoacidici della parete batterica, esso forma cloramidi, molecole altamente instabili che si trasformano in aldeidi; queste ultime formano legami crociati tra le proteine, creando fori nella parete del microorganismo. I radicali liberi $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ e l' HOCl contribuiscono ad ampliare il danno della parete cellulare (Klebanoff, 1999).

L'anione superossido reagisce inoltre con l'ossido nitrico (NO) per formare il perossinitrito, specie fortemente instabile, che può a sua volta essere metabolizzato e originare altre specie reattive dell'azoto (RNS, reactive nitrogen species) altamente reattive. L'importanza delle RNS nell'attività microbica dei fagociti è attualmente ignota, ma sembra predominante nei roditori (Klebanoff SJ, 2005).

1.B.1.1 Struttura del complesso NADPH ossidasi

La NADPH ossidasi è un complesso multimerico dissociato nelle cellule a riposo; è costituito da un centro redox ancorato alla membrana (il flavocitocromo b_{558}), dai fattori citosolici $\text{p}47\text{phox}$, $\text{p}67\text{phox}$, $\text{p}40\text{phox}$ e da due proteina G monomeriche: $\text{Rac}1/2$ e $\text{Rap}1\text{A}$.

- **Il flavocitocromo b_{558}**

Il flavocitocromo b_{558} è il cuore catalitico del complesso NADPH ossidasi; in condizioni di riposo, esso è essenzialmente presente a livello dei granuli specifici (85%), mentre il restante 15% è ripartito tra le vescicole secretorie e la membrana plasmatica (Borregaard et al., 1984). In

seguito ad attivazione, esso viene incorporato a livello della membrana del vacuolo di fagocitosi dove permette il passaggio di elettroni dal NADPH nel citoplasma all'ossigeno nel vacuolo.

Il citocromo b_{558} è composto da due subunità: la catena pesante, o catena β , gp91 $phox$ (dove gp sta per glicoproteina, e $phox$ per "phagocyte oxidase") ribattezzata Nox2 nel 1999, e la catena leggera, o catena α , p22 $phox$. Questo citocromo contiene due molecole di eme, ognuna con un atomo di ferro, che permettono il trasferimento degli elettroni.

Nox2, la cui struttura è mostrata nella Figura 2, è una proteina di 570 amminoacidi codificata dal gene *CYBB*, costituito da 13 esoni e localizzato sul braccio corto del cromosoma X (Xp21.1) (Royer-Pokora et al., 1986). Nox2 è sintetizzata sottoforma di un precursore del peso di 65 kDa parzialmente glicosilato nel reticolo endoplasmatico. Questo precursore matura successivamente a livello del complesso di Golgi diventando una proteina altamente glicosilata del peso di 91kDa (Porter et al., 1996; Yu et al., 1997). La regione idrofobica N-terminale contiene sei α -eliche transmembrana; le α -eliche III e V contengono ciascuna due residui di istidina posizionate in modo tale da coordinare i due gruppi eme. Questi residui di istidina sono totalmente conservati negli altri membri della famiglia delle NADPH Ossidasi (NADPH OXIDASE, o NOX). Il lato idrofilico C-terminale, citoplasmatico, contiene i siti di legame per le molecole FAD e NADPH (Segal et al., 1992).

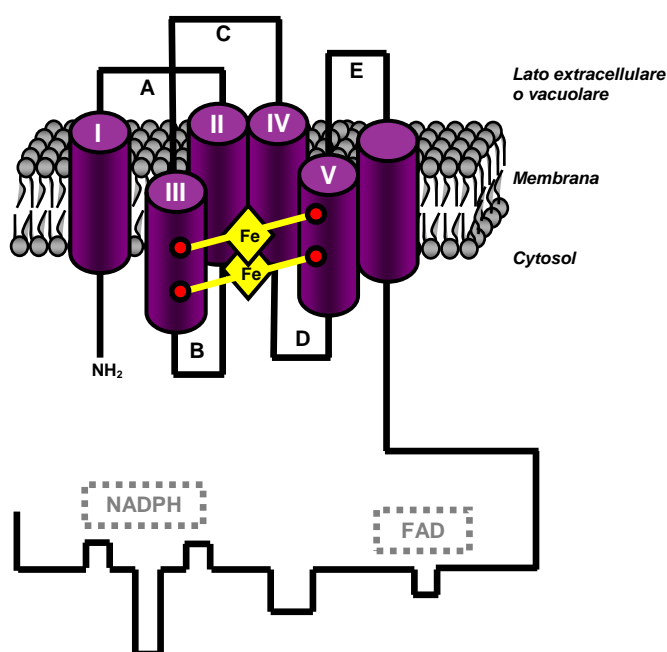


Figura 2: Rappresentazione schematica della struttura di Nox2. Si distinguono le sei α eliche transmembrana, e, in particolare, i domini III e V contenenti ciascuno due residui di istidina (in rosso) che coordinano i gruppi eme. La regione carbossi terminale contiene i siti di legame per il FAD e l'NADPH. Il passaggio di elettroni si svolge dal FAD al NADPH, quindi ai due gruppi eme, e infine all'ossigeno molecolare.

p22phox è una proteina di 195 amminoacidi, codificata dal gene *CYBA* costituito da 6 esoni e situato a livello del braccio lungo del cromosoma 16 (16q24) (Dinauer et al., 1990). Il suo profilo di idrofobicità suggerisce la presenza di due α -eliche transmembrana, ma la sua topologia resta ancora da definire. A livello strutturale, è stata messa in evidenza una regione ricca in residui di prolina sulla coda C-terminale che interagirebbe con il dominio SH3 (per Src homology 3) della proteina p47phox fosforilata durante l'attivazione del complesso enzimatico (De Leo et al., 1996; Leto et al., 1994; Sumimoto et al., 1996). La proteina p22phox è anche il punto di ancoraggio del fattore citosolico p67phox. L'associazione di p22phox con la subunità β del citocromo b₅₅₈ si verifica subito dopo la sintesi di gp65 (proteina precursore di gp91phox) ma prima della sua glicosilazione nel complesso di Golgi. Il ruolo preciso svolto dalla proteina p22phox non è a tutt'oggi ancora ben definito, ma sembra evidente la sua importanza per la stabilità del citocromo b₅₅₈: l'espressione della subunità β matura (glicosilata) è possibile solo in presenza di p22phox (Yu et al., 1997).

- **I fattori citosolici**

p47phox è una proteina fortemente basica di 390 amminoacidi, codificata dal gene *NCF1* (per "Neutrophil Cytosolic Factor"), situato a livello del braccio lungo del cromosoma 7 (7q11.23). Questa proteina possiede, nella sua sequenza:

- due domini SH3 (*Src* homolgy domain 3) implicati nelle interazioni proteina-proteina;
- due siti ricchi in residui di prolina situati uno nella regione N-terminale e l'altro nella regione C-terminale; queste due regioni interagirebbero con i domini SH3 di p67phox o di p40phox;
- numerosi siti di fosforilazione nella regione C-terminale.

Durante l'attivazione del complesso NADPH ossidasi, p47phox è fosforilata a livello dei residui di serina localizzati sulla regione C-terminale (El Benna et al., 1994 e 1996); alcune di queste fosforilazioni sarebbero indispensabili per determinare un cambiamento conformazionale della regione C-terminale della proteina, che permetterebbero di esporre un sito d'interazione per il citocromo b₅₅₈.

La proteina **p67phox**, costituita da 526 amminoacidi, è codificata dal gene *NCF2* che comporta 16 esoni, ed è situato sul cromosoma 1 (1q25) (Leto et al., 1990). Possiede un sito di legame specifico per la proteina Rac (Koga et al., 1999) e può interagire con p40phox (Ito et al., 2001); sembra inoltre che la proteina p67phox contenga un sito catalitico di legame per il NADPH. È stato dimostrato che questa subunità viene fosforilata durante l'attivazione del complesso

enzimatico (El Benna et al., 1997). Questa proteina contiene due domini simili nella coda C-terminale, caratterizzati da una elevata identità di sequenza con il dominio regolatore SH3 presente nel prodotto dell'oncogene Src. (Leto et al., 1990).

Il gene codificante per **p40phox** é localizzato sul cromosoma 22 (22q13.1). Questa proteina di 339 amminoacidi é sicuramente quella il cui ruolo é più dibattuto; é stato dimostrato che essa é in grado di interagire con p67phox (Tsunawaki et al., 1996), e sembra avere un'affinità per la regione ricca in proline di p47phox (Grizot et al., 2001). Il ruolo rivestito da p40phox durante l'attivazione della ossidasi resta ancora da chiarire: essa permetterebbe di aumentare l'affinità di p47phox per il citocromo b₅₅₈ (Cross et al., 2000), o potrebbe essere implicata nella traslocazione dei fattori citosolici p47phox e p67phox (Kuribayashi et al., 2002). Altri autori (Lopes et al. 2004) sostengono invece che la proteina p40phox fosforilata inibisce l'attività ossidasica nei sistemi ricostituiti *in vitro*.

- **Proteine G monomeriche**

Rac: contrariamente alle altre proteine citosoliche, Rac può migrare e interagire indipendentemente dagli altri fattori citosolici con la membrana plasmatica. Sono state identificate 3 isoforme: Rac 1, Rac 2 (l'isoforma predominante nei neutrofili) e Rac 3. Queste isoforme presentano un grado di omologia del 92% sui 192 amminoacidi che le costituiscono. Nel citoplasma delle cellule non stimolate, Rac é associata ad una molecola inibitrice, RhoGDI (GDP Dissociation Inhibitor), che la mantiene nella sua forma inattiva. In seguito alla stimolazione, lo scambio GDP-GTP permette alla proteina Rac di dissociarsi dal fattore RhoGDI, e quindi di migrare verso la membrana e interagire con p67phox (Heyworth et al., 1994; Koga et al., 1999). L'idrolisi del GTP è favorita dalle proteine Rac-GAP (GTPase Activating Protein) presenti a livello della membrana plasmatica e coinvolte nella disattivazione del complesso ossidasi.

Rap 1A: è una piccola proteina G di 22 kDa, associata al citocromo b₅₅₈ secondo una stechiometria di 1 :1 (Quinn et al., 1992). Come il citocromo b₅₅₈, Rap 1A sarebbe localizzata a livello della membrana dei granuli specifici e della membrana plasmatica ; in seguito alla stimolazione dei neutrofili, più del 50% dello stock di Rap 1A traslocherebbe alla membrana plasmatica (Quinn et al., 1992). Il suo ruolo nell'attivazione del complesso ossidasi è ancora poco chiaro.

1.B.1.2 Attivazione del complesso NADPH ossidasi

L'attivazione del complesso ossidasi si verifica in seguito ad una serie di interazioni proteina-proteina, come illustrato in Figura 3. Nox2 é costitutivamente associata a p22phox; l'attivazione della NADPH ossidasi necessita della traslocazione dei fattori citosolici verso il complesso gp91phox/p22phox. La fosforilazione di p47phox determina un cambiamento conformazionale che ne favorisce l'interazione con p22phox; si pensa che il fattore citosolico p47phox intervenga per "organizzare" la traslocazione degli altri fattori citosolici, ed é per questo che tale componente é anche definito "organizer subunit". La localizzazione di p47phox alla membrana permette il legame della subunità p67phox (definita "activator subunit") a Nox2.e l'ancoraggio di p40phox al complesso. Infine, la proteina Rac GTPasi interagisce con Nox2 in un processo bifasico che prevede l'iniziale interazione diretta con gp91phox, seguita dall'interazione con p67phox. Una volta assemblato, il complesso é attivo ed in grado di generare anioni superossido trasferendo elettroni dall'NADPH citoplasmatico all'ossigeno del lume fagosomale o dello spazio extracellulare.

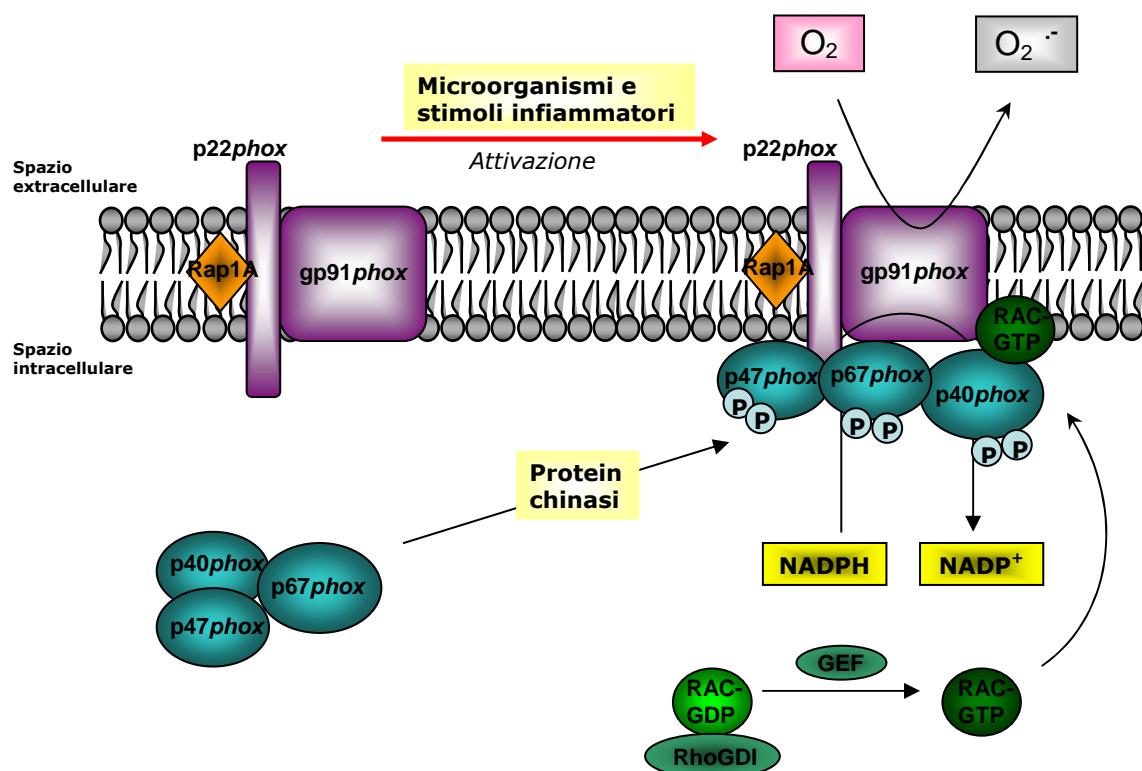


Figura 3: Modello di assemblaggio del complesso NADPH ossidasi dei fagociti.

1.B.2 La Mieloperossidasi (MPO)

La mieloperossidasi é prodotta a partire di un singolo gene di circa 11 kb, composto da 11 introni e 12 esoni e localizzato a livello del braccio lungo del cromosoma 17. L'iniziale traduzione genera una proteina di circa 80 kDa che, dopo rimozione proteolitica di un peptide segnale di 41 amminoacidi, subisce una N-glicosilazione con l'incorporazione di una catena ricca in residua di mannosio, per generare una apoproMPO enzimaticamente inattiva di circa 89-90 kDa. Questo precursore forma nel reticolo endoplasmatico un complesso con due proteine leganti il calcio, la calreticulina e la calnexina, che agiscono da chaperonine. Con l'inserimento di un gruppo eme la apoproMPO é convertita in proMPO enzimaticamente attiva. Due successivi clivaggi proteolitici portano alla formazione di una catena pesante α di circa 51 kDa e di una catena β leggera di 12 kDa. La mieloperossidasi matura é un'eme-proteina composta da due eterodimeri identici; le due metà sono legate da ponti disolfuro tra le due catene pesanti. I residui di mannosio e i due gruppi eme sono legati covalentemente alle subunità α ; i due gruppi eme presentano proprietà spettroscopiche assai originali che ne determinano il colore verde: infatti l'enzima era stato inizialmente denominato verdoperxidase (Agner, 1941; Klebanoff SJ., 2005).

La MPO rappresenta circa il 5% delle proteine neutrofiliche totali ed é localizzata a concentrazioni elevate nei granuli azurofili. Qui, la MPO costituisce il 25% delle proteine granulari, e, una volta rilasciata durante l'attivazione cellulare, raggiunge concentrazioni pari a circa 100mg/mL (1 mM) nel vacuolo di fagocitosi. La mieloperossidasi catalizza l'ossidazione H_2O_2 -dipendente di svariati substrati, in presenza di perossido di idrogeno (H_2O_2); suoi substrati preferenziali sono cloruro, fluoruro, bromuro e ioduro. I corrispondenti acidi alogenuri formati sono fortemente reattivi e letali per la maggiorparte dei microorganismi. Viste le elevate concentrazioni di cloruro nel citoplasma e nel fagosoma, é l'acido ipocloroso (HOCl) ad essere formato in maggiori quantità. L'HOCl è un forte agente ossidante che attacca un ampio spettro di molecole biologiche, principalmente tioli, tioesteri, ammine, fenoli e legami insaturi; inoltre, è in grado di attraversare le membrane.

1.C Meccanismi microbicidi ossigeno indipendenti

I neutrofili svolgono un ruolo cruciale nella difesa contro i microorganismi patogeni. Come già descritto, la risposta infiammatoria neutrofilo-mediata può essere vista come un processo multifasico comprendente una fase iniziale di adesione del neutrofilo circolante all'endotelio vascolare attivato, la successiva extravasazione e migrazione dei neutrofili al sito di flogosi, e, infine, l'eliminazione del patogeno attraverso la fagocitosi, la produzione di specie reattive dell'ossigeno e il rilascio di sostanze ad attività microbicida. La maggior parte degli eventi di questo processo richiede la mobilitazione di granuli e vescicole citoplasmatiche. Le varie popolazioni granulari dei neutrofili costituiscono infatti un'importante riserva non solo di proteine antimicrobiche, proteasi e componenti del burst respiratorio, ma anche di un ampio spettro di recettori di membrana per molecole di adesione endoteliale, proteine della matrice extracellulare e mediatori solubili dell'infiammazione. La mobilitazione controllata di questi organuli citoplasmatici permette la trasformazione del neutrofilo in un potente effettore dell'immunità innata. Inoltre, l'esocitosi finemente regolata dei granuli consente ai neutrofili di rilasciare in modo mirato il suo arsenale di proteine granulari potenzialmente citotossiche.

Nei neutrofili a riposo, i compartimenti granulari si trovano dispersi nel citoplasma. In seguito all'attivazione da parte di stimoli solubili o fagocitabili, i granuli fondono con la membrana plasmatica e/o con il fagosoma rilasciando il loro contenuto. Le proteine granulari costituiscono circa il 40% del volume vacuolare (Hampton MB et al., 1998), con una concentrazione proteica di circa 500 mg/mL (Reeves EP et al., 2002).

Come detto in precedenza, sono stati evidenziati almeno quattro compartimenti granulari citoplasmatici:

- granuli primari o azurofili;
- granulo secondari o specifici;
- granuli terziari ricchi in gelatinasi
- vescicole secretorie.

1.C.1 Composizione dei granuli citoplasmatici

La Tabella 1 mostra, in sintesi, la localizzazione delle principali proteine contenute nei granuli e nelle vescicole secretorie dei neutrofili.

Tabella 1. Proteine granulari dei neutrofil^{a,b} (Da Borregaard et al., 2007)

| | Granuli azurofili | Granuli specifici | Granuli terziari | Vescicole secretorie |
|----------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Proteine di membrana | CD63, CD68 Presenilina | CD11b/CD18, CD66, CD67 | CD11b/CD18, CD67 | CD11b/CD18, CD67 |
| | | Citocromo b ₅₅₈ | Citocromo b ₅₅₈ | Citocromo b ₅₅₈ |
| | | | MMP25 | MMP25 |
| | | TNFRc, uPAR | TNFRc | CD35, CD16, C1q-R LIR1-4,-6,-7,-9 ^c IFN-αE1, IFN-αR2 ^c IFN-γR1, IFN-γR2 ^c TNFR1, TNFR2 ^c ; IL-(1,4,6,10,13,17,18)R ^c TGF-βR2 ^c ; CXCR-1 ^c , -2 ^c , -4 ^c CCR-1, -2, -3 ^c Ig(G,A,E)FcR ^c TLR-1, -2, -4, -6, -8 ^c CD14 ; MyD88 ^c MD-2 ^c ; fMLFR, TREM1 ^c |
| | | SNAP-23, VAMP-2 Stomatina, PGLYRPc | SNAP-23, VAMP-2 Nramp-1 | SNAP-23, VAMP-2 Nramp1 PA, DAF, CD10, CD13 |
| Proteine di matrice | Elastasi, Catepsina G; Proteinasi 3 | MMP8, MMP9 uPA, cistatina C ^c e Fc | MMP9 Arginasi 1 | Proteine del plasma |
| | Defensine BPI, MPO Lisozima Sialidasi | hCAP18, NGAL, B12BP, lisozima, lattoferrina, pentraxina 3, prodefensina, α1-anti-tripsinac, SLPI | Lisozima | |
| | Azurocidina β-glucuronidasi | eparanasi, CRISP3 β2-microglobulina | β2-microglobulina CRISP3 | |

^aAbbreviazioni: B12BP, vitmin B12 binding protein, CRISP, cystein-rich secretory protein; PA, fosfatasi alcalina; DAF, decay-accelerating factor; LIR, immunoglobulin-like receptor; uPA, uroknase plasminogen attivatori.

^bLocalizzazione delle proteine nella membrana e nella matrice dei granuli e delle vescicole secretorie. Si riportano in giallo, le molecole di adesione; in blu, i recettori; in arancio le proteine ad attività antimicrobica, in verde le protease; in bianco, la altre classi di funzioni.

^cLa localizzazione è dedotta dal profilo di espressione genica in accordo con l'ipotesi del "targeting by timing", ma non è stata confermata a livello proteico.

- **1.C.1.A Granuli primari o azurofili:**

I granuli azurofili (GA) mostrano un'ampia eterogeneità di dimensioni e forma che rende possibile distinguerli in più sottopopolazioni in base a caratteristiche fisiche, citochimiche e morfologiche. Secondo l'ordine della loro comparsa durante la mielopoiesi, i granuli azurofili possono essere suddivisi in GA poveri in defensine, che si formano durante le fasi iniziali dello stadio promielocitico, e GA ricchi in defensine, che appaiono più tardivamente, durante il passaggio da promielocita a mielocita (Arnljots et al., 1998).

Mieloperossidasi, MPO. È espressa nei leucociti polimorfonucleati e nei monociti/macrofagi umani; a livello dei neutrofili si ritrova nei granuli primari da dove viene rilasciata nel fagosoma successivamente all'internalizzazione dei patogeni. (Cfr § 1.B.2)

α -defensine. Sono le principali costituenti dei granuli azurofili; si tratta di piccoli peptidi di circa 3.5 kDa di natura cationica, ad azione antimicrobica e citotossica. Il fatto che i granuli ricchi in defensine appaiano più precocemente di altri granuli azurofili durante la mielopoiesi trova spiegazione nella via biosintetica delle defensine stesse: mentre le proteine di matrice dei GA come la MPO, l'elastasi e la proteinasi-3 sono sintetizzate durante la fase promielocitica, la produzione di α -defensine inizia alla fine della fase promielocitica per proseguire allo stadio di mielociti. Le α -defensine mostrano attività antimicrobica nei confronti di un ampio spettro di batteri, funghi, virus incapsulati e protozoi; previa polimerizzazione, sono in grado di inserirsi a livello della membrana dei microorganismi. Il loro effetto microbicida è dovuto alla formazione di pori multimerici attraverso la membrana (Wimley et al., 1994). L'effetto citotossico di alcune defensine è potenziato dalla azione sinergica con un'altra proteina cationica, la BPI, che presenta una citotossicità specifica nei confronti dei batteri Gram-. Alcuni studi suggeriscono che l'interazione elettrostatica iniziale della BPI con i lipidi anionici batterici favorisca l'inserimento delle defensine che permeabilizzano la membrana attraverso la formazione di pori multimerici. Inoltre, a concentrazioni dell'ordine del nanomolare, le defensine sembrano avere un'azione chemiotattica per monociti, linfociti T CD4+ e CD8+.

BPI, o *bactericidal permeability increasing protein*. Si tratta di un peptide cationico di circa 50 kDa, in grado di uccidere batteri Gram negativi a concentrazioni dell'ordine del nanomolare (Weiss et al., 1987; Elsbach et al., 1998). La BPI si lega a residui lipopolisaccaridici carichi negativamente nella membrana esterna di batteri Gram negativi, attraverso la sua regione N-terminale. Tale legame induce il riarrangiamento dei lipidi della membrana esterna, portando ad

un'inibizione della crescita batterica seguita da un danno letale sulla membrana interna. Il dominio C-terminale della BPI favorisce l'attacco dei batteri ai neutrofili, mediando la fagocitosi (Ooi et al., 1987; Iovine et al., 1997).

Serprocidine. I granuli azurofili contengono tre serprocidine (o serin proteasi ad attività microbica) strutturalmente correlate: la proteinasi-3, la Catepsina G e l'elastasi. Le serprocidine sono polipeptidi cationi di 25-29 kDa dotate di attività proteolitica nei confronti di vari componenti della matrice extracellulare, come l'elastina, la fibronectina, la laminina, il collagene di tipo IV e la vitronectina. Esse inoltre inducono l'attivazione delle cellule endoteliali ed epiteliali, di macrofagi, linfociti, piastrine e possiedono proprietà antimicrobiche.

- ✓ **Catepsina G.** Si tratta di una serina-proteasi neutra presente anche a livello dei granuli intracitoplasmatici di monociti e mastocellule (Salvesen et al., 1987). Vari effetti fisiologici sono stati attribuiti a questa proteasi: attività antimicrobica, degradazione della matrice extracellulare, vasoregolazione, attivazione dell'elastasi neutrofila, cleavage di fattori della coagulazione e del recettore della trombina, ecc. La catepsina G purificata esercita un'azione citotossica batteriostatica nei confronti di svariati microorganismi (Shafer e Onunka 1989; Shafer et al., 1991; Guyonnet et al., 1991).
- ✓ **Elastasi.** Non è dotata di per sé di attività microbica, tuttavia, studi effettuati in passato sull'attività dell'elastasi umana nei confronti di *S. aureus* ed *E. coli*, in presenza o in assenza del sistema MPO-H₂O₂-cloruro hanno dimostrato che pur priva di attività microbica diretta, l'elastasi era in grado di potenziare di 10-100 volte l'impatto del killing MPO dipendente. Questo effetto sinergico non era compromesso dall'inattivazione termica dell'attività enzimatica, suggerendo che l'azione elastolitica non sia un prerequisito per questa sinergia. Questa indipendenza dell'attività antimicrobica dall'attività enzimatica è stata osservata anche nel caso della catepsina G; la natura cationica comune di queste proteine granulari suggerisce che la loro forte interazione elettrostatica con la superficie microbica perturbi l'integrità del microorganismo che risulta di conseguenza più accessibile e vulnerabile (Odeber e Olsson, 1975 e 1976).

Il **lisozima** (Faurischou et al., 2003) è un peptide antimicrobico di circa 14 kDa, presente, in accordo con il suo profilo biosintetico, in tutti i compartimenti granulari, con un picco di concentrazione a livello dei granuli specifici. Questo enzima ha come substrati i peptidoglicani

della parete dei batteri Gram+ e la chitina dei funghi; la sua azione porta quindi ad alterazioni irreversibili della parete microbica (Elsbach et al., 1999).

- **1.C.1.B Granuli secondari o *specifici***

Citocromo b₅₅₈: è stato ritrovato principalmente (85%) nella membrana dei granuli specifici e dei granuli terziari; in seguito all'attivazione cellulare viene traslocato in superficie o alla membrana del fagosoma, dove costituisce il centro redox del complesso NADPH ossidasi (cfr § 1.B.1.1).

La **NGAL** (*Neutrophil gelatinase-associated lipocaline*) é una proteina appartenente alla famiglia delle lipocaline, definita anche siderocalina, per la sua capacità di legare i siderofori (i più potenti chelanti del ferro conosciuti), prevenendo in questo modo l'acquisizione sideroformata di ferro da parte dei microorganismi. Si trova principalmente concentrata nei granuli specifici, ma la sua biosintesi aumenta considerevolmente a livello dell'epitelio infiammato del colon (malattia di Crohn, coliti ulcerative, appendicite e diverticoliti). La produzione di NGAL nei neutrofili circolanti può essere stimolata da GM-CSF. Secondo Borregaard e colleghi, la NGAL parteciperebbe alla regolazione della risposta infiammatoria attraverso il legame a mediatori infiammatori di natura lipofila, quali fMLF, PAF (*platelet activating factor*), leucotriene B₄ e LPS (Borregaard e Cowland 1997). Infatti, due studi per marcatura di fotoaffinità (*photo affinity labeling*) riguardanti la localizzazione subcellulare del recettore per l'fMLF, hanno identificato la NGAL come una proteina di 25 kDa presente nei granuli specifici e in grado di legare l'fMLF. Il ruolo della NGAL nella difesa dell'organismo é stato dimostrato anche grazie a studi effettuati su topi in cui il gene per la NGAL era stato silenziato: in seguito ad iniezione intraperitoneale di enterocolina derivante da *Escherichia coli*, i topi NGAL-*knockout* morivano rapidamente (Flo et al., 2004).

La **lattoferrina (LF)** é una glicoproteina di 78 kDa immagazzinata principalmente nei granuli specifici. Possiede un'attività antimicrobica nei confronti di un ampio spettro di batteri Gram positivi e negativi. La LF appartiene alla famiglia delle transferrine, proteine che sono in grado di sequestrare il ferro e di impedire così la crescita batterica. Oltre a questa funzione, la lattoferrina si lega alla membrana cellulare batterica attraverso il suo dominio anfipatico N-terminale, provocando un danno di membrana irreversibile e la conseguente lisi della cellula. La regione antibatterica della LF, detta lattoferricina, viene rilasciata in seguito a digestione da

parte della pepsina gastrica. La LF é presente in vari fluidi biologici, tra cui il latte materno (Oram et al., 1968; Chapple et al., 1998; Yamauchi et al., 1993).

hCAP-18 é un peptide antimicrobico di 19 kDa presente nei granuli specifici, appartenente al gruppo delle catelicidine. La regione N-terminale di 14 kDa mostra un alto grado di omologia con altre catelicidine, mentre la regione C-terminale forma un' α elica anfipatica che esercita un'attività antimicrobica contro batteri Gram+ e Gram- e induce la chemiotassi di neutrofilii, linfociti T e monociti. Questa regione C-terminale é liberata tramite clivaggio della proteinasi-3 in seguito all'esocitosi dei granuli. HCAP-18 é prodotta anche dai cheratinociti durante le malattie infiammatorie della pelle quali la psoriasi, il lupus eritematoso e la dermatite atopica (Sorensen et al., 2001; Yang et al., 2000).

La **fosfolipasi A2 (PLA2)** appartiene alla famiglia delle fosfolipasi secretorie; esercita una potente attività antibatterica nei confronti dei batteri Gram+, grazie alla formazione di un legame stabile con la parete batterica, tramite un meccanismo Ca-indipendente; una volta penetrata nel microorganismo, la PLA2 è in grado di degradare i fosfolipidi di membrana con un meccanismo Ca-dipendente. La sua attività antibatterica è legata a quella di altre proteine microbicide che alterano la permeabilità della membrana esterna, quali la BPI.

Le **catelicidine** sembrano agire in sinergia con le defensine, determinando un incremento della permeabilizzazione della membrana esterna ed interna dei microorganismi, con conseguente interruzione della sintesi dell'RNA e del DNA e blocco della respirazione cellulare (Elsbach et al., 1999; Nagaoka et al., 2000). L'attività battericida delle catelicidine, diretta in particolare nei confronti dei batteri Gram-, richiede un clivaggio proteolitico: questo avverrebbe probabilmente durante la degranolazione nel vacuolo di fagocitosi, dove le catelicidine sono esposte all'azione delle proteasi rilasciate dai granuli azurofili, e in particolare, all'azione dell'elastasi. Il frammento liberato per clivaggio svolge la sua attività antibatterica attraverso il legame della regione cationica C-terminale a fosfolipidi di membrana, e grazie all'inserimento nella membrana plasmatica di una regione altamente idrofobica.

Collagenasi (MMP8). Le metalloproteasi di matrice (MMP) rappresentano una famiglia di endopeptidasi zinco- e calcio-dipendenti la cui funzione é la degradazione della matrice extracellulare. Esse rivestono un ruolo importante in numerosi processi fisiologici quali lo sviluppo embrionale, la morfogenesi, la riproduzione e il rimodellamento tissutale.

Intervengono anche in processi patologici quali l'artrite, il cancro e le malattie cardiovascolari. Sono sintetizzate sottoforma di pre-pro-peptide e richiedono l'attivazione proteolitica, che può essere intra- od extra-cellulare. Il clivaggio proteolitico determina il rilascio del pro-peptide N-terminale ed espone il sito attivo dell'enzima. Il controllo dei livelli di MMPs neosintetizzate si verifica essenzialmente a livello della trascrizione genica, mentre l'attività proteolitica delle MMP esistenti è regolata attraverso l'attivazione del pro-enzima (o zimogeno) e l'inibizione dell'enzima nel suo stato attivo da parte di inibitori endogeni, quali la α_2 -microglobulina e gli inibitori tissutali delle MMP (TIMP). La MMP8 è immagazzinata nei granuli specifici come proenzima latente; citochine proinfiammatorie quali l'IL-1, IL-8 e il TNF α , o il GM-CSF stimolano il rilascio della collagenasi che, attraverso la degradazione della matrice extracellulare, permette ai neutrofilo di infiltrare il tessuto connettivo. Strutturalmente, la collagenasi comprende un pro-dominio N-terminale ricco in residui di cisteina, che mantiene le MMP8 nel suo stato latente. L'attivazione del proenzima si verifica, in seguito alla degranulazione, nello spazio extracellulare, attraverso la rimozione del pro-dominio. L'enzima attivo che ne risulta comprende un dominio catalitico e un motivo che lega lo zinco. La MMP8 attiva è in grado di clivare il collagene di tipo I, II e III. L'attivazione della MMP8 può essere realizzata in vitro ad opera di proteasi quali la MMP8 stessa, la MMP3, MMP10 e la Cathepsina G, o di agenti chimici quali composti del mercurio e radicali dell'ossigeno (Tschesche et al., 1998).

- **1.C.1.C Granuli terziari o ricchi in gelatinasi**

La **Gelatinasi (MMP9)** è caratterizzata dalla presenza di tre moduli di fibronectina di tipo II che permettono lo svolgimento e la completa degradazione della tripla elica del collagene, un dominio C-terminale hemopexin-like di circa 200 aminoacidi, legato al dominio catalitico e responsabile della specificità di substrato e del legame agli inibitori tissutali TIMP e un dominio, omologo al collagene di tipo IV, ricco in residui di cisteina. La gelatinasi viene secreta come pro-peptide (zimogeno) dal peso molecolare di 92 kDa; il clivaggio proteolitico della pro-MMP9 in corrispondenza del residuo 87 (o residui vicini) porta alla liberazione dell'enzima nella sua forma attiva, con un peso di circa 82 kDa. La pro-MMP9 può essere attivata dalla MMP3 o da certe proteasi batteriche; la MMP9 è inibita dalla α_2 microglobulina o dal TIMP-1 che lega la pro-MMP9 o la MMP9 attiva. Nel plasma circola come monomero o complessata con la lipocalina neutrofilica e può formare dimeri e/o multidimeri.

Nramp1 (*natural associated macrophage protein 1*) è stata identificata per la prima volta nei macrofagi come una proteina integrale di membrana di circa 100 kDa. Nei neutrofili a riposo, Nramp1 è situata principalmente nei granuli ricchi in gelatinasi; in seguito all'esocitosi, questa proteina trasloca sulla membrana fagosomale. Nramp1 agisce come trasportatore di cationi bivalenti ed è quindi in grado di sequestrare ioni quali Fe^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} ai microorganismi presenti nel vacuolo di fagocitosi.

- **1.C.1.D Vescicole secretorie**

Le vescicole secretorie rappresentano una riserva di recettori di membrana necessari alla fase precoce della risposta infiammatoria neutrofilo mediata. Nella loro membrana si ritrovano infatti: citocromo b_{558} , integrine $\beta 2$ (CD11b/CD18, o Mac-1 o CR3), recettori del complemento (CR1), recettori per peptidi formilati, recettore per LPS/acido lipoteico (CD14), recettore per $\text{Fc}\gamma\text{III}$ e la metalloproteasi leucolisina. La presenza di proteine del plasma al loro interno suggerisce che questi compartimenti intracellulari si originino per endocitosi (Borregaard et al., 1987).

1.C.2 Granulogenesi (per review cfr Faurschou et Borregaard, 2003)

I granuli dei neutrofili sono formati durante la differenziazione della cellula mieloide (Figura 4). La granulogenesi inizia precocemente nella fase di passaggio del precursore neutrofilico immaturo allo stadio di promielocito, dove vescicole di trasporto ancora immature fuoriescono dal complesso di Golgi e fondono tra loro (Baiton et al., 1966 e 1971; Hartmann et al., 1995). I primi granuli ad apparire erano stati originariamente definiti “granuli perossidasi positivi” in base al loro elevato contenuto in mieloperossidasi (MPO) o “granuli azurofili” per la loro affinità al colorante basico *azure A*, o semplicemente, “granuli primari”. La produzione di MPO si arresta al passaggio da promielocito a mielocito. Conseguentemente, i granuli formati nelle fasi successive della mielopoiesi sono denominati perossidasi-negativi: si tratta dei granuli secondari o specifici e terziari o ricchi in gelatinasi, secondo la loro tempistica di apparizione e il loro contenuto. I granuli specifici sono formati nello stadio di mielocito e metamielocito, mentre i granuli terziari originano nelle cellule segmentate; queste sono poi rilasciate nel circolo sanguigno dove il loro sviluppo a neutrofili maturi terminalmente differenziati è completato dalla formazione delle vescicole secretorie.

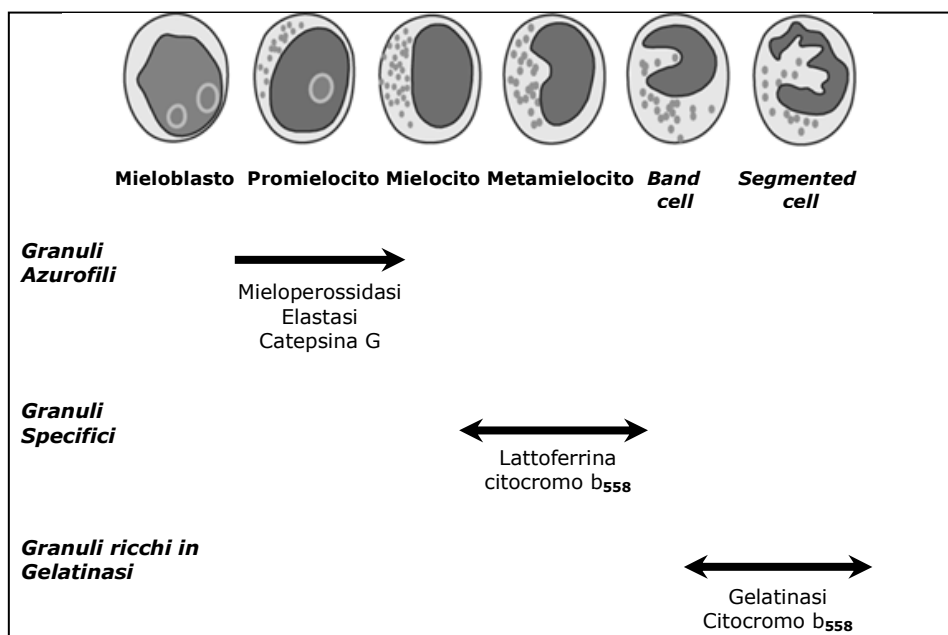


Figura 4: Formazione dei granuli e delle vescicole secretorie durante la differenziazione della cellula mieloide.

Le differenti popolazioni granulari mostrano caratteristiche strutturali comuni quali una doppia membrana fosfolipidica e una matrice intragranulare contenente proteine destinate all'esocitosi o al rilascio nel fagosoma. Tuttavia, esistono differenze sostanziali concernenti il contenuto proteico. Diversi studi hanno dimostrato che le proteine sintetizzate ad un preciso stadio dello sviluppo mieloide risultano localizzate nella stessa popolazione granulare (Borregaard et al., 1995; Arnljots et al., 1998). Questi dati supportano l'ipotesi detta **"targeting by timing"**, in base alla quale la presenza selettiva di una proteina in una data popolazione di granuli è dovuta al momento in cui è stata biosintetizzata. La straordinaria eterogeneità del contenuto dei granuli è quindi resa possibile da un'azione finemente regolata e altamente specializzata dei fattori di trascrizione presenti durante i diversi stadi dello sviluppo della cellula mieloide.

Questa fine regolazione della sintesi e dell'accumulo delle proteine granulari fa sì che molecole con funzioni effettrici simili siano immagazzinate negli stessi granuli; quindi la mobilitazione di un preciso sottotipo di granuli rende possibile il rilascio simultaneo di molecole essenziali per una precisa funzione. Ad esempio, le vescicole secretorie contengono recettori di superficie e molecole di adesione che rendono il neutrofilo in grado di rispondere ai segnali e iniziare la migrazione attraverso l'aderenza ai tessuti. I granuli terziari sono coinvolti nella degradazione della matrice extracellulare e consentono quindi una chemiotassi efficace. I granuli specifici e azurofili contengono un ampio spettro di proteine antimicrobiche ed enzimi essenziali per l'uccisione e la degradazione dei microorganismi fagocitati.

1.C.3 Trasporto e fusione membrana/granuli

L'inizio dell'attività NADPH ossidasi coincide con la degranolazione, con un ritardo di circa 20 secondi (Segal et al., 1981). Le vie di trasmissione del segnale che connettono il legame a recettori di superficie all'innescamento e al controllo della degranolazione sono complesse e non ancora definite con precisione.

L'esocitosi di granuli e vescicole secretorie si verifica grazie ad una serie di processi finemente controllati, comprendenti: la mobilitazione o traslocazione dei compartimenti granulari alla periferia della cellula, l'associazione dei granuli alla membrana plasmatica e l'aggancio tra granuli e membrana, prerequisito necessario per le successive fusione e liberazione dei mediatori. È interessante notare che i granuli sono rilasciati secondo un ordine inverso rispetto alla tempistica della loro sintesi: le vescicole secretorie sono i primi compartimenti ad essere mobilitati, seguiti, nell'ordine, dai granuli ricchi in gelatinasi, poi dai granuli specifici e infine, dai granuli azurofilici (Faurischou et al., 2003). La stimolazione *in vitro* con concentrazioni dell'ordine del nanomolare di mediatori infiammatori quali l'fMLF causa la rapida e quasi totale degranolazione delle vescicole secretorie, lasciando praticamente intatti gli altri granuli (Sengelov et al., 1993). La stimolazione con agonisti più potenti quali il forbol miristato acetato (PMA) provoca il rilascio completo dei granuli terziari, moderato dei granuli specifici e un'esocitosi scarsa da parte dei granuli azurofilici.

La mobilitazione gerarchica dei granuli dei neutrofilici sopradescritta può essere riprodotta *in vitro* attraverso un incremento graduale delle concentrazioni intracellulari di calcio Ca^{2+} (Sengelov et al. 1993). La concentrazione citosolica di Ca^{2+} che induce la liberazione del 50% dei markers granulari (EC_{50}) corrisponde a: 140 nM per le vescicole secretorie, 250 nM per i granuli terziari, 550 nM per i granuli specifici e 680 nM per i granuli azurofilici (la $[Ca^{2+}]_i$ nei PMN a riposo è di 90-110 nM). Vari tipi di stimoli sono responsabili dell'aumento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} , tra cui la formazione di legami coinvolgenti L-selettine, CD11b/CD18 e recettori per l'fMLF. Il legame delle integrine β_2 determina l'attivazione delle tirosin-chinasi citoplasmatiche, che fosforilano e attivano un ampio spettro di proteine, tra cui la fosfolipasi $C\gamma_2$ e la fosfolipasi D; queste ultime catalizzano la generazione di inositolo (1,4,5)-trifosfato (IP3), di diacilglicerolo e di acido fosfatidico. A loro volta, questi metaboliti attivano la protein chinasi C (PKC) provocando quindi il rilascio di Ca^{2+} dagli *stores* intracellulari e l'influsso di calcio attraverso la membrana plasmatica (Faurischou et al., 2003). Allo stesso modo, la stimolazione attraverso la via del recettore per l'fMLF accoppiato alla proteina G,

provoca un rapido aumento della concentrazione di IP₃ a livelli sufficienti a mobilitare il Ca²⁺ dagli stores intracellulari.

Il meccanismo che lega il turnover lipidico e le modificazioni delle concentrazioni di Ca²⁺ alla degranulazione non é ancora noto con esattezza. Le **annessine** sono proteine in grado di legare fosfolipidi di membrana che, in presenza di elevate concentrazioni di calcio, intervengono nell'aggregazione delle vescicole e nella fusione alla membrana. Queste molecole hanno la capacità, polimerizzando, di formare un ponte e di mettere quindi in contatto due membrane di strutture secretorie. Vari tipi di annessine sono state identificate nei neutrofili che sembrano promuovere la fusione calcio-dipendente, in vitro; tra queste, l'annessina I, l'annessina XI e la lipocortina III.

Uno dei meccanismi di regolazione della mobilitazione dei granuli citoplasmatici è rappresentato dalla famiglia dei recettori **SNARE** (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) comprendente due classi di proteine: le SNARE vescicolari (v-SNARE), di cui fanno parte i membri della famiglia VAMP (vesicle-associated membrane protein-2), e le SNARE target (t-SNARE) comprendenti le sintassine e i membri della famiglia SNAP-23/25. In particolare, nei neutrofili sono state identificate tra le v-SNARE, le VAMP-1, VAMP-2 e VAMP-7, e tra le t-SNARE, la SNAP23 ed un certo numero di sintassine, quali la sintassina 3, 4 e 6. La regolazione della secrezione dei differenti compartimenti citoplasmatici varia a seconda del tipo di granuli e coinvolge svariate associazioni di complessi SNARE: l'esocitosi dei granuli secondari e terziari impegna almeno 2 complessi SNARE composti da sintassina 4/SNAP-23/VAMP-1 o sintassina 4/SNAP-23/VAMP-2, mentre nella degranulazione dei granuli primari intervengono sintassina 4 e VAMP-1/7. Un ulteriore complesso contenente la sintassina 6 può intervenire nella regolazione dell'esocitosi dei granuli primari e secondari. Di conseguenza, la densità delle proteine SNARE nella membrana é connessa al potenziale di esocitosi dei differenti compartimenti granulari. L'importanza dei complessi SNARE nei processi di degranulazione é stata dimostrata da una serie di studi che hanno esaminato l'effetto inibitorio di neurotossine quali la neurotossina del tetano e del botulino: queste neurotossine colpiscono e scindono specificamente i complessi SNARE liberi, prevenendo quindi il loro assemblaggio nella fase di aggancio dei granuli alla membrana e impedendo, di conseguenza, la fusione dei granuli con la membrana (Schiavo et al., 2000; Turton et al., 2002).

Accanto alle proteine SNARE, l'efficacia del controllo del processo di fusione delle membrane richiede l'intervento di proteine della famiglia delle **Munc-18**; in particolare, le isoforme Munc 18-1, Munc 18-2 e Munc 18-3 sembrano essere coinvolte nella regolazione dell'esocitosi in svariati tessuti e tipi cellulari (Rizo et al., 2002). E' stata recentemente mostrata l'esistenza nei

neutrofili umani delle isoforme Munc 18-2 e Munc 18-3 e la loro diversa implicazione nella regolazione della degranolazione: Munc 18-2 sarebbe implicata nell'esocitosi dei granuli primari e interagirebbe con la sintassina 3, mentre Munc 18-3 sarebbe coinvolta più specificamente nel rilascio dei granuli secondari e terziari e interagirebbe con la sintassina 4 (Brochetta et al., 2008).

Un altro gruppo di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale per l'avvio dei processi di esocitosi sembra essere la famiglia di proteine leganti il calcio EF-hand; appartengono a questa famiglia proteine ubiquitarie come la calmodulina e proteine con una distribuzione tessuto-specifica, quali la recoverina e NCS-1 (neuronal calcium sensor-1). NCS-1 è espressa essenzialmente nel tessuto nervoso dove modula il rilascio di neurotrasmettitori, agendo sulle strutture citoscheletriche. Nonostante il nome, NCS-1 è presente, oltre che a livello neuronale, anche nelle cellule cromaffini, nelle cellule epiteliali renali: a livello di questi tessuti, NCS-1 regolerebbe le funzioni secretorie e diversi aspetti del traffico vescicolare attraverso interazioni con altri componenti del processo di segnalazione transmembrana (Brochetta et al., 2003). Sembra inoltre che NCS-1 faccia parte del sistema SNARE e parteciperebbe quindi alla formazione dei complessi proteici che promuovono la fusione tra la membrana degli organuli secretori e la membrana target. NCS-1 è stata ritrovata anche nei neutrofili umani e nelle cellule della linea promielocitica HL-60, localizzata in particolare a livello dei granuli azurofili. (Brochetta et al., 2003).

È stato inoltre recentemente dimostrato il coinvolgimento di un membro della famiglia delle proteine **Munc-13** nella regolazione dell'esocitosi (Pivot-Pajot et al. 2008). Le proteine Munc 13 rappresentano una famiglia di 4 proteine mammifere omologhe alla proteina Unc-13 di *Caenorhabditis elegans*. Si tratta di proteine presenti a livello di svariate cellule secretorie (tra cui le cellule neuronali, cromaffini, le cellule β pancreatiche e diverse cellule della linea ematopoietica), dove rivestono un ruolo chiave nella regolazione della via secretoria. Le proteine Munc-13 intervengono infatti nella formazione dei complessi SNARE e sembrano inoltre essere implicate nel *priming* dei granuli. In particolare, Munc-13-4, l'omologo di recente identificazione, risulta fortemente espresso nei neutrofili, con una localizzazione in parte citoplasmatica e in parte associata ai granuli specifici e terziari. Sembrerebbe che la redistribuzione (calcio-dipendente) di Munc 13-4 alla membrana plasmatica in seguito alla stimolazione cellulare agisca come fattore "priming" per l'esocitosi (Pivot-Pajot et al., 2008).

È stato recentemente proposto il coinvolgimento, nella regolazione della degranolazione, dell'efflusso di ioni cloruro (Cl^-), che si verifica nei neutrofili durante la fagocitosi dei neutrofili (Busetto et al., 2007). Nei neutrofili a riposo (*resting*) infatti, la $[\text{Cl}^-]_i$ è elevata: 80-100 mM

(Simchowitz et al., 1986); in risposta a stimoli solubili fisiologici e non, si assiste ad una rapida ed irreversibile diminuzione dei livelli di Cl^- intracellulare, strettamente correlata a svariate funzioni dei neutrofili, quali l'attivazione e l'iperespressione di molecole di adesione, l'adesione cellulare e lo spreading, l'alcalinizzazione citoplasmatica e l'attivazione del burst respiratorio (Meyers et al., 1990; Menegazzi et al., 1996, 1999 e 2000; Perez-Cornejo et al., 2004). Utilizzando diversi tipi di inibitori noti del trasporto di ioni cloruro (quali l'acido etacrinico e l'acido niflumico), Busetto e colleghi hanno mostrato che l'inibizione dell'efflusso di Cl^- è accompagnato dalla diminuzione:

- dell'uccisione di particelle opsonizzate di *Candida albicans*;
- della degranolazione degli stessi granuli azurofilari (in particolare della MPO);
- della fusione dei granuli azurofilari con la membrana fagosomale.

Gli stessi autori hanno anche mostrato come l'inibizione dell'efflusso di Cl^- causasse una marcata diminuzione del rilascio di Ca^{2+} dagli stores intracellulari, in neutrofili stimolati con fMLF o blastospore opsonizzate di *Candida albicans*. Le vie di trasmissione del segnale coinvolte in questi fenomeni restano ancora da identificare, ma sembra evidente come le variazioni dei livelli di cloro intracellulare rivestano un ruolo importante nella modulazione di numerose funzioni dei neutrofili.

1.C.4 Significato della degranolazione nella risposta infiammatoria acuta neutrofilo-mediata

Il reclutamento dei neutrofili nel tessuto infiammato si verifica nell'arco di poche ore e costituisce un evento fondamentale nella risposta acuta dell'ospite ai patogeni. La mobilitazione dei neutrofili coinvolge una serie di processi di esocitosi finemente regolati che, nel complesso, modificano in modo graduale lo stato funzionale della cellula. In seguito alla stimolazione da parte di mediatori infiammatori, le cellule endoteliali vascolari adiacenti al sito di infezione traslocano la P-selettina dai compartimenti intracellulari (i corpi di Weibel-Palade) al lume della membrana; la P-selettina si associa ad una specifica glicoproteina di superficie dei neutrofili (la PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand 1) stabilendo un'interazione ad alta affinità che facilita il rolling dei neutrofili lungo la superficie endoteliale. Questa interazione neutrofilo-endotelio determina inoltre il rilascio delle vescicole secretorie (Borregaard et al., 1994), che, a sua volta, permette l'espressione dell'integrina β_2 CD11b/CD18 sulla superficie dei neutrofili, evento accompagnato dal rilascio della L-selettina. Il legame delle integrine β_2 alle molecole di

adesione intercellulare (ICAM-1) permette un'adesione stabile del neutrofilo all'endotelio e ne promuove la tras migrazione. L'esocitosi dei granuli terziari libera le metalloproteasi (gelatinasi e leucolisina) ad attività collagene-litica, che svolgono probabilmente un ruolo fondamentale nella degradazione della membrana vascolare basale nella fase di extravasazione. Durante la successiva migrazione dei neutrofilo attraverso i tessuti interstiziali si verifica la parziale esocitosi dei granuli specifici e azurofilo, permettendo la liberazione di recettori per i componenti della matrice extracellulare e di enzimi in grado di degradare la matrice stessa, quali la collagenasi e le serina-proteasi, facilitando in questo modo la migrazione verso il sito di flogosi. In seguito all'incontro con il patogeno, i neutrofilo attivano i sistemi antimicrobici ossigeno-dipendenti e indipendenti grazie all'esocitosi dei granuli azurofilo e specifici verso il fagosoma o all'esterno della cellula. L'eterogeneità di funzioni delle sostanze granulari permette ai neutrofilo di attaccare i patogeni in modi diversi: alcuni costituenti granulari, quali le defensine, la BPI, la h-CAP-18, la lattoferrina e il lisozima esercitano il loro potere microbica grazie alla distruzione della membrana plasmatica; altre, quali la NGAL, la lattoferrina, o Nramp1 interferiscono con il metabolismo ferro-dipendente dei batteri; altri ancora, quali la MPO, o il citocromo b₅₅₈ partecipano alla generazione di specie reattive dell'ossigeno. E' interessante notare inoltre che costituenti granulari come le defensine, l'azurocidina e l'hCAP-18 favoriscono la chemiotassi di linfociti T CD4+ e CD8+, amplificando di conseguenza la risposta infiammatoria e agendo da "ponte" tra l'immunità innata e l'immunità adattativa.

1.C.5 Meccanismi di degranulazione

Le cellule infiammatorie secernono proteine contenute nei compartimenti intracitoplasmatici in un processo noto come *esocitosi* o *degranulazione*. Esocitosi é un termine che descrive precisamente il processo di fusione della membrana granulare o vescicolare con la membrana plasmatica, accompagnato dal rilascio del contenuto granulare nello spazio extracellulare.

Il rilascio di mediatori preformati da parte delle cellule infiammatorie può verificarsi secondo quattro distinti meccanismi (Logan et al., 2003):

- *L'esocitosi classica* implica l'estrusione di singoli granuli secretori, attraverso la fusione di ciascuno di essi alla membrana plasmatica, in seguito a stimolazione. Si tratta del meccanismo di degranulazione preferenziale per neutrofilo, eosinofilo, mastcellule, piastrine e macrofagi;

- L'*esocitosi composta* (compound exocytosis) é caratterizzata dalla fusione intracellulare inter-granulare, prima della successiva fusione con la membrana plasmatica, attraverso creazione di un unico poro di fusione. Questo tipo di esocitosi é stata evidenziata in neutrofili, mastcellule, piastrine ed eosinofili in risposta ad un'infezione elmintica (Lollike et al., 2002; Hide et al., 1993; Morgenstern et al., 1995; Sceppek et al., 1994).
- La *degranolazione cumulativa* (piecemeal degranulation, PMD) sembra essere il meccanismo di degranolazione predominante per gli eosinofili localizzati al sito di infiammazione allergica. In questo tipo di esocitosi, un granulo fonde con la membrana citoplasmatica, e in seguito, un secondo granulo fonde con la membrana del primo, formando un "sacco" di degranolazione. Questo tipo di degranolazione é stata descritta anche per le mastcellule (Crivellato et al., 2002).
- La *citolisi* (o necrosi o estrusione granulare totale) é associata al rilascio di granuli intatti nel tessuto, in concomitanza alla morte cellulare. Si tratta di un meccanismo di esocitosi importante per gli eosinofili tissutali, ma secondario alla PMD.

1.D NETs (*Neutrophil extracellular traps*)

Recentemente, è stata mostrata l'esistenza di un nuovo meccanismo antimicrobico dei neutrofili: le NETs, o neutrophil extracellular traps (Brinkmann et al., 2004), che sarebbero all'origine del killing extracellulare. I neutrofili attivati rilasciano infatti fibre extracellulari composte da cromatina e proteine granulari, che si sono dimostrate in grado di uccidere batteri e funghi (Figura 5). La formazione di queste strutture fibrose è un processo attivo che può essere provocato da diversi stimoli (PMA, IL-8, LPS, batteri) e che sembra modificare la morfologia dei neutrofili: si assiste infatti ad un cambiamento della forma cellulare, seguito da condensazione dell'etero- ed eu-cromatina, disintegrazione della membrana nucleare e granulare con omogeneizzazione del loro contenuto. La successiva rottura della membrana plasmatica permette il rilascio delle NETs. Gli autori distinguono il meccanismo che porta alla formazione delle NETs dai processi di morte cellulare per necrosi e apoptosi: le specie reattive dell'ossigeno prodotte dall'attivazione del complesso NADPH ossidasi sarebbero infatti coinvolte nella produzione delle NETs, come dimostrato dall'incapacità dei neutrofili di pazienti CGD di generarle (Fuchs et al., 2007).

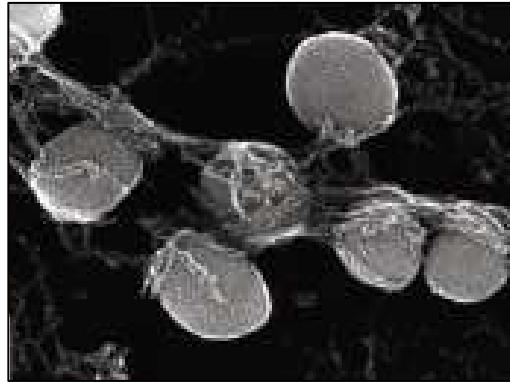


Figura 5: Killing extracellulare di *S. aureus* intrappolato da fibre neutrofiliche. (Immagine di microscopia a scansione elettronica; da Brinkmann et al., 2004).

1.E Ruolo della compensazione di carica nell'attività microbica dei neutrofilici

Il trasferimento di elettroni *via* Nox2 (cfr § 1.B.1.2) provoca un flusso netto di cariche negative attraverso la membrana; questa corrente elettrica, misurabile tramite la tecnica del patch-clamp, porta ad una variazione del potenziale di membrana, che passa da -60mV nei neutrofilici a riposo a 0 mV o +60 mV in seguito, rispettivamente, ad attivazione da parte di PMA o fMLF (Jankowski e Grinstein, 1999). Tale corrente elettronica dipende dalla differenza di potenziale transmembrana e si interrompe quando il potenziale di membrana raggiunge valori pari a +160 ÷ +200 mV. Tenendo conto della velocità di produzione di $O_2^{\cdot-}$ e della capacità elettrica della membrana, è stato calcolato che l'attività enzimatica di Nox2 nei neutrofilici dovrebbe arrestarsi nell'arco di 250 millisecondi (DeCoursey et al., 2003). La durata del burst respiratorio indotto da stimoli solubili o particolati è ovviamente ben più lunga; di conseguenza, l'adeguata compensazione di carica è il fattore critico per preservare la produzione di anioni superossido. Teoricamente, la compensazione del flusso di elettroni può derivare da un movimento di cationi nella stessa direzione (H^+ , K^+), da un movimento di anioni in direzione opposta (Cl^-), o ancora, dalla combinazione di questi due processi (Fig. 6) (Rada et al., 2008).

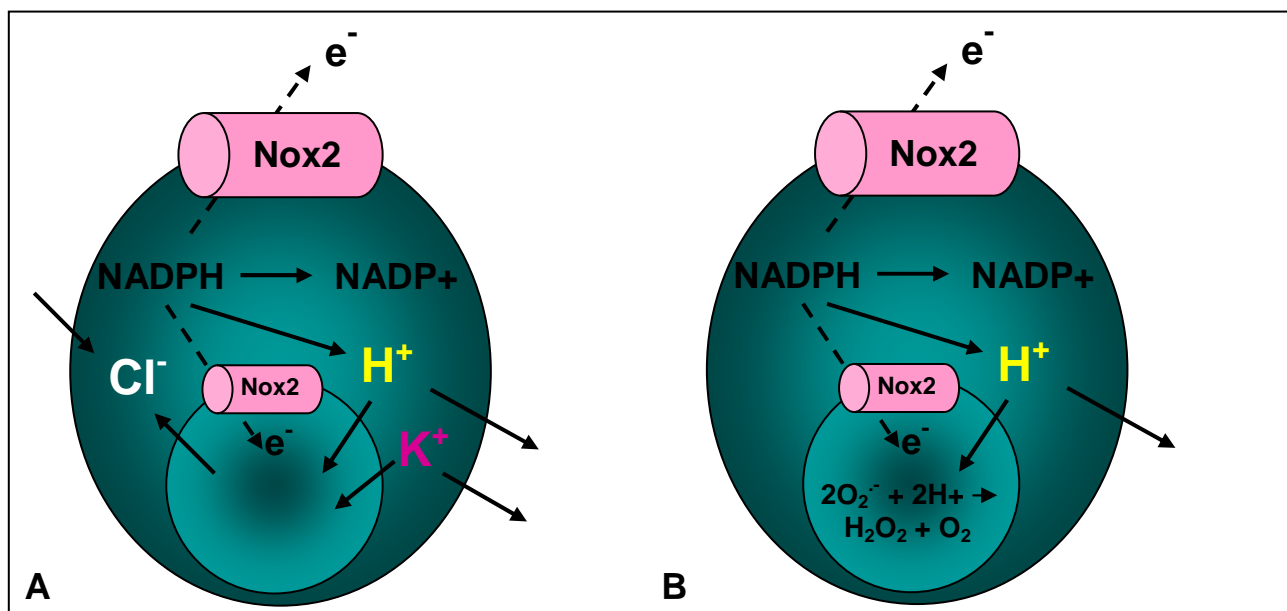


Figura 6: Compensazione della carica elettrica nel funzionamento del complesso ossidasi.
A. Possibili meccanismi di compensazione (H^+ , K^+ , Cl^-) per il trasferimento di elettroni attraverso Nox2. **B.** Ruolo del movimento di protoni (H^+).

1.E.1 Compensazione di carica via ioni H^+

L'efflusso di protoni (H^+) per via elettrogenica come meccanismo di compensazione di carica per la produzione di superossido è stato proposto per la prima volta più di 20 anni fa (Henderson et al., 1987). Un flusso di ioni H^+ parallelo agli elettroni permetterebbe di prevenire, da un lato, la forte acidificazione del citoplasma dovuto alla liberazione di protoni dall'NADPH e, dall'altro, l'eccessiva alcalinizzazione dell'ambiente fagosomale dovuta alla dismutazione del superossido.

Il trasporto elettrogenico di protoni è stato messo in evidenza e misurato nei neutrofili tramite metodi chimici (valutazione delle modificazioni del pH tramite sonde fluorescenti) ed elettrofisiologici (patch-clamp) (DeCoursey, 2004). Sembra che, in condizioni resting la conduttanza ai protoni sia estremamente ridotta, mentre in condizioni di attivazione, essa risulti predominante rispetto a quella per gli altri ioni.

1.E.2 Compensazione di carica via ioni K^+ :

Più recentemente, gli ioni potassio (K^+) sono stati proposti come ioni coinvolti nella parziale compensazione del movimento di cariche negative attraverso Nox2 (Ahluwalia et al., 2004). In questa stessa pubblicazione, l'efflusso di ioni potassio dal citoplasma dei neutrofili è ritenuto l'elemento chiave nei processi di uccisione dei microorganismi internalizzati: l'ingresso di ioni K^+ nel vacuolo di fagocitosi creerebbe condizioni di ipertonìa tali da permettere la

slatentizzazione delle proteasi antibatteriche (elastasi, catepsina G) strettamente legate alla matrice acida costituita da proteoglicani solfati; questi sistemi non ossidativi sarebbero cioè i responsabili dell'uccisione dei microorganismi fagocitati. Secondo Rada e colleghi invece, i movimenti di ioni K^+ si svolgerebbero durante le prime fasi del burst respiratorio, in cui l'attività ossidasica è ridotta, per diminuire mano a mano che la depolarizzazione diviene più importante e che l'attivazione dei canali protonici aumenta (Rada et al. 2004). Questi dati sono in accordo con l'osservazione precedentemente riportata secondo cui la conduttanza agli ioni H^+ è predominante quando l'ossidasi funziona a pieno regime.

1.E.3 Compensazione di carica via ioni Cl^-

Il cloruro (Cl^-) rappresenta il principale anione mobile dell'ambiente intra ed extracellulare. Nel 2005, Segal e collaboratori hanno proposto che il 90% della compensazione di carica per l'attività ossidasica si verifichi grazie ad un flusso di cloruro dal fagosoma o dallo spazio extracellulare verso il citosol (vedi Fig. 6), attraverso dei canali sensibili alla stricnina e attivati dalla glicina; gli autori sostengono inoltre che in assenza di ioni Cl^- il burst respiratorio e il killing dei microorganismi sono aboliti (Segal, 2005).

1.F La malattia granulomatosa cronica (CGD)

La malattia granulomatosa cronica (o CGD, chronic granulomatose disease) è un raro deficit primario dell'immunità innata, di origine genetica, dovuto ad un difetto del metabolismo ossidativo dei polimorfonucleati neutrofilici, monociti, macrofagi ed eosinofili (fagociti o granulociti) (Segal BH et al., 2000). Queste cellule fagocitiche sono incapaci di produrre le specie reattive dell'ossigeno (ROS), a causa di svariate anomalie del complesso enzimatico NADPH ossidasi. Tale patologia è caratterizzata da ripetute infezioni batteriche e fungine e dalla formazione di granulomi. La CGD nella sua forma classica si manifesta abitualmente prima dei 2 anni di vita, ma in diversi casi può essere diagnosticata in età adulta (Liese et al., 1996). La diagnosi negli adulti trova una probabile spiegazione nella frequenza ridotta delle infezioni in soggetti affetti da forme varianti della CGD in cui il difetto della NADPH ossidasi non è totale e dalle numerosi diagnosi differenziali possibili. In caso di infezione polmonare, ad esempio, si tende ad evocare altri tipi di granulomatosi, come la tubercolosi o la sarcoidosi; in caso di sintomi a livello del sistema digestivo, ci si orienta spesso verso il morbo di Crohn.

La scoperta dell'origine genetica della malattia e, più in particolare, la caratterizzazione dei geni implicati, ha negli ultimi anni, migliorato la comprensione dell'eterogeneità clinica di questa patologia. Nel 75% dei casi di CGD la trasmissione della malattia è legata al cromosoma X; nel restante 25% dei casi la trasmissione è autosomica recessiva e, più raramente, autosomica dominante (Segal BH et al., 2000; Seiger RA, 2008). La messa in evidenza del difetto funzionale dei fagociti e la caratterizzazione delle mutazioni genetiche all'origine della CGD sono indispensabili per poter diagnosticare la malattia.

1.F.1 Basi fisiopatologiche della CGD

Le manifestazioni cliniche della CGD derivano dal disfunzionamento del complesso enzimatico NADPH ossidasi: si parla quindi di un'enzimopatia ereditaria. Le mutazioni responsabili della riduzione o dell'assenza di attività enzimatica possono riguardare quattro geni diversi: *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4*, che codificano rispettivamente per gp91*phox*, p22*phox*, p47*phox*, p67*phox* e p40*phox* (Cfr Tabella 2).

La CGD a trasmissione legata al cromosoma X (**CGDX**) deriva da mutazioni nel gene *CYBB*, localizzato sul braccio corto del cromosoma X, codificante per la subunità gp91*phox* del citocromo b₅₅₈. Il 60% dei casi di CGD è riconducibile a un difetto a carico di questo gene. In questa forma di trasmissione, i soggetti maschi affetti dalla malattia nascono da madri eterozigoti portatrici sane, che esibiscono un'attività NADPH ossidasica ridotta (spesso nella misura di 50%) e che, nella maggior parte dei casi, non presentano particolari sintomi dovuti ad un aumento significativo delle infezioni, rispetto ad una popolazione di controllo.

Le forme di CGD a trasmissione autosomica recessiva (**CGDAR**) sono dovute a mutazioni a carico dei geni *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4* (Parkos et al, 1988; Dinauer et al. 1990; Lomax et al. 1989; Vollp et al. 1989; Let et al. 1990; Kenney et al. 1993). Recentemente, è stato identificato e descritto il primo caso di CGD dovuto mutazioni autosomiche recessive a carico del gene *NCF4*, codificante per la proteina p40*phox* (Matute et al., 2009). È stato finora descritto un solo caso clinico di immunodeficienza primaria dovuto ad una mutazione dominante recessiva della piccola proteina G Rac2 (Ambruso et al., 2000; Williams et al., 2000).

Le mutazioni dei geni all'origine delle differenti forme di CGD non hanno una localizzazione specifica; la caratterizzazione molecolare della malattia risulta quindi difficile. Queste mutazioni possono essere situate nelle zone di giunzione introne-esone o nella parte codificante,

o ancora nella regione promotrice del gene. Diversi tipi di mutazioni sono possibili: mutazioni puntiformi, delezioni o inserzioni, o inversioni (Roos et al., 1996 e 2010).

Nella maggior parte dei casi, le mutazioni genetiche provocano l'assenza della proteina corrispondente, o per un difetto di sintesi dell'RNA messaggero, o per l'instabilità della proteina mutata (troncata o con la conformazione errata) che viene rapidamente eliminata (CGDX⁰ o CGDAR⁰). La forma CGDX⁰, la più frequente, si caratterizza per l'assenza delle due subunità del citocromo b₅₅₈, pur essendo colpito solamente il gene *CYBB*. Sembra infatti che esista una stabilizzazione reciproca di delle sue subunità del citocromo, poiché nel caso delle CGDAR con un difetto di *p22phox*, la subunità *gp91phox* risulta assente.

Esistono poi delle varianti rare, caratterizzate da una diminuita espressione (CGDX⁻) o da un'espressione normale di *gp91phox* mutata e afunzionale (CGDX⁺).

I casi di CGDX⁻ sono riconducibili a mutazioni non-senso che causano la perdita della conformazione stabile di *gp91phox* o, più raramente, a mutazioni a livello del promotore del gene *CYBB*. Mutazioni non-senso nella regione codante del gene *CYBB* sono generalmente alla base dei casi di CGDX⁺ (Li e Stasia, 2008).

In ogni caso, anche se queste varianti risultano essere estremamente rare, esse hanno permesso di mettere in evidenza nuovi aspetti funzionali delle proteine componenti il complesso NADPH ossidasi, grazie in particolare, agli studi di relazione struttura-attività (Stasia, 2007).

| Nome | Gene coinvolto | Proteina colpita | Sottotipo | Modalità di trasmissione | Localizzazione cromosomica | Frequenza (%) |
|----------------|----------------|------------------|------------------|--------------------------|----------------------------|---------------|
| CGD91X | <i>CYBB</i> | <i>Gp91phox</i> | X91 ⁰ | X-linked recessivo | Xp21.1 | 50 |
| | | | X91 ⁻ | | | <5 |
| | | | X91 ⁺ | | | <5 |
| CGD22AR | <i>CYBA</i> | <i>p22phox</i> | A22 ⁰ | Autosomico rec. | 16q24 | 5 |
| | | | A22 ⁺ | | | 1 caso |
| CGD47AR | <i>NCF1</i> | <i>p47phox</i> | A47 ⁰ | Autosomico rec. | 7q11.23 | 32 |
| CGD67AR | <i>NCF2</i> | <i>p67phox</i> | A67 ⁰ | Autosomico rec. | 1q25 | 5 |
| | | | A67 ⁻ | | | 1 caso |
| CGD40AR | <i>NCF4</i> | <i>P40phox</i> | A40 ⁰ | Autosomico rec. | 22q13.1 | 1 caso |

Tabella 2. Le diverse forme di CGD. La forma genetica più frequente è quella a trasmissione X-linked (60% dei casi), con mutazioni a carico del gene *CYBB* codificante per *gp91phox*. Tra le forme a trasmissione autosomica recessiva (AR), la più frequente è quella che coinvolge il gene *NCF1* che codifica per *p47phox*. Varianti estremamente rare di CGD sono caratterizzate dall'espressione ridotta (-) o normale (+) della proteina mutata.

1.F.2 Diagnosi clinica della CGD

Nella maggior parte dei casi, i pazienti affetti da CGD soffrono di episodi ricorrenti infettivi sin dalla più giovane età. La grande varietà di organi coinvolti, nel bambino come nell'adulto, è sorprendente, e indicativa dell'eterogeneità della patologia. Tra gli agenti infettivi fungini, l'*Aspergillus* è fortemente dominante, ed è responsabile del 33% delle infezioni, provocando delle aspergillosi polmonari invasive in circa un terzo dei pazienti. Tra gli agenti batterici, lo *Staphylococcus aureus* è il più frequente, accanto alle enterobatteriacee quali la *Salmonella*. Nel corso degli anni, si è assistito ad una modificazione dell'ecologia batterica e dei nuovi ceppi batterici altamente virulenti, quali *Nocardia*, *Serratia marscens*, *Burkholderia cepacia*, che provocano infezioni gravi generalizzate (Van der Berg et al., 2009).

L'infezione polmonare è documentata nel 80% dei casi; i segni clinici associano febbre, tosse e dispnea. L'evoluzione comporta spesso delle pneumopatie, ascessi polmonari, infiltrati reticolonodulari, miliari, sfoghi pleurici, ecc. I germi coinvolti nelle infezioni polmonari sono essenzialmente lo stafilococco aureo, le enterobatteriacee, i micobatteri, *Aspergillus* e *Nocardia*. Si ritrovano frequentemente anche infezioni cutanee, corrispondenti spesso a lesioni eczematose, localizzate a livello del viso nelle zone periorefiziali, a livello del cuoio capelluto, con l'aspetto di una dermatite seborroica.

Nell'adulto come nel bambino si riscontrano infezioni osteoarticolari a localizzazione variabile: articolazioni scheletriche, ossa piccole periferiche, ossa piatte e rachide. Può trattarsi di infezioni primarie o secondarie, associate o meno a pneumopatie.

1.F.3 Diagnosi biochimica

La diagnosi funzionale della CGD si basa sulla misura dei metaboliti reattivi dell'ossigeno prodotti dai granulociti attivati. Diversi sono i tests da realizzare, secondo la specificità della risposta desiderata, la quantità di sangue totale disponibile, nonché il tempo trascorso dal prelevamento.

Il test di screening della malattia resta il saggio del Nitroblu di Tetrazolio (NBT), basato sull'attivazione del complesso NADPH ossidasi dei granulociti da parte di agenti solubili (PMA) in presenza di NBT. Quest'ultimo, di colore giallo, viene ridotto dalle specie reattive dell'ossigeno prodotte dal complesso enzimatico stimolato a formazano che dà un precipitato di colore viola. Il deposito su vetrino e la conta delle cellule che hanno ridotto l'NBT a formazano

permettono di diagnosticare immediatamente la CGD e, inoltre, di individuare il suo tipo di trasmissione, in particolare nel caso in cui il paziente affetto sia di sesso maschile affetto dalla forma X-linked. In questo caso la madre risulta portatrice con circa il 50% di neutrofili normali e il restante 50% negativo al saggio del NBT. Tuttavia, le percentuali rispettive di queste due popolazioni cellulari possono variare caso per caso, soprattutto se si è in presenza di un'inattivazione non equilibrata del cromosoma X (Anderson-Cohen et al., 2003).

La diagnosi biochimica e genetica della CGD viene realizzata in laboratori specializzati. Nella maggior parte dei casi, la mutazione in uno dei quattro geni coinvolti nella CGD, provoca la non espressione della proteina, sia per un difetto di sintesi dell'RNA messaggero, sia per una mancanza di stabilità della proteina mutata (unfolding). L'identificazione della proteina mancante del complesso ossidasi (gp91*phox*, p22*phox*, p47*phox* p40*phox* o p67*phox*) orienta successivamente la ricerca della mutazione responsabile della CGD nel gene implicato. In seguito, a partire di un estratto dei neutrofili del paziente affetto da CGD, l'immunoanalisi (per western blotting) realizzata grazie ad anticorpi specifici diretti contro le proteine del complesso ossidasi permette di visualizzare la proteina mancante. Nel caso in cui gp91*phox* sia assente, si sospetta un caso di CGDX⁰; la proteina p22*phox* risulta ugualmente assente poiché si verifica una sorta di auto-stabilizzazione delle due componenti durante la loro biosintesi. Allo stesso modo la CGDAR22⁰ è caratterizzata dall'assenza di p22*phox* e, contemporaneamente, di gp91*phox*.

Noto il sesso (femminile) del paziente affetto e constatata la normale attività ossidasica (saggio NBT) dei neutrofili della madre, è possibile orientarsi verso la diagnosi di una forma di CGDAR.

La ricerca della mutazione viene effettuata inizialmente per trascrizione inversa e amplificazione tramite PCR (reazione polimerasica a catena) dell'intera regione codificante del mRNA ottenuto a partire dal gene coinvolto nella malattia, seguita da sequenziamento. Sebbene la mutazione all'origine della CGD possa essere identificata sulla base del mRNA del paziente, è necessario poi confermarla tramite identificazione del gene corrispondente. In alcuni rari casi, l'mRNA è parzialmente o totalmente assente: diventa quindi indispensabile amplificare e sequenziare direttamente tutti gli esoni del gene coinvolto.

Il principale interesse della determinazione della mutazione all'origine dei casi di CGD nei pazienti è rappresentato dalla possibilità di effettuare uno studio familiare, e di proporre ai pazienti, nel caso di un consiglio di ordine genetico, la possibilità di una diagnosi prenatale in caso di una gravidanza futura.

1.F.4 Trattamento, prognosi e prospettive terapeutiche

(per review cfr Stasia et al., 2009)

Attualmente, le strategie terapeutiche prevedono la chemioprolifassi antifungina e antibatterica per tutti i pazienti cui è stata diagnosticata la CGD. L'associazione trimetoprim-sulfametossazolo (TMP-SMX) è l'antibioticoprofilassi più utilizzata, poichè possiede un buon spettro di attività sui microorganismi che sono più frequentemente causa di infezione nei pazienti CGD (Margolis et al., 1990). Il TMP-SMX è lipofilico (quindi si concentra nelle cellule), e ben tollerato, poichè non colpisce la flora intestinale. Numerosi studi hanno evidenziato una riduzione dell'incidenza delle infezioni severe grazie ad una profilassi regolare. Il TMP-SMX causa raramente effetti secondari; in caso di controindicazioni, la ciprofloxacina costituisce una buona alternativa (Stasia et al., 2009).

Le infezioni fungine, in particolare da *Aspergillus*, sono responsabili di un forte tasso di mortalità (da 30 a 40%): la profilassi è dunque indispensabile. L'itraconazolo è un antifungino di natura fortemente lipofila, disponibile in forma orale e attivo su *Aspergillus* e generalmente ben tollerato (Neijens et al., 1989).

Il trattamento delle infezioni acute nella CGD si basa sull'antibiotico terapia, gli antifungini e, in casi eccezionali, la trasfusione dei granulociti. Le infezioni batteriche vanno trattate rapidamente con un'antibioticoterapia aggressiva e sinergica, adattata ai microorganismi più frequentemente causa di infezioni nella CGD. L'antibioticoterapia è inizialmente probabilistica e adattata in un secondo tempo, una volta che il germe responsabile è stato isolato. La ciprofloxacina è spesso l'antibiotico di prima scelta; l'associazione alla vancomicina o alla teicoplanina permette di assicurare una buona copertura nei confronti dei cocci Gram+. L'anfotericina B è invece il trattamento antifungino di prima scelta. Tra i nuovi antifungini potenzialmente utili nel trattamento della CGD, i triazoli di seconda generazione, come il voriconazolo e la caspofungina, sembrano particolarmente efficaci (Stasia et al., 2009).

In caso di infezioni gravi, di natura purulenta e resistenti al trattamento antibiotico, sono stati ottenuti risultati positivi associando la chirurgia alla trasfusione di granulociti. Tuttavia, questa metodica è oggetto di controversie: dà luogo infatti a effetti indesiderati importanti, con rischio di allo-immunizzazione e di reazione di rigetto contro l'ospite.

Una modalità di profilassi è basata sull'impiego di interferone gamma ($IFN\gamma$), una citochina immunomodulatrice che si è rivelata efficace nel ridurre la frequenza delle infezioni batteriche e nel migliorare lo stato clinico dei pazienti. Cassatella e colleghi hanno inoltre dimostrato che il trattamento di PMN in vitro con $IFN\gamma$ determina un aumento dei livelli di espressione degli

mRNA codificanti per *gp91phox*; gli stessi autori hanno anche mostrato che l'IFN γ non modifica i livelli di espressione della proteina *p22phox* mentre causa una riduzione della trascrizione costitutiva del gene per *p47phox* (Cassatella et al., 1990 e 1991). L'IFN γ sembra essere in grado di aumentare l'attività NADPH ossidasica in alcune rare varianti di CGDX91¹, in cui neutrofili e monociti erano caratterizzati da un'estremamente debole, ma misurabile, attività ossidasica. Tuttavia, nei pazienti CGDX91⁰ e CGDAR l'aumento della produzione di superossido conseguente al trattamento con IFN γ non si è rivelato significativo (Ezekowitz et al., 1987; Newberger et al., 1988). Studi più recenti hanno peraltro dimostrato l'efficacia e la sicurezza dell'uso di IFN γ come farmaco di profilassi (Weening et al., 1995), anche a lungo termine (Marciano et al., 2004). L'uso prolungato di IFN γ sembra infatti sicuro e mostra una persistente diminuzione della frequenza di infezioni gravi e della mortalità. Non è stato osservato aumento delle complicanze proinfiammatorie, quali formazioni di granulomi. Si ritiene inoltre che l'IFN γ potenzi le vie antimicrobiche ossigeno-indipendenti, anche se i meccanismi molecolari associati a questo rafforzamento delle difese immunitarie nei pazienti CGD non sono noti con precisione. Tuttavia, l'elevato costo di tale profilassi a lungo termine e la necessità della somministrazione per via intramuscolare hanno fortemente limitato la sua applicazione.

Il trattamento curativo della CGD è rappresentato dal **trapianto di midollo osseo**; tuttavia la difficoltà di trovare donatori HLA compatibili limita fortemente la sua applicazione. Sembra inoltre che il tasso di riuscita e di sopravvivenza siano fortemente connessi con l'età del paziente e con l'assenza di infezioni al momento del trapianto (Seger et al., 2002).

Per quanto concerne la prognosi, va detto che, grazie all'evoluzione naturale (riduzione degli episodi infettivi con l'età) e ai progressi terapeutici, in particolare per la profilassi, i pazienti che hanno ricevuto una diagnosi precoce di CGD raggiungono l'età adulta e conducono una vita familiare e professionale normale. Nel 1957, la CGD era considerata una sindrome fatale entro i dieci anni di vita.

Un potenziale trattamento curativo della CGD è rappresentato dalla **terapia genica**. Le donne portatrici della forma CGD X-linked possiedono il 10-20% di neutrofili normali e non hanno, in generale, sindromi cliniche: questo suggerisce che si possono osservare benefici clinici derivati dalla terapia genica in granulociti parzialmente corretti. Nei primi esperimenti, la correzione parziale e transitoria dell'attività NADPH ossidasica dopo trasferimento genico non aveva

apportato alcun beneficio clinico duraturo (Malech et al., 1997; Barese et al., 2004) Più recentemente, la transfezione del gene *CYBB* è stata realizzata tramite un vettore retrovirale: dopo condizionamento del midollo osseo, i ricercatori hanno potuto recuperare i fagociti circolanti che esprimevano il gene corretto e il cui numero aumentava progressivamente. Questo trattamento ha permesso la regressione totale delle infezioni severe di questi pazienti; tuttavia, due anni dopo il trattamento, i pazienti hanno riacquisito il loro fenotipo iniziale (Nalidini, 2006). Nuove strategie, compreso il design di nuovi vettori virali, sono attualmente in fase di elaborazione, allo scopo di permettere il prolungamento dell'effetto benefico di un tale approccio terapeutico (Ott et al., 2006; Kang et al., 2010) ed evitare i rischi connessi all'utilizzo di un vettore retrovirale quali la mutagenesi per inserzione.

1.G. Gli omologhi di Nox2: Nox e Duox

(per review cfr Bedard et Krause, 2007)

Negli anni '90, le migliorie apportate alla sensibilità delle metodiche di misura della produzione di ROS a permesso di poter rivelare la produzione di deboli quantità di metaboliti reattivi dell'ossigeno in cellule non fagocitiche quali le cellule epiteliali, muscolari, endoteliali, neuronali, fibroblasti, ecc. Questa produzione é stata inizialmente attribuita alla respirazione mitocondriale, ma l'uso di inibitori della catena respiratoria e di flavoenzimi a dimostrato che una flavoproteina simile a Nox2 ne era responsabile. Il primo enzima omologo a Nox2 é stato descritto nel 1999 (Suh et al., 1999; Banfi et al., 2000). Attualmente, sei omolghi di Nox2 sono stati scoperti e inclusi in due famiglie: Nox (per NADPH oxidase) e Duox (per Dual oxidase) (Figura 7).

Per quanto concerne la loro sequenza, tutti i membri della famiglia Nox (Nox1, 2, 3, 4, e 5) possiedono un dominio a sei α eliche transmembrana con quattro residui di istidina in coordinazione con i due gruppi eme, e una regione C-terminale citosolica contenente i siti di fissazione per il FAD e il NADPH, fortemente conservati. Nox 1 e Nox3 hanno dimensioni quasi identiche a Nox2 e presentano, nella loro sequenza, un grado di omologia del 60% rispetto a Nox2. Nox5 e Duox sono gli enzimi che più si discostano dalla struttura di Nox2: Nox5 possiede un'estensione N-terminale supplementare, contenente quattro motivi EF-hand (siti di legame per il calcio); la produzione di specie reattive dell'ossigeno da parte di Nox5 é infatti calcio-dipendente (Banfi et al., 2001).

Duox 1 e 2 possiedono anch'essi un dominio N terminale esteso, costituito da due motivi EF-hand seguiti da un'elica transmembrana e da un dominio omologo alla perossidasi sul lato esterno della membrana plasmatica. Questi enzimi sarebbero in grado di trasformare direttamente gli anioni superossido prodotti in H_2O_2 (El-Hassani et al., 2005).

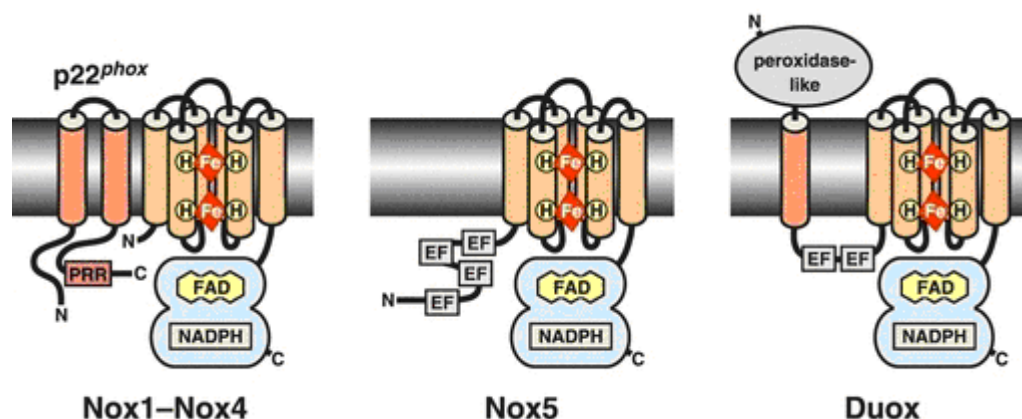


Figura 7 : Modello strutturale dei diversi sottotipi di enzimi Nox e Duox. Abbreviazioni: EF, motivo EF-hand legante il calcio; H, istidine in coordinazione con i gruppi eme (Fe). (Da Sumimoto, 2008).

➤ **Nox1** è particolarmente concentrato a livello del colon; è stata ritrovato anche in utero, prostata, cellule della muscolatura liscia, placenta e cellule endoteliali. Il ruolo fisiologico di Nox1 è ancora oggetto di discussione. Due ipotesi principali sembrano emergere: Nox1 interverrebbe nella difesa dell'organismo, grazie a processi microbicidi ROS-dipendenti e, inoltre, stimolerebbe la proliferazione cellulare attraverso l'attivazione di meccanismi di segnalazione intracellulari redox-sensibili (Lambeth et al., 2007). L'espressione di Nox1 è inducibile a livello della muscolatura liscia dell'aorta e sembrerebbe intervenire nella regolazione della pressione sanguigna.

➤ **Nox3** è l'isofoma con una distribuzione tessuto-specifica più elevata. E' presente infatti in quantità rilevanti a livello dell'orecchio interno, e in particolare nel sistema vestibolare e auditivo. Interterrebbe nella formazione dell'orecchio interno e nella regolazione dell'equilibrio.

➤ **Nox4** è stata inizialmente caratterizzata a partire dal tessuto renale adulto (e per questo originariamente definita Renox); oltre che nel rene, è espressa a livello delle cellule endoteliali, muscolari lisce, cardiache, pancreatiche, cellule della placenta, della muscolatura striata, ovaie, testicoli, osteoclasti, fibroblasti e astrociti. La funzione di Nox4 è ancora incerta; nel rene, questa proteina avrebbe il ruolo di "sensore di ossigeno" (oxygen sensing) e di

regolatore della sintesi di eritropoietina (Geiszt et al., 2000; Shiose et al., 2001). Nox4 sembra inoltre essere la sorgente principale di radicali ossidanti nelle prime fasi della fibrosi renale diabetica. A livello extra-renale, Nox4 interverrebbe nella differenziazione cardiaca durante lo stadio embrionale, nel riassorbimento osseo degli osteoclasti e nel metabolismo dell'insulina. Recentemente, Nox4 è stata implicata nella generazione dei radicali dell'ossigeno coinvolti nella degenerazione della cartilagine nell'artrosi (Grange et al., 2006).

➤ **Nox5** è stata essenzialmente ritrovata nei testicoli e nei tessuti linfoidei, pur essendo assente nei linfociti circolanti. Nei tessuti citati, questa isoforma catalizza la produzione calcio-dipendente di specie reattive dell'ossigeno, la cui funzione resta tuttavia da chiarire (Banfi et al., 2001); le ROS prodotte potrebbero intervenire nell'induzione dell'apoptosi durante le fasi precoci della spermatogenesi e nella fusione ovocita-spermatozoo.

➤ **Duox1** e **Duox2** sono entrambe espresse nella tiroide e per questo sono state inizialmente definite ThOX (thyroid oxidase); successivamente Duox1 è stata ritrovata a livello delle ghiandole del tratto gastrointestinale e Duox2 a livello dell'epitelio respiratorio. Possiedono un grado di omologia con l'omologo Nox2 pari all'83%. Duox1 e Duox2 sembrano coinvolti nella sintesi degli ormoni tiroidei e nella difesa dell'ospite a livello degli epitelii (Bedard et Krause, 2007)

Fatta eccezione per la proteina Nox2, il ruolo delle diverse isoforme Nox nell'uomo resta ancora da svelare; sono attualmente in corso numerosi lavori di ricerca che implicherebbero le Nox in patologie importanti quali il diabete, l'aterosclerosi, l'ipertensione arteriosa e il tumore.

1.H Le PLB-985 come modello cellulare

La linea promielocitica PLB-985 è stata stabilita dal gruppo del prof. Rado nel 1987 (Tucker et al., 1987). Le cellule PLB-985 derivano da una linea di cellule umane, mieloidi, diploidi, ottenute a partire dal sangue periferico di una paziente affetta da leucemia non linfocitica acuta. Si tratta di cellule monomieloblastiche ad uno stadio di maturazione più precoce rispetto alla linea promielocitica HL-60 (anch'essa ampiamente utilizzata negli studi del complesso NADPH ossidasi). Le cellule PLB-985 possono essere differenziate in granulociti o in monociti/macrofagi in presenza di certi agenti induttori: PMA, dimetilsolfossido (DMSO), acido retinoico, dimetilformammide, cAMP. La Figura 8 (da Pivot-Pajot et al., 2010) mostra la

morfologia delle cellule PLB-985 ottenuta tramite microscopia a trasmissione elettronica prima (A) e dopo (B) induzione della differenziazione con DMSO.

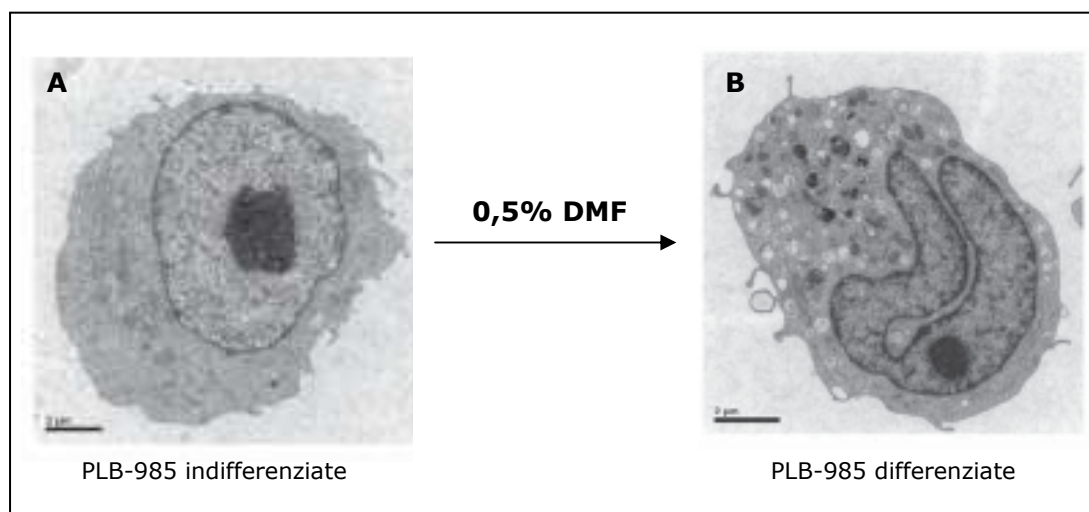


Figura 8: Morfologia delle cellule PLB-985 in microscopia a trasmissione elettronica. A: Cellule PLB-985 promielocitarie non indotte; B: cellule PLB-985 dopo induzione della differenziazione con 0,5% dimetilformammide (DMF) (Da Pivot-Pajot et al., 2010).

In seguito al trattamento con l'agente chimico il nucleo delle cellule appare ridotto e polilobato, e nel citoplasma è possibile osservare la presenza di numerosi granuli. Alcune differenze nella morfologia di queste cellule rispetto a quella dei neutrofili sono comunque evidenzabili: le PLB-985 conservano infatti un nucleo più voluminoso e meno polilobato.

Le PLB-985 differenziate in granulociti o “neutrophils-like”, esprimono tutte le subunità del complesso NADPH ossidasi (*gp91phox*, *p22phox*, *p40phox*, *p47phox* e *p67phox*), oltre che i granuli primari (Tucker et al., 1987), mentre le altre popolazioni granulari citoplasmatiche non sono state identificate.

Nel 1993 i ricercatori del gruppo di Dinauer hanno costituito una linea di PLB-985 in cui il gene *CYBB* codificante per *gp91phox* o *Nox2* è stato inattivato per ricombinazione omologa (Zhen et al., 1993). Questa linea cellulare, detta X-CGD (o KO, knock out), è stata ottenuta inserendo, tramite ricombinazione omologa, una cassetta codificante per la fosfotransferasi igromicina B (HYG), a livello del terzo esone del gene *CYBB* (Fig. 9).

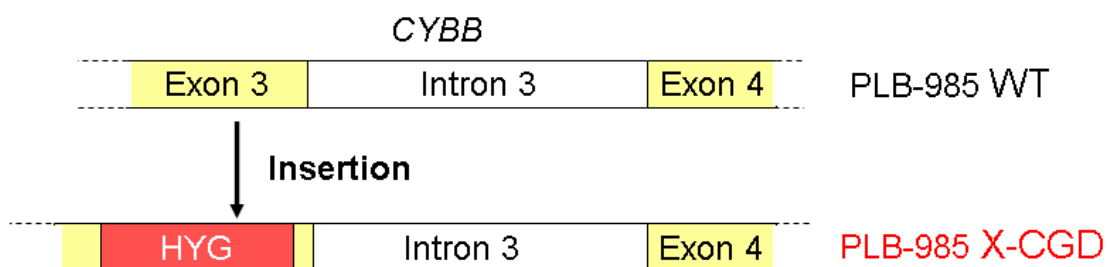


Figura 9: Costruzione della linea cellulare PLB-985 X-CGD (KO). Interruzione del gene *CYBB* codificante per Nox2 tramite inserimento di una cassetta codificante per la fosfotransferasi igromicina B per ricombinazione omologa a livello del terzo esone del gene.

In questo modello cellulare, l'espressione di Nox2 risulta totalmente abolita e l'attività NADPH ossidasica conseguentemente assente. Questa linea permette di avere in coltura cellule "neutrophils-like" di tipo CGDX⁰. É inoltre possibile ripristinare un'attività ossidasi equivalente a quella delle cellule PLB-985 originali (wild-type, WT) grazie alla transfezione stabile del DNA complementare (cDNA) di Nox2 (cellule WT-Nox2) (Zhen et al., 1993).

2. Obiettivi della tesi

L'uccisione di batteri e funghi da parte dei neutrofili è mediata dall'attività delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte in seguito all'attivazione della NADPH ossidasi, la cui tossicità è fortemente potenziata dalla mieloperossidasi (*meccanismi ossidativi*) e dall'azione di proteine microbicide contenute nei granuli citoplasmatici (*meccanismi non ossidativi*).

Il coinvolgimento diretto delle specie reattive dell'ossigeno e della mieloperossidasi (MPO) nell'attività microbica dei PMN è stato recentemente messo in discussione. Nuovi dati, infatti, sarebbero a favore dell'ipotesi secondo cui la NADPH ossidasi e le ROS giocherebbero un ruolo indiretto, funzionale all'attivazione dei meccanismi non ossidativi; ciò avverrebbe attraverso modificazioni chimico-fisiche dell'ambiente intrafagosomale (pH e tonicità) che favorirebbero la slatentizzazione e l'attivazione delle proteine antimicrobiche granulari (Reeves et al., 2002; Ahliwalia et al., 2004; Segal, 2005).

Recentemente, nel laboratorio del Prof Dri in cui ho condotto parte della tesi, è stato dimostrato che la tecnica comunemente impiegata per misurare l'attività microbica dei PMN era inficiata da un grave errore metodologico che falsava i risultati ottenuti (Decleva et al., 2006). Adottando un metodo corretto che ovvia a tale inconveniente ci siamo proposti di riesaminare il ruolo relativo dei meccanismi ossidativi e non ossidativi nell'attività microbica dei PMN nei confronti di vari tipi di microorganismi: batteri Gram negativi (*Escherichia coli*), batteri Gram positivi (*Staphylococcus aureus*) e funghi (*Candida albicans*). In particolare abbiamo verificato il possibile coinvolgimento:

- dei flussi di ioni K^+ ;
- delle modificazioni del pH fagosomale;
- del sistema mieloperossidasi- H_2O_2 -cloruro.

L'utilizzo di linee cellulari differenziabili nel fenotipo granulocitico, quali le cellule PLB-985, si rivela particolarmente utile per lo studio dell'attività NADPH ossidasica e della produzione di ROS (Bouleven et al., 2006; Fay et al., 2006; Taylor et al., 2006; van Bruggen et al., 2004; Bionda et al., 2004; Li et al., 2005 e 2007). Recentemente, le ricerche svolte nel laboratorio della Dott.ssa Stasia nell'ambito del rapporto struttura-funzione delle proteina Nox2 nel modello cellulare PLB-985, hanno permesso di ottenere per la prima volta una linea di cellule PLB-985 mutanti caratterizzate da un'attività ossidasica superiore alle cellule controllo (Li et al., 2005). In questo contesto, ci siamo interessati a:

- caratterizzare tale “super-produzione” di specie reattive dell’ossigeno da parte delle cellule mutanti in risposta ad agonisti particolati;
- determinare l’impatto della super-produzione di anioni superossido da parte delle cellule mutanti sull’attività microbica di queste cellule nei confronti di differenti microorganismi;
- analizzare la composizione dei granuli citoplasmatici delle cellule PLB-985, seguendo la loro progressione lungo il fenotipo granulocitico, allo scopo, da un lato, di valutare l’importanza delle proteine antimicrobiche granulari (che costituiscono nel loro insieme, i meccanismi di killing ossigeno indipendenti) nell’attività microbica di queste cellule e, dall’altro, di caratterizzare l’efficacia della differenziazione delle cellule PLB-985 in *neutrophils-like*.

Il disfunzionamento dei meccanismi microbicidi dei fagociti é alla base dell’elevata frequenza delle infezioni batteriche e fungine cui sono soggetti i pazienti affetti da malattia granulomatosa cronica (CGD). Parte di questo lavoro di tesi é stata dedicata alla caratterizzazione molecolare e funzionale di un raro caso di CGD X91⁷. Questi gli obiettivi che ci siamo prefissati:

- caratterizzare l’espressione e l’attività ossidasica dei granulociti del paziente;
- identificare la mutazione responsabile della malattia e determinarne le conseguenze sulla biogenesi della proteina;
- valutare l’effetto della mutazione identificata sull’attività microbica dei neutrofili del paziente nei confronti di *S. aureus*, *C. albicans* ed *E. coli*.

3.A Cellule e anticorpi

3.A.1 Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofilici da sangue venoso umano

3.A.1a Metodo modificato da Böyum et al. 1968

Materiali

PBS (Phosphate Buffered Saline), soluzione salina tamponata contenente: KCl 2.7 mM; KH_2PO_4 1.5 mM; Na_2HPO_4 (12 H_2O) 8.1 mM; NaCl 137 mM; pH 7.4

PBS – TCN 1%: PBS contenente 1% (v/v) di citrato di sodio trisodico (TCN)

Ficoll-Hypaque, $d = 1.077$, Pharmacia e GE Healthcare

Tampone di lisi: NH_4Cl 155 mM; KHCO_3 10 mM; EDTA (2 H_2O) 0.1 mM; pH 7.

L'Établissement Français du Sang fornisce sangue umano venoso su eparina.

I granulociti neutrofilici sono isolati mediante gradiente di densità Ficoll-Hypaque. Il sangue viene inizialmente diluito 1:1 in tampone PBS – TCN 1%. Questa diluizione viene delicatamente depositata su uno strato di Ficoll-Hypaque in modo che il gradiente risulti costituito da un volume di Ficoll e due volumi di sangue diluito. La provetta viene quindi centrifugata per 20 minuti a $880 \times g$ alla temperatura di 20°C. Questa centrifugazione permette di separare lo strato linfo-monocitario (l'anello bianco all'interfaccia tra il plasma e lo strato di Ficoll, eventualmente recuperato per immortalizzare i linfociti B; cfr. § 3.A.5) dai granulociti neutrofilici e dagli eritrociti che sedimentano sul fondo della provetta. Per rimuovere gli eritrociti che contaminano la preparazione dei neutrofilici, il pellet rimasto dopo la rimozione del surnatante viene sottoposto a un trattamento di lisi in ghiaccio, della durata di 5-15 minuti. I neutrofilici sono quindi recuperati mediante una centrifugazione di 7 minuti a $460 \times g$, alla temperatura di 4°C, sottoposti ad un primo lavaggio nello stesso tampone di lisi e ad un secondo lavaggio in PBS. La popolazione cellulare così ottenuta è solitamente composta per il 95-98% da neutrofilici, per il 2-4% da eosinofili e per il 0.5-1% da cellule mononucleate.

3.A.1b Metodo modificato da Metcalf et al. 1986

Materiali

PBS

Soluzione anticoagulante: Na₄EDTA (sale tetrasodico dell'acido etilendiammino tetracetico), 40 mM in PBS

Tampone HEPES: HEPES 5 mM, NaCl 140 mM, KCl 5mM, glucosio 5 mM; pH 7.4; addizionato con 0.2% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma)

Tampone HEPES-ioni: tampone HEPES addizionato con 1 mM CaCl₂ e 1 mM MgCl₂

Soluzione Ipotonica: tampone fosfato 1 mM; pH 7.4

Soluzione Ipertonica: tampone fosfato 1 mM addizionato con NaCl all'1.3%; pH 7.4

PERCOLL: sospensione colloidale di particelle di silice rivestite di polivinilpirrolidone, (densità: 1.129 g/mL; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Svezia) diluita con acqua distillata apirogena e una soluzione 10 volte concentrata di PBS (3.35 Osm) così da ottenere due sospensioni: 1) Percoll isotonic al 62% in PBS, densità 1.087 g/mL e 2) Percoll isotonic al 75% in PBS, densità: 1.103 g/mL

Le suddette soluzioni sono preparate utilizzando acqua distillata apirogena (Laboratori Diaco Biomedicali S.p.A., Trieste), a pH variabile tra 4.5 e 6.5.

Il campione di sangue, prelevato ad un donatore sano, viene raccolto in una provetta contenente la soluzione anticoagulante (concentrazione finale 4 mM).

Si allestiscono quindi uno o più gradienti discontinui di Percoll, ponendo 4 mL di Percoll al 62% in una provetta e stratificando al di sotto di questi 4 mL di Percoll al 75%, con l'ausilio di una siringa provvista di un sottile catetere. Quest'operazione va eseguita delicatamente in modo da evitare il rimescolamento delle due sospensioni. Successivamente si stratificano 4-5 mL di sangue; le provette vengono poi centrifugate per 10 minuti a 200 × g e, continuativamente, per 15 minuti a 400 × g alla temperatura di 20°C. Al termine della centrifugazione le diverse componenti cellulari del sangue si trovano disposte nel gradiente, a seconda della loro densità, nel seguente modo: gli eritrociti e la maggior parte dei granulociti eosinofili sedimentano sul fondo della provetta, i granulociti neutrofili si dispongono all'interfaccia tra le due sospensioni di Percoll e, nella parte superiore del gradiente, tra lo strato di Percoll 62% e il plasma, si collocano linfomonociti e piastrine.

Plasma e linfomonociti vengono eliminati tramite aspirazione, mentre la banda contenente i neutrofili viene accuratamente prelevata con una pasteur di vetro, raccolta in una provetta e

sottoposta a lavaggio in un tampone HEPES, per 7 minuti a $250 \times g$, a 20°C . Allo scopo di eliminare gli eritrociti eventualmente presenti, il pellet così ottenuto viene sottoposto ad un rapido trattamento di lisi ipotonica: il fondello viene risospeso in 3 parti di soluzione ipotonica e dopo 10 secondi si ripristina l'ambiente isotonico aggiungendo 7 parti di soluzione ipertonica. Dopo un ulteriore lavaggio per 7 minuti a $250 \times g$, il pellet viene risospeso in un volume noto di tampone HEPES. La popolazione cellulare così ottenuta è solitamente composta per il 94-97% da neutrofili, per il 2-5% da eosinofili e per il 0.5-1% da cellule mononucleate.

Al termine dell'isolamento la concentrazione di neutrofili viene determinata mediante conta con un contatore elettronico di particelle (colulter Counter, modello ZBI, Coulter Electronics, LTD. Luton, BEDS, England) o al microscopio ottico, utilizzando un emocitometro (camera Bürker, Precicolor HBG, Germany; camera Malassez, Marienfeld, Germany). La sospensione cellulare viene infine diluita in PBS o in tampone HEPES alla concentrazione desiderata.

3.A.2 Coltura della linea cellulare PLB-985

Materiali

Cellule PLB-985 wild-type (WT) e *CYBB*-KO (X-CGD), fornite dalla D.ssa Mary Dinauer (Department of Pediatrics and Department of Medical and Molecular Genetics, Indiana, USA)

Cellule PLB-985 WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2: cellule PLB-985 X-CGD transfettate con il cDNA di Nox2 (cellule WT-Nox2) o con il cDNA di Nox4 (cellule Dloop_{Nox4}-Nox2)

Medium di coltura: RPMI 1640 addizionato con L-Glutamina 2 mM, Penicillina G 100 U/mL, Streptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 10% siero bovino (FBS, Foetal Bovine Serum, GIBCO, Invitrogen, deplementato mediante incubazione di 30 minuti a 56°C)

Geneticina, GIBCO, Invitrogen.

Le cellule PLB-985 sono coltivate in un incubatore a 37°C , in un'atmosfera umidificata al 5% di CO_2 . Il tempo di duplicazione delle cellule PLB-985 è di 24-48 ore; le cellule vengono diluite 1 a 10 nel medium di coltura ogni 72-96 ore; procedendo in questo modo, le cellule possono essere coltivate per un periodo di circa 2 mesi.

Per la coltura delle cellule PLB-985 WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2, il medium è addizionato di 0.5 mg/mL di geneticina, allo scopo di selezionare le cellule correttamente transfettate: infatti, il

vettore di transfezione pEF-PGKneo contiene il gene di resistenza a questo antibiotico; di conseguenza, solamente le cellule che hanno incorporato il vettore saranno in grado di sopravvivere e moltiplicarsi in questo medium di coltura (Li et al., 2005).

Nel caso in cui le cellule siano destinate allo studio dell'attività microbica, esse vengono coltivate in assenza di antibiotici per almeno una settimana antecedente la differenziazione.

3.A.3 Differenziazione delle cellule PLB-985

Le cellule PLB-985 vengono contate in camera Malassez per essere quindi differenziate in granulociti "neutrophils-like" alla concentrazione di 2×10^5 cellule/mL mediante l'aggiunta di 0.5% (v/v) di dimetilformammide (DMF) al medium di coltura (Tucker et al., 1987; Zhen et al., 1993). Due terzi del medium sono rinnovati dopo 3 giorni di coltura e le cellule sono utilizzate al giorno di differenziazione desiderato (da G0 a G6). Il tasso di vitalità delle cellule differenziate, determinato tramite il test di esclusione del trypan blu (Absolom, 1986), è del 90-95%.

3.A.4 Congelamento e scongelamento delle cellule PLB-985

Materiali

Medium di congelamento: DMSO 10% (v/v) e FBS 90% (v/v)

Medium di scongelamento: medium di coltura, contenente 20% (v/v) di FBS

Crioprovette, VWR™ International.

Le cellule da congelare vengono contate in camera Malassez, centrifugate 10 minuti a $400 \times g$ e risospese alla concentrazione di 10^7 cellule/mL nel medium di congelamento. La sospensione viene aliquotata nelle crioprovette e mantenuta per 18 ore a -80°C in una scatola da congelazione Nalgen™ Cryo, contenente dell'isopropanolo. Le crioprovette sono infine trasferite e conservate in azoto liquido.

Per il scongelamento, la crioprovetta viene rapidamente immersa in un bagnetto a 37°C ; le cellule sono immediatamente diluite in un eccesso di medium di scongelamento e sottoposte a tre lavaggi mediante centrifugazione di 10 minuti a $400 \times g$ a temperatura ambiente. Il medium

di scongelamento viene rinnovato il giorno successivo fino al volume finale di 6 mL. In seguito, le cellule sono coltivate nel medium di coltura abituale.

3.A.5 Immortalizzazione di linfociti B con il virus di Epstein-Barr

Materiali

RPMI 1640

Medium di coltura: RPMI I640 addizionato con 20% FBS, 2 mM L-Glutamina, 100 U/mL penicillina e 50 µg/mL di streptomina

EBV, Virus di Epstein-Barr, ceppo B95: linfociti di scimmia, immortalizzati con saliva umana contenente EBV, Laboratorio di Virologia dell'Ospedale di Grenoble, Francia

Ciclosporina A , Sigma.

I linfociti B sono recuperati a partire dall'anello linfomonocitario ottenuto per centrifugazione del sangue intero su gradiente di densità Ficoll-Hypaque (cfr. § 3.A.1a). Lo strato contenente i linfo-monociti è lavato due volte in RPMI 1640 mediante centrifugazione a $350 \times g$ per 8 minuti alla temperatura di 20°C; le cellule sono quindi contate in camera Malassez e risospese alla concentrazione di 10^6 linfociti/mL nel medium di coltura. L'immortalizzazione con il virus di Epstein-Barr viene effettuata dal laboratorio di virologia dell'ospedale universitario di Grenoble, aggiungendo ai linfociti B la sospensione contenente l'EBV in presenza di Ciclosporina A, un inibitore dei linfociti T che facilita la stabilizzazione delle linee linfoblastoidi.

I linfociti B sono poi incubati a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂; il medium di coltura viene rinnovato due volte alla settimana. Nell'arco di 7-20 giorni si osserva la formazione di un ammasso linfocitario: a questo punto, le colture cellulari sono divise e il medium di coltura è rinnovato con frequenza bisettimanale allo scopo di mantenere una concentrazione cellulare di $0.5-1.5 \times 10^6$ linfociti/mL. Per la preparazione degli RNA totali (vedi § 3.E.2.1) i linfociti B immortalizzati (LB-EBV) sono recuperati mediante una centrifugazione di 5 minuti a $350 \times g$ alla temperatura di 4°C e sottoposti a due lavaggi in PBS; il pellet così ottenuto è risospeso in PBS alla concentrazione di 10^8 cellule LB-EVB/mL (Cohen-Tanugi et al., 1991).

3.A.6 Preparazione di *Candida albicans*

Materiali

Candida albicans, isolato ospedaliero, fornito dalla clinica pediatrica dell'IRCCS "Burlo Garofolo" di Trieste o dal Laboratorio di Parassitologia, CHU Grenoble

SABOURAUD dextrose broth, disidratato: neopeptone 10 g/L, destrosio 20 g/L; pH finale 5.6 ± 0.2 (25°C); Sigma. Il terreno di coltura viene ricostituito in acqua distillata (30 g/L) e autoclavato a 121°C per 20 minuti

Pool di sieri umani, gentilmente forniti dall'Ospedale di Cattinara (Trieste) o dall'EFS (Etablissement Français du Sang, Grenoble)

Soluzione fisiologica: NaCl allo 0.9% in acqua distillata sterile

PBS-ioni: PBS addizionato con 1 mM CaCl₂ e 1 mM MgCl₂

Un'aliquota di blastospore di *C. albicans*, conservata a -80°C, viene scongelata, trasferita in una flask contenente 10 mL di terreno Sabouraud liquido e fatta crescere over night (per circa 18 ore) a 30°C in un bagno termostato, in agitazione. Allo scopo di eliminare residui di terreno, la brodocoltura subisce poi un lavaggio in soluzione fisiologica, mediante centrifugazione per 7 minuti a 2000 × g; il pellet così ottenuto viene successivamente risospeso in 1.5 mL di soluzione fisiologica e trasferito in una provetta di tipo "Eppendorf"; segue un'ulteriore lavaggio di 10 secondi a 12000 × g. La concentrazione delle blastospore viene determinata mediante conta microscopica con camera Bürker o Malassez; la sospensione, diluita alla concentrazione desiderata in PBS-ioni, viene quindi opsonizzata mediante incubazione con pool di sieri umani al 10%, per 30 minuti a 37°C in un bagno termostato, in agitazione. Al termine dell'opsonizzazione, la provetta viene messa in ghiaccio fino all'utilizzo nei saggi funzionali.

3.A.7 Preparazione di *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia Coli*

Materiali

Staphylococcus aureus: ceppo 502A, ATCC 27217, fornito dal dott. J. Iandolo (Department of Microbiology and Immunology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK, USA)

Escherichia coli: ATCC 25922, ceppo siero resistente, fornito dalla dott.ssa C. Lagatolla (Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste)

LB (Luria-Bertani) Broth, Miller, disidratato: peptone 10 g/L, estratto di lievito 5 g/L, NaCl 10 g/L; pH finale 7.0 ± 0.2 (25°C); Merk KgaA, Germany. Il terreno di coltura viene ricostituito in acqua distillata (25g/L) e autoclavato a 121°C per 20 minuti

LB-AGAR: terreno LB contenente Agar al 2%

Pool di sieri umani

Soluzione fisiologica

PBS-ioni

Singole colonie di batteri, conservati a 4°C in terreno LB-agar su piastra Petri, vengono inoculate in una provetta contenente circa 7 mL di terreno LB liquido e fatte crescere over night a 37°C in un incubatore termostato. La brodocoltura viene quindi sottoposta a lavaggio in soluzione fisiologica, mediante centrifugazione a $2000 \times g$, per 7 minuti. Il fondello ottenuto è risospeso in 1.5 mL di soluzione fisiologica, trasferito in una provetta di tipo “Eppendorf” e centrifugato a $12000 \times g$ per 10 secondi; il pellet viene infine risospeso in 1.5 mL di soluzione fisiologica.

La concentrazione della sospensione batterica viene stabilita mediante lettura spettrofotometrica della torbidità alla lunghezza d’onda di 500 nm (Spectrophotometer UV/VIS Perkin-Elmer, Lambda 5); il valore di densità ottica viene confrontato con una curva di taratura costruita sulla base di sospensioni batteriche la cui concentrazione è stata determinata attraverso conta delle colonie su piastra Petri.

In seguito, i batteri vengono diluiti alla concentrazione desiderata in tampone PBS-ioni e quindi opsonizzati con pool di sieri umani al 10%, per 30 minuti a 37°C in un bagno termostato, in agitazione e infine conservati in ghiaccio fino al loro utilizzo nelle prove funzionali.

3.A.8 Anticorpi

3.A.8a Anticorpi utilizzati per la realizzazione dei western blots

| Denominazione | Specie | Proteina riconosciuta | Provenienza |
|----------------------------|----------|-----------------------|--------------------------------------------|
| mAb 48 | Topo | gp91 <i>phox</i> | Dono del prof. D. Roos, Amsterdam, Olanda. |
| mAb 449 | Topo | p22 <i>phox</i> | Dono del prof D. Roos, Amsterdam, Olanda. |
| Policlonale C-19 | Capra | p67 <i>phox</i> | Santa Cruz, TEBU. |
| Policlonale p47Cter | Coniglio | p47 <i>phox</i> | Laboratorio GREPI, Grenoble, Francia. |
| Policlonale p40Cter | Coniglio | p40 <i>phox</i> | Laboratorio GREPI, Grenoble, Francia |
| Policlonale | Coniglio | Rac2 | Laboratorio GREPI, Grenoble, Francia |

3.A.8b Anticorpi utilizzati in citofluorimetria

| Denominazione | Specie | Proteina riconosciuta | Fluorocromo associato | Canale Fluorescenza | Provenienza |
|--------------------------------------|--------|-----------------------|-----------------------|---------------------|----------------|
| mAb 7D5 | Topo | gp91 <i>phox</i> | - | - | Clinisciences |
| IgG1 | Topo | aspecifico | - | - | Sigma |
| BM16 | Ratto | CD294/CRTH2 | Alexa Fluor 647 | FL4 | BD Biosciences |
| Secondario F(ab')₂ | Capra | IgG murine | Alexa Fluor 633 | FL4 | Invitrogen |
| Secondario F(ab')₂ | Capra | IgG murine | Ficoeritrina (PE) | FL2 | Invitrogen |
| Secondario F(ab')₂ | Capra | IgG murine | Alexa Fluor 488 | FL1 | Invitrogen |
| mAb ICRF44 | Topo | CD11b umano | FITC* | FL1 | Sigma |

* FITC, Isotiocianato di fluoresceina.

3.B Preparazione degli estratti cellulari

Materiali

PBS

DFP, diisopropil fluorofosfato, inibitore delle serin-proteasi, Fluka

Tampone di lisi: 1% (p/v) Triton X100, HEPES 10 mM, MgCl₂ 3.5 mM, pH 7.4, contenente gli inibitori di proteasi: PMSF (Phenylmethyl sulfonyl fluoride) 1 mM e leupeptina 0.1 mM.

Metodo

I neutrofili isolati (10^8 cellule in PBS), vengono incubati con DFP 3 mM per 15 minuti, in ghiaccio. Si procede con una centrifugazione a $13000 \times g$ per 10 secondi alla temperatura di 4°C; il pellet così ottenuto viene risospeso nel tampone di lisi, e le cellule vengono incubate per 20 minuti in ghiaccio, agitando la sospensione al vortex ogni 5 minuti. Il surnatante ottenuto dalla successiva centrifugazione (30 minuti a $12000 \times g$ a 4°C), chiamato “estratto solubile di membrana all’1% Triton X100”, verrà utilizzato per effettuare lo spettro differenziale del citocromo b_{558} , il dosaggio delle proteine e i western blots. Il pellet, risospeso in tampone HEPES 10 mM contenente gli inibitori delle proteasi, viene omogeneizzato agli ultrasuoni per 5 secondi in ghiaccio, addizionato con una soluzione al 10% di Triton X100 e conservato a -80°C per la caratterizzazione di *p67phox* (difficilmente solubile nell’estratto 1% Triton X100).

3.C Analisi proteica

3.C.1 Dosaggio delle proteine

3.C.1a Metodo di Bradford

Si tratta di un metodo colorimetrico basato sulla formazione di un complesso tra il colorante blu di Coomassie e i gruppi amminici liberi delle proteine in soluzione. Il picco di assorbimento del blu di Coomassie passa da una lunghezza d’onda di 465 nm a quella di 595 nm quando il colorante è complessato ad un gruppo amminico (Bradford, 1976). L’assorbanza del complesso a 595 nm risulta proporzionale alla quantità di proteine, che viene quindi determinata a partire da una curva di taratura ottenuta con concentrazioni note di albumina serica bovina (BSA). I campioni e gli standard di BSA sono addizionati con il volume opportuno di reattivo di Bradford (BioRad Protein Assay) e incubati per almeno 5 minuti a temperatura ambiente. La misura dell’assorbanza dev’essere effettuata entro 30 minuti (periodo di stabilità della colorazione).

3.C.1b Metodo dell'acido bicinconinico, BCA

Si tratta di un saggio colorimetrico basato sulla riduzione degli ioni Cu^{2+} a Cu^+ ad opera dei legami peptidici delle proteine (Smith et al., 1985), che permette di valutare la concentrazione delle proteine in campioni biologici complessi. Il saggio sfrutta infatti la capacità chelante dell'acido bicinconinico, diretta specificamente contro gli ioni Cu^+ , che porta alla formazione di un complesso solubile di colore viola (BCA Protein Assay Kit, Inerchim). L'assorbanza di questo complesso a 562 nm è proporzionale alla quantità di proteine presente nel campione biologico. La concentrazione proteica è determinata in riferimento ad una retta di taratura realizzata a partire da quantità note di BSA. 2 mL della soluzione di lavoro sono aggiunti a 100 μL delle sospensioni dei campioni da testare e della gamma di BSA, e le provette chiuse vengono incubate 30 minuti a 37°C ("protocollo standard") o a 60°C ("protocollo sensibile"). L'assorbanza a 562 nm di ogni soluzione viene letta dopo raffreddamento delle provette.

3.C.2 Separazione delle proteine in gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE)

3.C.2.1 Preparazione del gel di poliacrilammide

Materiali

Gel di separazione all'11%: Tris-HCl 1.5 M pH 8.9 (6,0 mL), Sigma; Acrylamide/Bisacrylamide 40% (6.6 mL), Sigma; sodium dodecyl sulfate, SDS 10% (0.24 mL), Sigma; Persolfato di ammonio, APS, 10% (0.15 mL), Sigma; N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, TEMED (0.025 mL), Sigma; B-mercaptoetanol, Sigma; H₂O distillata (11.0 mL).

Gel di concentrazione: Tris-HCl 0,5 M pH 6.6 (2.5 mL); Acrylamide/Bisacrylamide 40% (1.0 mL); SDS 10% (0.1 mL); APS, 10% (0.07 mL); TEMED (0.01 mL); H₂O distillata (6.32 mL).

Le quantità indicate corrispondono alla preparazione di due mini-gel delle dimensioni di 9 cm × 6.5 cm, e di 1.5 mm di spessore.

La tecnica di elettroforesi SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) permette di separare le proteine in funzione della loro massa molecolare (Laemmli e Favre, 1973). A un dato valore di pH, le proteine acquisiscono una carica elettrica negativa o positiva in base al loro punto isoelettrico. Questa proprietà permette loro di migrare in un campo elettrico. Secondo questo metodo, le proteine vengono precedentemente denaturate trattandole con un agente riduttore (β -mercaptoetanolo) che rompe i ponti disolfuro intra- e inter-catena e con SDS, un detergente fortemente anionico che conferisce loro una carica elettrica negativa proporzionale alla loro massa. Conseguentemente, tutte le proteine migrano nella stessa direzione attraverso un gel di poliacrilammide e vengono separate esclusivamente in funzione della loro massa molecolare. La percentuale di poliacrilammide del gel è stabilita in base alla grandezza della proteina d'interesse: un'elevata percentuale di poliacrilammide porta infatti alla formazione di un gel dalle maglie strette che rallentano la migrazione, permettendo così di separare in modo ottimale le proteine più piccole.

3.C.2.2 Preparazione dei campioni e migrazione elettroforetica

Materiali

Tampone di denaturazione: Tris-HCl 240 mM pH 6.8, SDS 6 % (v/v), glicerolo 30 % (v/v), β -mercaptoetanolo 7,5 %, blu di bromofenolo 0,6 mg/ml.

Tampone di migrazione: Tris 25 mM; Glicina 190 mM; SDS 0.1% (p/v), pH 8.8

Markers di massa molecolare, Roche

I campioni proteici sono denaturati mediante incubazione a 60°C per 30 minuti o a 95°C per 2 minuti nel tampone di denaturazione. Il gel di acrilammide polimerizzato é posizionato nell'apparecchio da elettroforesi contenente il tampone di migrazione: i campioni sono depositati nei pozzetti del gel di concentrazione e sottoposti ad una corrente elettrica (30 mA per un mini-gel), applicata dall'alto (elettrodo negativo) verso il basso (elettrodo positivo) del gel. Il tempo di migrazione è di circa 1 ora. Contemporaneamente ai campioni, viene depositata nel gel anche una miscela di markers di massa molecolare nota, che permette di avere una stima della massa molecolare delle proteine presenti nei campioni.

3.C.2.3 Rivelazione di proteine su gel di poliacrilammide

Materiali

Soluzione Blu di Coomassie: blu di Coomassie 0.25% (p/v), acido acetico 10% (v/v), metanolo 50% (v/v)

Soluzione di decolorazione: etanolo 26% (v/v), acido acetico 7% (v/v).

Le proteine sono rivelate tramite colorazione al blu di Coomassie (rivelazione di circa 1 µg di proteine), incubando il gel nella soluzione di blu di Coomassie per 10-30 minuti, in agitazione. L'eccesso di colorante è eliminato tramite lavaggi successivi nella soluzione di decolorazione.

3.C.3 Western Blotting

3.C.3.1 Trasferimento di proteine su membrana

Materiali

Tampone di trasferimento: Tris 25 mM, Glicina 129 mM, SDS 0.01% (p/v), metanolo 20% (v/v), pH 8.3

Allo scopo di identificare le proteine separate per elettroforesi SDS-PAGE mediante anticorpi specifici, le proteine stesse vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa (0.45 µm di spessore) in un sistema semi-secco. In questo caso, il gel SDS-PAGE non dev'essere colorato al blu di Coomassie come descritto precedentemente. L'apparecchio di trasferimento, costituito da due elettrodi di grafite (LKB, electrophoretic transfert kit), viene accuratamente umidificato con il tampone di trasferimento. Il gel è disposto sulla membrana di nitrocellulosa, tra sei fogli di carta Whatman n°3, il tutto precedentemente impregnato di tampone di trasferimento. In questo modo, le proteine cariche negativamente migrano dal catodo verso l'anodo, adsorbendosi sulla membrana. Il trasferimento è realizzato a 1 mA/cm² di gel da trasferire per un periodo di 2 ore e 30 minuti – 3 ore, per un gel dello spessore di 1,5 mm. L'efficacia del trasferimento può essere verificata colorando il gel al blu di Coomassie (cfr § 3.C.2.3).

3.C.3.2 Rivelazione delle proteine

Materiali

Tampone TBS-Tween: Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 0.05% (v/v), pH 7.5;

Anticorpi primari: **mAb 48**, anti Nox2; **mAb 449**, anti p22*phox*; **anticorpi policlonali** anti p67*phox*, anti p40*phox* e anti p47*phox* (cfr § 3.A.9a);

Anticorpo secondario, anti-topo, coniugato con HRP (Horse Radish Peroxidase);

Latte disidratato “Régilait”.

Dopo il trasferimento, i siti liberi della membrana di cellulosa sono saturati tramite incubazione di un'ora, in lenta agitazione, in tampone TBS-Tween addizionato con l'1% (p/v) di latte disidratato. La membrana viene quindi sottoposta a tre lavaggi consecutivi di circa 5 minuti in TBS-Tween, per essere poi incubata in TBS-Tween per 2 ore a temperatura ambiente, in lenta agitazione, in presenza dell'anticorpo primario specifico per la proteina da rivelare.

La membrana viene quindi successivamente sottoposta ad almeno cinque lavaggi di 10 minuti in TBS-Tween prima di essere incubata per 45 minuti in presenza dell'anticorpo secondario. La membrana è poi abbondantemente risciacquata in TBS-Tween per 3-4 ore. Il legame dell'anticorpo secondario, coniugato con la perossidasi, viene rivelato per chemiluminescenza (kit ECL[®] Western Blotting, Amersham Biosciences). La chemiluminescenza ottenuta deriva dalla dissipazione d'energia del luminolo, eccitato in seguito alla sua ossidazione catalizzata dal sistema H₂O₂/HRP in condizioni alcaline. La luce emessa dal ritorno del luminolo allo stato basale è intensificata grazie ai composti fenolici presenti nel reagente del kit di rivelazione e captata su un film autoradiografico, sviluppato grazie ad un rivelatore.

3.C.4 Spettro di assorbimento differenziale del citocromo b₅₅₈

Questo metodo permette di identificare e quantificare il citocromo b₅₅₈ contenuto nell'estratto solubile di membrana dei neutrofili all'1% Triton X100 (cfr. § 3B). L'elemento in grado di assorbire la luce nei citocromi è il gruppo eme. Gli spettri di assorbimento del citocromo b₅₅₈ si ottengono utilizzando uno spettrofotometro (Beckam DU640). Lo spettro d'assorbimento della frazione ossidata (citocromo b₅₅₈ nativo) è misurato da 400 a 650 nm e memorizzato. Questa stessa frazione viene poi ridotta per aggiunta di qualche granello di ditionite di sodio, prima di effettuare una seconda lettura da 400 a 650 nm. Lo spettro differenziale redox, corrispondente

alla differenza di assorbimento tra la frazione ridotta e la frazione ossidata nativa, viene calcolato automaticamente.

Lo spettro differenziale di assorbimento è specifico per ogni citocromo: quello del citocromo b_{558} presenta due principali picchi d'assorbimento alle lunghezze d'onda di 426 e 558 nm (coefficienti di estinzione molare, $\epsilon_{426} = 106 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{558} = 21,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), e un debole picco a 530 nm.

La legge di Lambert-Beer, che stabilisce la correlazione tra l'assorbimento di un composto a un lunghezza d'onda definita e la sua concentrazione, permette di determinare la concentrazione del gruppo eme nel campione e, quindi, la concentrazione del citocromo b_{558} che contiene due molecole di eme. La quantità di citocromo b_{558} può quindi essere rapportata alla quantità totale di proteine di membrana (pmoli/mg).

Sono a volte visibili altri picchi di assorbimento, dovuti a dei contaminanti presenti nel campione, in particolare quello corrispondente alla mieloperossidasi (MPO) a 474 nm e a 641 nm, nonché quello dell'emoglobina a 430 nm.

3.D Valutazione dell'espressione e dell'attività NADPH-ossidasi

3.D.1 Citometria a flusso

La tecnica della citometria a flusso permette di effettuare la numerazione e l'analisi multiparametrica di particelle (generalmente cellule) in sospensione in un mezzo liquido. L'analisi viene svolta individualmente per ogni cellula in funzione dei parametri studiati, quali la fluorescenza prodotta dagli anticorpi coniugati ad un agente fluoroforo o la fluorescenza emessa direttamente da composti fluorescenti. La fluorescenza emessa viene letta mediante un citofluorimetro FACScaliburTM (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia o Sparcks, MD) e misurata grazie a dei fotomoltiplicatori specifici per una gamma di lunghezze d'onda: canali FL1 ($530 \pm 15 \text{ nm}$), FL2 ($585 \pm 21 \text{ nm}$), FL3 ($<650 \text{ nm}$) e FL4 ($>661 \text{ nm}$). Le popolazioni cellulari vengono dapprima selezionate in base ai parametri fisici *forward-scatter* (FSC) e *side-scatter* (SSC) indicativi, rispettivamente, delle dimensioni e della complessità delle particelle analizzate: la creazione di un *gate* elettronico (R) che circonda la nuvola di eventi corrispondente alla popolazione campione consente di analizzare le emissioni di fluorescenza delle cellule d'interesse, escludendo automaticamente eventuali fonti di interferenza quali

aggregati e detriti cellulari. Si analizzano quindi i traccianti fluorimetrici relativi alla regione selezionata, impiegando un amplificatore logaritmico. Per ogni campione si acquisiscono generalmente 10000 eventi (programma CellQuest, BD PharMingen) che vengono poi analizzati tramite il programma WinMDI 2.8.

3.D.1.1 Valutazione dell'espressione di Nox2

Materiali

Tampone di marcatura: PBS addizionato con 0.2% (p/v) di BSA e 1 mM CaCl₂

mAb 7D5, anti-gp91 phox

mAb IgG1

Anticorpo secondario: anticorpo anti IgG di topo, coniugato con la ficoeritrina (PE)

5×10^5 cellule, risospese nel tampone di marcatura, vengono incubate 30 minuti in ghiaccio in presenza di 0.5 μg di anticorpo primario 7D5 diretto specificatamente contro un epitopo esterno di Nox2 (Yamauchi et al., 2001). Allo scopo di valutare le interazioni non specifiche dell'anticorpo, un'aliquota di cellule viene incubata nelle stesse condizioni con 0.5 μg di anticorpo murino IgG1 irrilevante (controllo isotipico). Dopo una rapida centrifugazione di 10 secondi a $10000 \times g$, le cellule sono sottoposte a due lavaggi successivi in tampone di marcatura. L'anticorpo primario 7D5 è rivelato grazie ad un anticorpo secondario anti-IgG di topo, coniugato con l'agente fluoroforo ficoeritrina che fluoresce nel canale del rosso (FL2): a questo scopo, le cellule sono incubate 30 minuti in ghiaccio e al buio in presenza di 0.5 μg di anticorpo secondario (Stasia et al., 2003). Al termine dell'incubazione, le cellule subiscono 2 ulteriori lavaggi nel tampone di marcatura e vengono poi risospese in 500 μL dello stesso tampone. Le sospensioni cellulari sono conservate in ghiaccio fino al momento della lettura al citofluorimetro.

3.D.1.2 Misura della produzione di perossido di idrogeno (test di ossidazione della DHR)

Materiali

PBS

Bovine Serum Albumine, BSA, Sigma

Diidrorodamina 123 (DHR 123), Molecular Probes, Eugene, UR, USA

Azide, NaN_3 , Sigma

Forbol miristato acetato, PMA, Sigma

Difenileneiodonio, DPI, inibitore irreversibile della NADPH ossidasi, Sigma

BM16, mAb anti CD294 (CRTH2)

La produzione di perossido di idrogeno è misurata tramite il test di ossidazione della diidrorodamina 123 (DHR 123). In questo saggio, il composto non fluorescente DHR viene convertito a rodamina, che fluoresce nel verde (canale FL1), dal perossido di idrogeno prodotto dalle cellule attivate da PMA. I neutrofili sono marcati con la DHR (c.f. 2 μM) per 30 minuti a temperatura ambiente e al buio prima di aggiungere l'azide (c.f. 1 mM). Le cellule sono quindi preriscaldate mediante incubazione di 10 min a 37°C e poi stimolate per aggiunta di PMA (c.f. 20 ng/mL) per 15 min. La reazione è bloccata mediante diluizione in PBS freddo e le provette sono conservate in ghiaccio; i campioni vengono infine analizzati al citofluorimetro per la fluorescenza verde (FL-1).

Negli esperimenti in cui, accanto all'attività ossidativa, le cellule venivano testate per valutare l'espressione del marker degli eosinofili, CRTH2, i campioni sono ulteriormente incubati in presenza di 2.5 $\mu\text{g/mL}$ di mAb BM16 (anti CRTH2) per 30 minuti e sottoposti a due lavaggi successivi in PBS-BSA freddo, prima di essere analizzati al citofluorimetro.

3.D.1.3 Valutazione simultanea dell'espressione di Nox2 e dell'attività NADPH ossidativa

Materiali

Tampone di marcatura

mAb 7D5, anti-gp91 $phox$

DHR

Anticorpo secondario: F(ab')₂ anti-IgG di topo coniugato al fluorocromo Alexa Fluor® 633

S. aureus 502A opsonizzati con 10% siero alla concentrazione di 2.5×10^8 batteri/mL in PBS-ioni

DPI

Le cellule coltivate PLB-985 o i neutrofili umani isolati sono diluiti alla concentrazione di 5×10^6 cellule/mL nel tampone di marcatura. Dapprima viene effettuata la marcatura di Nox2 tramite il mAb 7D5 secondo il protocollo precedentemente descritto, utilizzando l'anticorpo secondario anti-IgG di topo legato alla sonda Alexa Fluor 633® F(ab')₂ che fluoresce nel canale

del rosso (FL4). Successivamente, allo scopo di valutare il metabolismo ossidativo, le stesse cellule vengono incubate per 30 minuti a 37°C al buio con la sonda DHR 123 (c.f. 0.5 µM), composto che diffonde liberamente nelle cellule localizzandosi, nei neutrofili, soprattutto a livello dei granuli. La specificità della produzione di derivati reattivi dell'ossigeno può essere verificata allestendo contemporaneamente alle altre, una prova in cui la sospensione di cellule è incubata in presenza di DPI (c.f. 5 µM), e che subirà i medesimi trattamenti delle altre prove.

Dopo l'aggiunta dei microorganismi opsonizzati (rapporto cellula:batteri = 1:50), le sospensioni cellulari sono incubate per 15 minuti a 37°C. Al termine dell'incubazione, la reazione è bloccata diluendo i campioni in PBS freddo; le sospensioni sono quindi conservate in ghiaccio fino al momento della lettura al citofluorimetro. In seguito all'attivazione metabolica, gli intermedi reattivi dell'ossigeno prodotti, in particolare l'H₂O₂, ossidano la sonda DHR 123 trasformandola nel composto rodamina 123 (Rho 123) che fluoresce nel verde (FL1) se eccitato a 488 nm.

I campioni vengono infine analizzati al citofluorimetro per la fluorescenza verde (FL1, 530 ± 30 nm) e per quella rossa (FL4, 648 ± 13 nm); l'utilizzo di questi due fluorocromi (la DHR 123 e l'Alexa Fluor[®] 633), caratterizzati da spettri di emissione separati permette di evitare la necessità di compensare i segnali di fluorescenza provenienti dalle due sonde.

Le cellule che esprimono la proteina gp91*phox* e metabolicamente attive risulteranno positive per entrambe le marcature (mAb 7D5 e DHR 123).

3.D.1.4 Valutazione dell'espressione di Nox2 in neutrofili ed eosinofili

Materiali

Tampone HEPES

mAb 7D5, anti gp91*phox*

Anticorpo irrilevante IgG1

Anticorpo secondario: F(ab')₂ anti-IgG di topo coniugato con la sonda Alexa Fluor[®] 488, Invitrogen

BM16, mAb anti CRTH2

I granulociti, diluiti a 10⁷ cellule/mL in tampone HEPES, vengono incubati con 0.5 µg di anticorpo monoclonale 7D5 o con 0.5 µg di anticorpo irrilevante IgG1 per 30 minuti in ghiaccio, come descritto in precedenza. Al termine dell'incubazione, le cellule sono sottoposte a due lavaggi successivi in tampone HEPES, per essere poi nuovamente incubate per 30 minuti in

ghiaccio in presenza di 0.25 µg dell'anticorpo secondario coniugato al fluorocromo Alexa Fluor[®] 488, che fluoresce nel canale del verde (FL1). Dopo 2 ulteriori lavaggi in tampone HEPES, le cellule vengono incubate con 2.5 µg/mL di anticorpo anti CRTH2 che fluoresce nel rosso (FL4). Dopo un ulteriore lavaggio in tampone HEPES, la fluorescenza emessa nei canali del verde (FL1) e del rosso (FL4) viene analizzata mediante un'acquisizione di 100000 eventi. (Anche in questo caso, l'utilizzo di questi due fluorocromi caratterizzati da due spettri di emissione non sovrapposti permette di evitare la necessità di effettuare una compensazione dei segnali).

Questo tipo di analisi citofluorimetrica a “doppia marcatura” permette di distinguere tra le cellule esprimenti la proteina gp91*phox* (e quindi positive solamente per la fluorescenza verde: 7D5 in FL1), la popolazione degli eosinofili, che risulta positiva anche per la fluorescenza rossa (BM16 in FL4).

3.D.2 Test del Nitroblu di Tetrazolio (NBT)

Materiali

Tampone HEPES

Na₄EDTA

NBT, Nitroblu di Tetrazolio, Roche

PMA

DPI

Questo saggio, che rappresenta la metodica preferenziale per la diagnosi della malattia granulomatosa cronica, permette di valutare l'attivazione del complesso NADPH ossidasi dei leucociti polimorfonucleati neutrofili. Il nitroblu di tetrazolio, di colore giallo e insolubile, in presenza degli anioni superossido prodotti dai neutrofili attivati, viene ridotto a formazano che forma sui fagociti dei precipitati di colore blu-viola.

I neutrofili, isolati come descritto in precedenza, vengono diluiti alla concentrazione di 0.2×10^6 cellule/mL in tampone HEPES contenente 1 mM EDTA, in modo da prevenire eventuali aggregazioni cellulari, e 1 mM NBT. La reazione è avviata per aggiunta di 100 ng/mL di PMA; dopo un'incubazione di 15 minuti alla temperatura di 37°C, aliquote delle sospensioni sono prelevate per realizzare dei cytospin, successivamente fissati in metanolo e colorati con una soluzione di safranina allo 0.4% in etanolo al 25%. Il DPI (c.f.: 5 µM) viene aggiunto alla

miscela di incubazione nelle prove che si vogliono utilizzare come controllo negativo della reazione.

3.D.3 Misura della chemiluminescenza

Materiali

Perossidasi (HRP, Horse Radish Peroxidase), Sigma

Luminolo, 5-ammino-2,3-diidro-1,4-ftalazindione, Sigma

Glucosio, Sigma

Mezzo di reazione: PBS addizionato con 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 20 mM glucosio, 20 μM luminolo e 10 U/mL di HRP

PMA

fMLF, formyl-methionyl-leucyl phenylalanine

Microorganismi: *S. aureus* 502A e *C. albicans*, opsonizzati con 10% pool di sieri umani

Micropiastre da 96 pozzetti, Costar®

La tecnica della chemiluminescenza consente di misurare l'attività NADPH ossidasica di cellule intere (Dahlgren e Karlsson, 1999). Si tratta di una metodica basata sul principio della dissipazione di energia per emissione luminosa di un composto che passa dallo stato eccitato al suo stato di riposo iniziale. La reazione di chemiluminescenza applicata consiste nella reazione di ossidazione del luminolo catalizzata dalla mieloperossidasi dei neutrofili attivati, in presenza di H₂O₂ (derivata dalla dismutazione dell'anione superossido prodotto dalla NADPH ossidasi). Il ritorno del luminolo al suo stato fondamentale è accompagnato da un'emissione luminosa che è direttamente proporzionale all'attività NADPH ossidasica delle cellule e che viene quantificata grazie ad un luminometro (Luminoscan® Labssystem, Helsinki, Finlandia).

Il saggio viene effettuato su micropiastre da 96 pozzetti, depositando $0.5 - 1 \times 10^6$ cellule per pozzetto, sospese in 50 μL di PBS. Alle cellule vengono aggiunti 200 μL di mezzo di reazione, e la piastra viene quindi incubata nel luminometro 1 minuto a 37°C, prima dell'aggiunta di PMA (c.f. 80 ng/mL) o di fMLF (c.f. 4×10^{-7} M). Nelle prove che prevedono l'uso di stimoli particolari, alle cellule depositate nel pozzetto vengono aggiunti 50 μL della sospensione di microorganismi precedentemente opsonizzati a 50×10^8 /mL (batteri) o 1.8×10^8 /mL (funghi) in PBS-ioni, in modo da ottenere un rapporto cellule:batteri di 1:100 e cellule:candide di 1:30. L'emissione luminosa relativa viene registrata a 37°C per un periodo di 15 minuti con una

lettura ogni 15 secondi (fMLF), o per 30 minuti con una lettura ogni 30 secondi (microorganismi) o, infine, per 60 minuti con una lettura ogni 30 secondi (PMA). Le misure sono espresse in unità relative di luminescenza (RLU).

3.D.4 Misura della produzione di anione superossido

Materiali

Tampone HEPES-ioni

Citocromo *c*, di tipo VI da cuore di cavallo (Sigma) (c.f.: 80 μM)

Superossido dismutasi, SOD, Roche (c.f.: 50 $\mu\text{g/mL}$)

PMA

DPI

I neutrofili, isolati secondo la procedura descritta in precedenza (§ 3.A.1b), vengono risospesi alla concentrazione di 1.5×10^6 cellule/mL in tampone HEPES-ioni; aliquote di 50 μL di queste sospensioni sono depositate in pozzetti contenenti 50 μL di citocromo *c*. Dopo una preincubazione di 10 minuti a 37°C in presenza, ove richiesto, di DPI (c.f. 5 μM), si procede con l'aggiunta del PMA (c.f. 20 ng/mL). Le cellule sono quindi incubate per 30 minuti a 37°C nel lettore per micropiastre (Multiskan MCC/340, Labsystem Oy, Helsinki, Finlandia) per la lettura della densità ottica alle lunghezze d'onda di 540 e 550 nm. La quantità di citocromo *c* ridotto dall'anione superossido (O_2^-) è direttamente proporzionale alla differenza tra i valori di assorbanza letti a 550 nm (lunghezza d'onda del picco di assorbimento del citocromo *c* ridotto) e quelli letti a 540 nm (lunghezza d'onda del punto isosbestico degli spettri di assorbimento del citocromo *c* ridotto e ossidato). Poiché la riduzione del citocromo *c* da parte dell' O_2^- è inibita dalla SOD, che catalizza la dismutazione del superossido ad H_2O_2 , questo enzima è stato utilizzato per verificare la specificità della reazione.

3.E Metodiche di biologia molecolare

3.E.1 Reazione polimerasica a catena (PCR)

Materiali

Tampone di reazione: Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 0.1% Triton X100, 0.2% BSA; Qbiogene, MP Biomedicals Europe, France.

Primers senso e antisenso, 40 μM

mix di desossiribonucleotidi, dNTP, 5 mM; Qbiogene

Taq polimerasi (polimerasi del battere *Thermophilus Aquaticus*) a 5 U/μL; Qbiogene.

La tecnica di sintesi del DNA per amplificazione a catena ad opera della polimerasi permette di ottenere quantità apprezzabili di una determinata sequenza scarsamente rappresentata nel campione. Il principio è il seguente: dopo denaturazione ad opera del calore del doppio filamento di DNA, due oligonucleotidi complementari, situati alle estremità 5' della doppia elica di DNA da amplificare, si ibridano con il frammento di DNA da amplificare ad una specifica temperatura, detta temperatura di fusione (T_f), inferiore di 5°C (nel caso della Taq polimerasi) rispetto alla temperatura di ibridazione (T_i). La temperatura di ibridazione è funzione della sequenza nucleotidica delle sonde. In pratica, per determinare la T_i si applica la formula seguente:

$$T_i (^{\circ}\text{C}) = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

$$T_f (^{\circ}\text{C}) = T_i - 5^{\circ}\text{C}$$

Dopo la fase di ibridazione, la temperatura è portata al valore di 72°C: in queste condizioni le estremità degli oligonucleotidi servono da sonde ad una DNA polimerasi termostabile. Ogni filamento servirà quindi da matrice all'enzima che sintetizza i filamenti complementari assemblando i desossiribonucleotidi complementari (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), con un fattore di moltiplicazione pari a 2. I prodotti ottenuti da questo primo ciclo sono in seguito denaturati dal calore a 94°C, allo scopo di separare la doppia elica. Le sonde si ibridano ancora una volta alla temperatura T_i con i filamenti di DNA provenienti dal primo ciclo di amplificazione, cosicché ogni filamento serve da matrice alla DNA polimerasi. Con il prosieguo della reazione, il numero di copie di DNA cresce esponenzialmente permettendo di ottenere 2ⁿ frammenti dopo n cicli. La reazione di PCR è realizzata in un volume finale di 100 μL di tampone di reazione

contenente 2 μL di cDNA, 0.7 μL di primers senso e antisenso, 4 μL di mix di dNTP e 0.5 μL di Taq polimerasi. Infine, 40 μL di olio minerale sono depositati sulla superficie della soluzione allo scopo di evitare un'eventuale evaporazione durante la reazione.

3.E.2 Preparazione e dosaggio degli acidi nucleici

3.E.2.1 Preparazione degli RNA totali

Materiali

PBS

Trizol®, GIBCO-BRL

Cloroformio, Prolabo

Isopropanolo, Prolabo

Etanolo al 70%, Prolabo.

Gli RNA totali possono essere ricavati a partire dalle cellule mononucleate o dai linfociti B trasformati con l'EBV. (cfr. § 3.A.5).

10^8 cellule sono lavate in PBS e rimesse in sospensione in 1 mL di Trizol®. Questa soluzione contiene 50% di fenolo e un agente dissociante, il tiocianato di guanadina, che distrugge le strutture cellulari e inattiva le RNasi endogene. Le cellule vengono quindi incubate per 5-10 minuti a temperatura ambiente, prima dell'aggiunta di 0,2 mL di cloroformio. Dopo agitazione e incubazione di 2-3 minuti a temperatura ambiente, le cellule vengono centrifugate a $12000 \times g$ per 15 minuti a 4°C : al termine della centrifugazione, gli RNA totali si ritrovano nella fase acquosa superiore. Questa fase viene quindi delicatamente recuperata e trasferita in una provetta sterile; la successiva aggiunta di 0,5 mL di isopropanolo e l'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente permettono di ottenere un precipitato contenente gli RNA totali. Dopo una centrifugazione di 10 minuti a $12000 \times g$ alla temperatura di 4°C , il pellet è lavato con 1 mL di etanolo al 70% (v/v), lasciato asciugare, e infine rimesso in sospensione in un volume di 30-50 μL di acqua distillata sterile. Gli RNA così ottenuti possono essere conservati a -20°C in etanolo 70% per un mese, o a -80°C per un anno.

3.E.2.2 Preparazione del DNA complementare (cDNA) di *gp91phox*, amplificazione e sequenziamento

Materiali

Tampone d'ibridazione: Tampone Tris 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM; Qbiogene

Mix dNTP, miscela di desossiribonucleotidi, 5 mM; Qbiogene

AMV-RT, Trascrittasi Inversa di AMV, enzima del retrovirus della mieloblastosi aviaria, Qbiogene

RNasi inibitore, Qbiogene

Sonde oligonucleotidiche poly(dT)₁₅

Markers VI, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA

La sintesi del DNA complementare (cDNA) di *gp91phox* viene effettuata a partire da 5 µg di RNA totali (ottenuti secondo la procedura descritta nel paragrafo precedente) in un volume finale di 20 µL di tampone d'ibridazione addizionato con 4 µL di Mix dNTP, 20 unità di Trascrittasi Inversa di AMV, 50 unità di inibitore delle RNasi e 2 µL di sonde poly(dT)₁₅. Dopo 10 minuti di ibridazione delle sonde con la sequenza terminale polyA degli RNA messaggeri (mRNA) a 25°C, gli mRNA sono trascritti in cDNA a un solo filamento ad opera dell'AMV-RT, per 1 ora a 42°C. Questa reazione è arrestata denaturando l'enzima per 5 minuti a 99°C e i cDNA ottenuti sono immediatamente amplificati tramite PCR in 3 frammenti sovrapposti (Stasia et al. 2002).

A reazione completata, aliquote di 10 µL dei prodotti ottenuti dalla PCR in una soluzione contenente blu di bromofenolo sono depositati nei pozzetti di un gel di agarosio 1.5% (p/v) contenente 1 µg/mL di etidio bromuro. Parallelamente, vengono depositati anche 10 µL di markers VI e la migrazione elettroforetica è condotta per 45 minuti a 100V. I risultati sono infine visualizzati tramite un transilluminatore UV (Vilber Lourmat, Biolabo Scientific Instruments, Archamps, Francia).

Tutti i prodotti ottenuti dalla PCR sono sequenziati dalla ditta Cogenics (Meylan, Francia) utilizzando un sequenziatore automatico Abi Prism (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). Per ogni paziente, l'intera regione codificante del gene *CYBB* è stata sequenziata.

3.E.2.3 Dosaggio degli Acidi Nucleici

4 μL della soluzione di RNA o μL della soluzione di DNA sono diluiti in 1 mL di acqua distillata sterile, e la densità ottica è letta tra 240 e 340 nm. I valori di densità ottica letti a 260 nm corrispondono agli acidi nucleici, quelli letti a 280 nm alle proteine e quelli letti a 310 nm ai peptidi.

Per calcolare la quantità di DNA o di RNA viene applicata la seguente formula:

$$\text{D.O. } 260 \text{ nm} = 1 \text{ per [RNA]} = 40 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{D.O. } 260 \text{ nm} = 1 \text{ per [DNA]} = 50 \mu\text{g/mL}$$

3.E.2.4 Amplificazione del DNA genomico

Il DNA genomico purificato è amplificato utilizzando i primers P1 e P2* (cfr tabella sottostante). I prodotti ottenuti dalla PCR sono successivamente sequenziati dalla ditta Cogenics (Meylan, Francia).

| Gene | Primers | Sequenza | Posizione |
|------|---------|-------------------------|-----------|
| CYBB | P1 | CAGCAAGGCTATGAATGCTGTTC | - 427 |
| | P2* | GGAGAGCCCCTCATTACAG | + 45 |

*Primers anti-senso.

3.E.2.5 PCR semiquantitativa

La miscela di reazione contenente:

10 μL di mix di incubazione QBiogene (Illkirch, Francia)

0.2 mM Mg^{2+}

0.25 μM dNTP; Qbiogene

0.25 μM primers 1 e 2* (per gp91*phox*), 3 e 4* (per la β -actina), cfr tabella sottostante.

25 mU/ μL Taq DNA polimerasi (QBiogene)

Acqua distillata sterile q.b. a 100 μL

viene sottoposta ad amplificazione in un termociclatore Minicycler™ (MJResearch, St Bruno, Canada) secondo queste condizioni:

1 ciclo a 95°C per 5 minuti;

25 cicli a 95°C per 1 minuto, a 57°C per 1 minuto e a 72°C per 90 secondi

1 ciclo a 72°C per 7 minuti

A reazione completata, aliquote di 10 µL dei prodotti ottenuti dalla PCR in una soluzione contenente blu di bromofenolo sono depositati nei pozzetti di un gel di agarosio 1.5% (p/v) contenente 1 µg/mL di etidio bromuro. Parallelamente, vengono depositati anche 10 µL di markers XIV (Roche, Meylan, France) e la migrazione elettroforetica è condotta per 45 minuti a 100V. I risultati sono infine visualizzati tramite un transilluminatore UV.

| Gene | Primers | Sequenza | Posizione |
|------------------|---------|----------------------------------|-----------|
| gp91 <i>phox</i> | 1 | CCTCTGCCACCATGGGGAAC | 294 |
| | 2* | GACTTCAAAGTAAGACCTCCGGATG | 1131 |
| β-actina | 3 | ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG | 2 |
| | 4* | CGTCATACTCCTGCTTGCTGTCCACATCTGC | 624 |

*Primers anti-senso.

3.E.3 Estrazione del DNA plasmidico e digestione dell'inserto con enzimi di restrizione BamH1

La sostituzione della seconda ansa intracellulare (o *loop D*) di Nox2 con quella dell'omologo Nox4 viene effettuata nelle cellule PLB-985 X-CGD per mutagenesi direzionale (Li et al., 2005). La mutazione é introdotta nel cDNA nativo di Nox2 utilizzando il vettore pBlueScriptKS+ ; la sequenza mutata viene poi clonata nel vettore di espressione mammifero pEF-PGKneo attraverso cui si esegue la trasformazione dei batteri competenti JM109 (Promega). I batteri così trasformati sono conservati a -80°C fino a successivo utilizzo.

Un'aliquota di batteri JM109 conservata a -80°C, dopo scongelamento, é fatta crescere over night in circa 2 mL di terreno LB addizionato di ampicillina, in un bagno termostato a 37°C. A partire da questa precoltura batterica, l'estrazione del DNA plasmidico é realizzata utilizzando il kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), secondo le istruzioni indicate. La concentrazione del DNA

della preparazione ottenuta viene determinata tramite lettura spettrofotometrica della densità ottica alla lunghezza d'onda di 260 nm. Un'aliquota di questa preparazione, corrispondente circa a 5 µg di DNA plasmidico, è sottoposta a digestione da parte dell'enzima di restrizione BamH1 (15U) per 1 ora a 37°C.

La successiva migrazione su gel di agarosio 1% permette di rivelare la presenza di 2 bande, una a 1700 pb corrispondente al DNA di Nox2 e l'altra a 2900 pb corrispondente al plasmide pBlueScriptKS+ (Figura 10).

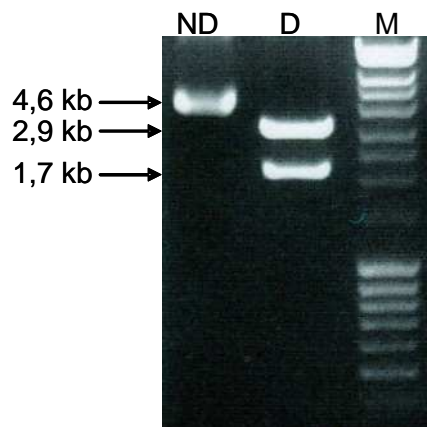


Figura 10 : Digestione enzimatica da parte dell'enzima di restrizione BamH1 del plasmide pBlueScriptKS+ contenente il cDNA di Nox2. Il prodotto digerito dall'enzima di restrizione (D) mostra 2 bande a 2,9 kb e 1,7 kb; ND (il controllo non digerito) presenta invece un'unica banda a 4,6 kb.

3.E.4 Transfezione stabile dei plasmidi pEF-PGKneo nella linea cellulare PLB-985 X-CGD

Materiali

Endofree Plasmid Maxi Kit, Qiagen

PBS sterile

Tampone di transfezione: RPMI 1640, 2.72 M saccarosio, 7 mM NaHPO₄, pH 7.4

Medium di coltura: RPMI 1640, 20% SBF, 2 mM glutammina, 100 U/mL penicillina, 100 U/mL streptomina.

Per realizzare la transfezione nelle cellule eucariote, la qualità del DNA plasmidico costituisce un fattore cruciale: esso deve essere cioè privo di qualsiasi contaminazione da parte di tossine batteriche. A questo scopo, il DNA plasmidico è purificato utilizzando il "Endofree Plasmid

Maxi Kit” (Qiagen), secondo le indicazioni riportate dal fornitore. In generale, questa operazione permette di ottenere da 300 a 800 µg di DNA purificato.

Per la transfezione, 5×10^6 cellule PLB-985 X-CGD vengono lavate in 1 mL di PBS sterile, riprese in 500 µL di tampone di transfezione ghiacciato e quindi incubate per 5 minuti in una cuvetta da elettroforesi sterile di 4 mm (Molecular BioProducts) in presenza di 20 µg di DNA plasmidico. La transfezione viene realizzata per elettroporazione a 250 V per 20 millisecondi (ECM 830 Electro Square Porator, BTX Genetronics). Le cellule transfettate sono quindi trasferite in una flask di 75 cm² contenente 20 mL di medium di coltura e incubate per 48 ore a 37°C in presenza di 5% di CO₂. La flask é incubata in posizione verticale per migliorare la proliferazione cellulare. Dopo 48 ore di incubazione in queste condizioni, vengono aggiunti 80 mL di medium di coltura addizionato di 1,5 mg/mL di geneticina. Questo volume totale viene quindi suddiviso in 3 piastre da 24 pozzetti, depositando 1 mL per pozzetto, e 1 piastra da 48 pozzetti, depositando 0,5 mL per pozzetto.

Le piastre sono in seguito incubate per un periodo di 15-21 giorni a 37°C in un’atmosfera di 5% di CO₂. I cloni positivi vengono visualizzati grazie al cambiamento di colore del medium di coltura (dal rosa al giallo), segno di attività metabolica dovuta alla proliferazione cellulare. Questi cloni sono coltivati in medium RPMI completo (addizionato con 1,5 mg/mL di geneticina). Il livello di espressione della proteina Nox2 é valutato tramite citometria a flusso (cfr. § 3.D.1.1). Circa 30 cloni sono testati in media per ottenere dei cloni che esprimono la proteina Nox2 in modo omogeneo e a un livello paragonabile alle cellule PLB-985 WT-Nox2 transfettate (la linea di controllo, contenente il cDNA di Nox2 nativo).

3.F Valutazione dell’attività microbica mediante conta delle unità formanti colonie

Materiali

PBS-ioni

Acqua distillata sterile

Soluzione di NaOH 1M in acqua distillata sterile

SABOURAUD-AGAR: terreno Sabouraud contenente Agar (Bacto™ Agar, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) all’ 1%

LB-AGAR: terreno LB contenente Agar all’ 1%

S. aureus*, *C. albicans* ed *E. coli opsonizzati con 10% pool di sieri umani (cfr § 3.A.6-7)

L'attività microbica è valutata secondo il metodo recentemente descritto (Decleva et al., 2006). In breve, i neutrofili o le cellule PLB-985, diluiti a 5×10^6 /mL in tampone PBS-ioni, vengono incubati a 37°C con una sospensione di *S. aureus*, *E. coli* o *C. albicans* precedentemente opsonizzati, alla concentrazione necessaria per ottenere i valori di MOI (multiplicity of infection) desiderati.

Contemporaneamente si allestisce una prova in cui la sospensione di batteri o di blastospore è incubata in assenza di cellule, e che subirà i medesimi trattamenti delle prove relative alla misura dell'attività microbica; in questo modo è possibile avere una stima dell'andamento della crescita dei microorganismi durante il corso del saggio.

In alcuni esperimenti i neutrofili venivano preincubati per 10 min a 37°C in presenza o in assenza di KCN 1 mM, DPI 5 µM, bafilomicina 10 nM, 5-(N,N-esametilene)amiloride, HMA, 2,5 µM, Iberiotossina (IbTX) 100 nM, Paxillina (Pax) 300 nM, acido salicilidrossamico (SHAM) 100 µM, tetraetilammonio cloruro (TEA) 10 mM, NS1619 30 µM. In altri esperimenti, le cellule venivano sottoposte ad una preincubazione di 30 min a 37°C in presenza o in assenza di metilammina 10 mM, NH₄Cl 10 mM, Metionina 10 mM, Taurina 10 mM. Per i saggi che prevedevano l'uso di glutatione (GSH) e glutatione perossidasi (GSHPO), questi venivano aggiunti alle cellule immediatamente prima dei microorganismi alla concentrazione, rispettivamente di 1 mM e 2 U/mL; negli esperimenti con la Glucosio Ossidasi (GO), questa veniva aggiunta alla concentrazione finale di 1 U/mL subito prima dei microorganismi. Agli intervalli di tempo prestabiliti, un'aliquota della sospensione cellule-microorganismi veniva prelevata e immediatamente diluita 50 volte in acqua il cui pH è portato a 11 per aggiunta di NaOH 1M. Dopo 5 minuti a temperatura ambiente, i campioni erano agitati vigorosamente e diluiti in un appropriato volume di soluzione fisiologica 0.9% e seminati in piastra Petri. Dopo un'incubazione over night a 37°C si procedeva con la conta delle unità formanti colonie (CFU), e la percentuale di uccisione (killing) era calcolata rispetto al numero di CFU corrispondenti al tempo zero di fagocitosi.

3.G Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

3.G.1 Preparazione degli estratti nucleari

Gli estratti nucleari sono stati preparati a partire da cellule PLB-985 utilizzando i reattivi del kit Pierce “NE-PER nuclear extraction” (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), seguendo la procedura descritta. Negli estratti così ottenuti, prima della conservazione a -80°C veniva misurata la concentrazione proteica mediante il metodo dell’acido bicinconinico (cfr. § 3.C.1b).

3.G.2 Preparazione degli oligonucleotidi marcati

Gli oligonucleotidi utilizzati come competitori a doppia elica e come sonde sono i seguenti:

| Oligonucleotide | Posizione | Sequenza |
|--------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------|
| WT (X91 WT) | da -68 a -30 bp | 5'-CTATGCTTCTTCTTCCAATGAGG <u>AAA</u> TGAAAACAGCAG-3' |
| X91⁻ CGD (X91 mutato) | da -68 a -30 bp | 5'-CTATGCTTCTTCTTCCAATGAGG <u>AAA</u> TGAAAACAGCAG-3' |

La marcatura degli oligonucleotidi è eseguita in accordo con la procedura descritta dal “Biotin 3’ End DNA Labeling Kit” (Thermo Fisher Scientific Inc.): 1-3 nucleotidi biotinilati vengono così incorporati all’estremità 3’ dei filamenti di DNA; questa localizzazione consente di ridurre il rischio di interferenza con l’ibridazione o con il legame di proteine sequenza-specifici. Gli oligonucleotidi marcati così ottenuti vengono ibridati e conservati a - 20°C fino al loro utilizzo.

3.G.3 Saggio EMSA [LightShift™ Chemiluminescent EMSA kit]

Materiali

Tampone di reazione: 10 mM Tris, 50 mM KCl, 1 mM DTT; pH 7.5

Estratto nucleare di cellule PLB-985

Tampone di elettroforesi: Tris-Borato-EDTA 0.5×, contenente 45 mM Tris, 45 mM Acido Borico, 1 mM EDTA; pH 8.3

Membrana di nylon HybondTM-N⁺ (Amersham, GE Healthcare, Munich, Germania)

Si tratta di una metodica che permette di studiare le interazioni DNA-proteine; la tecnica è basata sul principio che i complessi DNA-proteine migrano più lentamente rispetto al DNA non legato in un gel di poliacrilammide, risultando in una variazione della migrazione del DNA marcato.

Il saggio viene eseguito in un volume totale di 20 µL di tampone di reazione contenente, ove richiesto, 10 µg di estratto nucleare ottenuto dalle cellule PLB-985 (cfr. § 3.G.1). Gli estratti nucleari vengono preincubati 15 minuti in ghiaccio in presenza, ove richiesto, di 20, 50, o 100 nM di oligonucleotidi ibridati complementari non marcati. Dopo l'aggiunta di 1 nM di oligonucleotidi ibridati marcati alla biotina, l'incubazione è proseguita per ulteriori 30 minuti, in ghiaccio. I campioni sono poi sottoposti a elettroforesi a 100V per 2 ore su un gel al 5% di poliacrilammide nel tampone di elettroforesi, e successivamente trasferiti su una membrana di Nylon HybondTM-N⁺. Dopo il trasferimento, la membrana è immediatamente sottoposta a cross-link per 45-60 secondi a 120 mJ/cm² utilizzando un cross-linker a lampada UV equipaggiato di bulbi di 254 nm. Il DNA marcato alla biotina è rivelato per chemiluminescenza mediata dal coniugato perossidasi-streptavidina e da un substrato chemiluminescente (luminolo). Le membrane sono infine esposte ad un film per Raggi X per un periodo di 15 minuti prima di essere sviluppate.

3.H Saggio di degranulazione***Materiali*****PBS**

Citocalasina B, preparata alla concentrazione di 0.5 mg/mL in DMSO

fMLF

Cocktail di inibitori di proteasi, Complete EDTA-free protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics, Germany.

Metodo [da Dewald e Baggiolini, 1984]

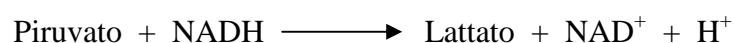
I neutrofili e le cellule PLB-985 sono risospesi in 900 µL di PBS alla concentrazione di 2×10^8 /mL e preincubati 10 minuti alla temperatura di 37°C in presenza, ove richiesto, di citocalasina B (c.f. 5 µg/mL), composto in grado di depolimerizzare i filamenti di actina, che

permette quindi di aumentare il rilascio granulare in cellule stimulate. L'esocitosi viene stimolata mediante l'aggiunta di 10 μL di fMLF (c.f. 10^{-7} M). Dopo un'incubazione di 15 minuti a 37°C , la reazione è arrestata ponendo le provette in ghiaccio per 5 minuti, prima di procedere ad una centrifugazione a $800 \times g$ di 10 minuti alla temperatura di 4°C . Il surnatante recuperato al termine della centrifugazione viene aliquotato e conservato a -20°C per essere utilizzato nei successivi dosaggi enzimatici. Il pellet viene risospeso in 1 mL di PBS contenente 0.2% di Triton X100 e incubato per 20 minuti in ghiaccio, agitando vigorosamente la provetta ogni 5 minuti. La sospensione viene poi centrifugata per 10 minuti a $1500 \times g$ alla temperatura di 4°C , prima di essere aliquotata e congelata a -20°C . Un'aliquota contenente il surnatante di esocitosi e una contenente il pellet vengono immediatamente utilizzate per il dosaggio della lattato deidrogenasi (cfr § 3.H.1), enzima rapidamente inattivato. Una seconda aliquota di surnatante e di pellet, destinate al dosaggio della gelatinasi, vengono addizionate con il cocktail di inibitori di proteasi prima di essere congelate come le altre aliquote.

3.H.1 Dosaggio della lattato deidrogenasi (LDH)

Nell'effettuare gli esperimenti di degranolazione, è importante assicurarsi che l'esocitosi si verifichi senza danno per le cellule: la degranolazione non deve cioè essere accompagnata da una perdita dei componenti citosolici. Il rilascio di un enzima citosolico ubiquitario quale la lattato deidrogenasi è il parametro più comunemente utilizzato per valutare la vitalità cellulare, tenendo conto del fatto che in condizioni normali, si assiste ad un lieve rilascio di LDH (Dewald et Baggiolini, 1986).

La presenza della lattato deidrogenasi nel fluido extracellulare è quindi un indicatore di morte cellulare o di perdita dell'integrità della cellula: il rilascio di LDH ritrovata nei surnatanti di esocitosi è proporzionale al danno cellulare. Questo test, che risulta quindi più sensibile rispetto al test di esclusione del trypan blu per valutare la vitalità cellulare, permette di dosare la LDH utilizzando una procedura spettrofotometrica automatizzata che misura l'ossidazione, catalizzata dalla lattato deidrogenasi, del NADH in NAD, in presenza di piruvato:



Il dosaggio della LDH è eseguito nel laboratorio di enzimologia dell'ospedale di Grenoble, utilizzando l'apparecchio HITACHI 911.

3.H.2 Dosaggio delle mieloperossidasi (MPO)

Materiali

Tampone citrato 0.1 M; pH 5.5

Substrato: o-dianisidina 0.1% in etanolo

Perossido di idrogeno, H₂O₂, 1 mM

acido perclorico al 35%, soluzione di blocco della reazione

Metodo [da Dewald e Baggiolini, 1984]

Il rilascio della mieloperossidasi, enzima marker dei granuli azurrofilari, viene valutato mediante un saggio colorimetrico quantitativo che misura l'ossidazione di un substrato (l'o-dianisidina) ad opera della MPO in presenza di H₂O₂. Si procede allestendo una provetta contenente 10 volumi di tampone citrato, 1 volume di substrato e 1 volume di perossido di idrogeno; 200 µL di questa soluzione vengono ripartiti in provette di tipo Eppendorf e addizionati con 50 µL della frazione enzimatica da testare (surnatante e pellet ottenuti dal saggio di esocitosi).

Le provette vengono incubate 1-5 minuti a temperatura ambiente, e la reazione viene bloccata per aggiunta di 200 µL di acido perclorico. Un'aliquota di 200 µL di ogni soluzione viene depositata nel pozzetto di una micropiastrella e la lettura è effettuata in un lettore per micropiastre alla lunghezza d'onda di 560 nm. Il valore ottenuto è una densità ottica, direttamente proporzionale alla quantità di mieloperossidasi rilasciata dalle cellule [$\epsilon_{\text{o-dianisidina}(550\text{nm})} = 11.3 \text{ mM/cm}$].

3.H.3 Dosaggio dell'elastasi

Materiali

Tampone di reazione: 0.1 M HEPES, 0.5 M NaCl, 10% DMSO; pH 7.5

Substrato: MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC, Elastase Substrate V, Fluorogenico, Calbiochem; preparato alla concentrazione di 5 mg/mL in DMSO

Standard: Elastasi porcina preparata a 1 mg/mL nel tampone di reazione e poi diluita 10×.

Metodo [da Nakajima et al., 1979]

Il rilascio di elastasi, enzima marker dei granuli azurrofilari, è valutato mediante un saggio fluorimetrico quantitativo effettuato in micropiastrella. Si procede depositando nei pozzetti 185 µL

di tampone di reazione, 40 μL della frazione enzimatica da testare e 25 μL di substrato; la piastra viene quindi incubata per 30 minuti a temperatura ambiente per permettere lo sviluppo della reazione. La fluorescenza prodotta viene infine letta da un fluorimetro per micropiastre ($\lambda_{\text{ecc}} = 380 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$); i valori così ottenuti sono confrontati con una curva di taratura ottenuta a partire da quantità note di elastasi; per estrapolazione è quindi possibile risalire alla concentrazione di enzima contenuto nei campioni.

3.H.4 Dosaggio della Catepsina G

Materiali

Tampone di reazione: 0.1 M HEPES, 0.5 M NaCl, 10% DMSO; pH 7.5

Substrato: MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Met-*p*NA, Cathepsin G Substrate II, Colorimetrico, Calbiochem; preparato alla concentrazione di 8 mM in DMSO.

Metodo [da Nakajima et al., 1979]

Il rilascio di Catepsina G, enzima marker dei granuli azzurrofilari è valutato tramite un saggio colorimetrico quantitativo, condotto in piastra. Si procede depositando nei pozzetti 185 μL di tampone di reazione, 40 μL della frazione enzimatica da testare e 25 μL di substrato. La piastra viene quindi incubata 60 minuti a temperatura ambiente, in agitazione, prima di procedere alla lettura della densità ottica in un spettrofotometro per micropiastre. L'assorbanza letta alla lunghezza d'onda di 410 nm risulta direttamente proporzionale alla concentrazione di enzima presente nel campione ($\epsilon_{410\text{nm}} = 8800 \text{ L} \times \text{moli}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

3.H.5 Dosaggio della β -glucuronidasi

Materiali

Tampone acetato 0.1 M; pH 4

Tampone glicina 50 mM, EDTA 5 mM; pH 10.4

Substrato: 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide 10 mM in tampone acetato 0.1% Triton X100

Standard: 4-metilumbelliferone 5 mM in etanolo.

Metodo (da Dewald et Baggiolini, 1986)

Il rilascio di β -glucuronidasi, enzima marker dei granuli azurrofilari, è valutato utilizzando un saggio fluorimetrico quantitativo. La β -glucuronidasi catalizza infatti la reazione di idrolisi a pH acido del 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide in β ,D-glucuronide e 4 metilumbelliferone (4-MU). Quest'ultimo prodotto in ambiente alcalino è fluorescente. L'intensità della fluorescenza, confrontata con la retta di taratura precedentemente realizzata a partire da concentrazioni note dello standard, fornisce la quantità di 4-MU prodotto, e di conseguenza, la quantità di enzima rilasciato (stechiometria della reazione: 1 a 1).

Si procede depositando in provette di tipo Eppendorf 40 μ L di substrato e 40 μ L della frazione enzimatica da testare (surnatante o pellet ottenuti dalla degranulazione). Le provette vengono quindi incubate 15 minuti a 37°C in agitazione e al buio. La reazione è bloccata per aggiunta di 1.2 mL di tampone glicina-EDTA; infine, 200 μ L di ogni sospensione vengono depositati nei pozzetti di una micropiastre, prima di procedere alla lettura della fluorescenza in un lettore per micropiastre ($\lambda_{ecc} = 365$ nm e $\lambda_{em} = 460$ nm).

3.H.6 Dosaggio del lisozima**Materiali**

Tampone fosfato 67 mM – NaCl; pH 6.3

Substrato: sospensione di *Micrococcus Lysodeikticus* 0.2 g/L in tampone fosfato

Standard: lisozima (from Chicken egg white, Sigma), 1 mg/mL in acqua distillata.

Metodo [da Boje-Weisner]

Il lisozima idrolizza i ponti glicosidici delle pareti batteriche; la torbidità della sospensione contenente il substrato diminuisce proporzionalmente alla concentrazione di lisozima presente nella soluzione campione (frazioni enzimatiche ottenute dalla degranulazione). Tale torbidità, viene paragonata ad una curva di taratura ricavata a partire da concentrazioni note di lisozima standard.

Il saggio viene effettuato a temperatura ambiente, in cuvette da 1 mL in cui vengono posti 1.5 mL di sospensione substrato e aggiunti 25 μ L della soluzione da testare. La lettura della torbidità della soluzione viene effettuata su uno spettrofotometro (Uvikon) alla lunghezza d'onda di 546 nm in cinetiche di 210 secondi, con una lettura ogni 90 secondi. La reazione risulta lineare per una variazione di densità ottica fino a 0.08.

3.H.7 Dosaggio della lattoferrina (LF)

Materiali

Lactoferrin ELISA Kit, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germania

Metodo

Per valutare il rilascio di lattoferrina dai granuli specifici, è stato utilizzato il Lactoferrin ELISA Kit. Si tratta di un saggio ELISA (enzyme-linked immunoassay) dove i campioni da dosare sono incubati in pozzetti di una micropiastra in cui sono stati fissati anticorpi monoclonali anti LF. La presenza di lattoferrina in ogni pozzetto viene rivelata utilizzando un anticorpo monoclonale anti LF, marcato alla biotina; il passaggio finale consiste nell'amplificazione della reazione basata sul coniugato biotina-avidina, dove la avidina è legata covalentemente alla perossidasi HRP. La quantità di lattoferrina è misurata colorimetricamente dopo aggiunta di o-fenilendiamina, substrato della HRP. La piastra viene infine posta in un lettore per micropiastre dove si effettua una lettura della densità ottica ad una lunghezza d'onda di 450 nm. La quantità di LF presente nei campioni è ottenuta per estrapolazione a partire da una curva standard ricavata da concentrazioni note di lattoferrina in ng/mL (MDD, *minimum detectable dose*, >1 ng/mL).

3.H.8 Dosaggio della collagenasi (MMP-8)

Materiali

Human MMP-8 Immunoassay, R&D System, Lille, Francia

Metodo

Si tratta di un kit che permette di misurare la MMP-8 totale (pro- e attiva) basato sull'impiego della metodica ELISA. Un anticorpo monoclonale specifico per la collagenasi è stato prefissato su una micropiastra. Gli standards e i campioni da dosare (surnatanti e pellets di esocitosi) sono depositati nei pozzetti, permettendo così il legame della MMP-8 presente agli anticorpi immobilizzati. Dopo una serie di lavaggi che permettono di rimuovere tutto ciò che non è stato fissato ai pozzetti, si procede con l'aggiunta dell'anticorpo monoclonale specifico per la MMP-8 e coniugato alla perossidasi HRP. Dopo un'altra serie di lavaggi, la reazione perossidasi è avviata aggiungendo nei pozzetti la soluzione substrato contenente perossido di idrogeno e

tetrametilbenzidina (TMB). La piastra viene quindi incubata per 30 minuti a temperatura ambiente, al buio; lo sviluppo del colore, proporzionale alla quantità di collagenasi contenuta nei pozzetti, viene bloccato per aggiunta di acido solforico 2N. La densità ottica di ogni pozzetto viene infine determinata effettuando una lettura alla lunghezza d'onda di 450 nm in un lettore per micropiastre e confrontata con la curva di taratura costruita sulla base di concentrazioni note di MMP-8 standard. (MDD, *minimum detectable dose*, >0.02 ng/mL).

3.H.9 Dosaggio della gelatinasi (MMP-9)

Materiali

Cocktail di Inibitori di proteasi, EDTA-free

Running gel: 7.5 mL Tris HCl 1.5 M pH 8.9, 13.9 mL H₂O, 15 mg gelatine; 7.5 mL Acrilammide 40%; 0.3 mL SDS 10%; 75 L APS 10%; 10 µL TEMED

Stacking gel: 5 mL Tris HCl 0.25 M, SDS 0.2% pH 8.8, 1.25 mL Acrilammide 40%, 3.67 mL H₂O, 75 µL APS 10%, 10 µL TEMED

Tampone di migrazione: Tris HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS .0.1%, pH 8.8

Triton X-100

Tampone di lavaggio: Tris HCl 50mM, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 1 µM; pH 7.6

Soluzione di attivazione: Tris HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 1µM, 1% Triton X100, 0.02% NaN₃, APMA (acido amminofenilmercurico) 1 mM; pH 7.6

Soluzione colorante: Blu di Coomassie R250 0.25% (p/v), acido acetico 10%, etanolo 50%

Soluzione decolorante, contenente 26% etanolo e 7% acido acetico in acqua distillata.

Sample Buffer: Tris HCl 3 M, 0.2% blu di bromofenolo, 200 mM EDTA, 2.3% SDS

Preparazione dei campioni

Per recuperare il medium di coltura, le cellule vengono sottoposte ad una centrifugazione di 10 min a 400 × g a temperatura ambiente; il surnatante così ottenuto viene concentrato utilizzando Centricon® 10 (Amicon, Millipore) e tramite centrifugazione di 45 min a 2500 × g a temperatura ambiente. I lisati cellulari sono ottenuti tramite lisi per sonicazione della durata di 10 secondi e successiva centrifugazione di 10 minuti a 4000 × g alla temperatura di 4°C. Questi campioni, assieme ai surnatanti ottenuti dal saggio di degranulazione, sono trattati con il cocktail di inibitori di proteasi e risospesi in tampone “Sample Buffer”, privo di agenti riducenti che inibirebbero l'attività enzimatica delle gelatinasi.

Metodo (da Trocmé et al., 1998)

Si tratta di una tecnica elettroforetica qualitativa e semi-quantitativa che consiste nella separazione delle proteine contenute nel campione da testare su un gel al 10% di acrilammide copolimerizzato con il substrato dell'enzima ricercato (qui, la gelatina), incorporato alla concentrazione di 0.5 mg/mL di gel, e contenente, come agente denaturante, 0.1% di SDS.

Dopo il deposito dei campioni, la migrazione viene effettuata a 20-25 mA per 4-5 ore nel tampone di migrazione. Il gel viene quindi sottoposto a due lavaggi di 15 min nel tampone di lavaggio contenente 2.5% (p/v) Triton X-100 allo scopo di rimuovere l'SDS e permettere la rinaturazione delle metalloproteasi, seguiti da 2 lavaggi di 2 min nel tampone di lavaggio, per rimuovere il Triton. Lo zimogramma è quindi incubato over night (per 18h circa) a 37°C in 100 mL della soluzione di attivazione contenente l'APMA: la gelatinasi così attivata degrada la gelatina nel gel. Il giorno successivo, il gel viene sottoposto a colorazione con il Blu di Coomassie nella soluzione colorante per 45 min – 1 ora e infine sottoposto a molteplici lavaggi nella soluzione decolorante fino all'apparizione delle bande di degradazione del substrato da parte della gelatinasi attiva. L'attività gelatinolitica degli enzimi presenti è rivelata dall'assenza di colorazione in determinate bande del gel corrispondenti alle zone in cui la gelatina è stata degradata dall'enzima.

I progressi nella densitometria informatizzata permettono attualmente un'analisi semiquantitativa tramite scanning della superficie e dell'intensità di queste bande di degradazione della gelatina: lo zimogramma è scannerizzato a 600 nm in un densitometro (Desaga CD60) e le misure relative alle aree sotto la curva concernenti ogni banda di degradazione del gel possono essere convertite in quantità di gelatinasi presente grazie al confronto con una retta di taratura costruita a partire dalla MMP9 purificata in laboratorio (Morel et al., 1991). Solamente la parte lineare della curva, con valori arbitrari di scanning da 400 a 3500 circa, corrispondenti a quantità di gelatinasi pari a 50 – 1000 pg, è estrapolabile. La sensibilità di questa tecnica si avvicina a 5 pg di enzima.

3.H.10 Dosaggio del CD11b***Materiali***

Diluente: PBS 10 mM addizionato con 1% BSA e 0.1% NaN₃

mAb anti CD11b umano coniugato all'isotiocianato di fluoresceina (FITC), Sigma

Paraformaldeide.

Metodo

L'espressione del recettore di superficie CD11b, una glicoproteina eterodimerica $\alpha\beta$ appartenente alla famiglia delle integrine $\beta 2$, nelle cellule PLB-985 WT e nei neutrofili umani veniva valutato utilizzando l'anticorpo monoclonale anti CD11b umano coniugato alla sonda fluorescente FITC, in grado di riconoscere la catena α del complesso CD11b/CD18. Si tratta di un saggio effettuato su cellule intere e condotto al citofluorimetro a flusso.

Le cellule, risospese alla concentrazione di 10^7 /mL nel diluente, vengono incubate per 5 minuti a 37°C in presenza di PBS o dell'agente stimolante fMLF (c.f.: 10^{-7} M); i campioni sono quindi incubati 30 minuti a temperatura ambiente, in presenza di 10 μL di mAb anti CD11b coniugato alla sonda fluorescente. Al termine dell'incubazione, 2 mL di diluente vengono aggiunti ad ogni prova prima di procedere ad una centrifugazione di 10 minuti a $500 \times g$. Una volta rimosso il surnatante, il fondello contenete le cellule è risospeso in 0.5 mL di paraformaldeide al 2%; i campioni vengono infine analizzati al citofluorimetro a flusso per la lettura della fluorescenza nel canale del verde (FL1).

Lavoro realizzato al
Dipartimento di Scienze della Vita
- Università degli studi di Trieste -
Resp: Prof. Pietro Dri

4.A Ruolo della Mieloperossidasi nell'attività microbica dei neutrofili

L'uccisione dei microorganismi patogeni é il risultato della cooperazione di svariati meccanismi: produzione di metaboliti reattivi dell'ossigeno, rilascio di enzimi e peptidi antimicrobici, flusso ionico di compensazione di carica e formazione di *neutrophil extracellular traps*.

Fino a qualche anno fa, l'opinione più largamente diffusa era che le specie reattive dell'ossigeno, prodotte in seguito all'attivazione del complesso NADPH ossidasi, fossero le principali responsabili dell'uccisione dei microorganismi (Babior et al., 1973; Klebanoff et al., 1975). Secondo questa linea di pensiero, si riteneva che la mieloperossidasi rilasciata dai granuli azurofili nel vacuolo di fagocitosi potenziasse considerevolmente gli effetti antimicrobici delle specie reattive dell'ossigeno, catalizzando la conversione del perossido di idrogeno (H_2O_2) in acido ipocloroso, HOCl, un potente agente ossidante. Il ruolo centrale della NADPH ossidasi nel killing microbico ha trovato conferma in seguito alla identificazione della malattia granulomatosa cronica (CGD), una rara patologia genetica caratterizzata da un' aumentata suscettibilità alle infezioni dovute principalmente a *S. aureus* e *A. fumigatus*, a causa dell'incapacità dei fagociti di produrre le ROS a seguito della carenza di NADPH ossidasi.

Negli ultimi anni, é stato proposto un modello alternativo per il ruolo della NADPH ossidasi, che sarebbe intimamente legato all'azione antimicrobica delle proteasi rilasciate nel fagosoma (Reeves et al., 2002; Ahluwalia et al., 2004). Secondo questo modello infatti, l'attivazione dell'ossidasi e la conseguente produzione di ROS permetterebbero di creare nel fagosoma un microambiente ottimale (in termini di pH e tonicità) all'azione delle proteine antimicrobiche contenute nei granuli citoplasmatici (tra cui, elastasi e catepsina G), responsabili dell'uccisione e della degradazione dei microorganismi internalizzati. In base a questa ipotesi, l'eccesso di carica negativa creatosi nel fagosoma a causa del trasferimento di elettroni sotto forma di O_2^- attraverso la NADPH ossidasi, sarebbe compensato da un consistente flusso di ioni K^+ dal citosol verso il fagosoma, attraverso dei canali a larga conduttanza, attivati dal calcio e voltaggio dipendenti (BK_{Ca}). Contemporaneamente a ciò, si verificherebbe un aumento del pH intrafagosomale dovuto al consumo di ioni H^+ nella reazione di dismutazione del superossido a perossido di idrogeno. L'ipertonicità generata dall'influsso di potassio e l'alcalinizzazione favorirebbero l'attività antimicrobica inducendo il rilascio e l'attivazione

delle proteasi granulari. Varie critiche a questo modello e alle sue basi sperimentali sono state pubblicate negli ultimi anni, attraverso la dimostrazione, da un lato del non coinvolgimento dei canali BK_{Ca} e dall'altro, dell'importanza del ruolo dei canali protonici nel burst respiratorio e nell'attività antimicrobica dei PMN (Femling et al., 2006; Murphy et al., 2006; Essin et al., 2007; Nauseef 2007; Rada et al., 2008; Morgan et al., 2009). Il quadro generale che ne emerge é assai confuso, e non permette di individuare con chiarezza quali siano gli eventi associati all'attivazione dell'ossidasi (flussi di ioni K^+ o H^+ o modificazioni del pH vacuolare, rilascio di ROS e azione della MPO) effettivamente rilevanti per i processi di killing.

Abbiamo recentemente dimostrato che la procedura comunemente utilizzata per la valutazione della funzionalità microbica dei neutrofilo è inadeguata a causa di un errore metodologico (Decleva et al., 2006). Parte dell'attività sperimentale svolta nel corso di questa tesi è stata quindi indirizzata a riesaminare il ruolo dei diversi meccanismi che sono ritenuti essere coinvolti nei processi di killing dei neutrofilo, grazie all'applicazione di una corretta metodica di valutazione dell'attività microbica.

4.A.1 Ruolo della NADPH ossidasi nel killing di *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*

Per comprendere il ruolo dei sistemi ossidativi e non ossidativi nell'evento microbica, abbiamo innanzitutto eseguito una serie di esperimenti in cui diversi microorganismi erano testati per valutare la loro suscettibilità ai processi di killing NADPH ossidasi dipendenti. A questo scopo, abbiamo voluto confrontare l'attività microbica di neutrofilo normali e neutrofilo NADPH ossidasi deficienti, cioè, neutrofilo di pazienti affetti da malattia granulomatosa cronica e neutrofilo normali trattati con l'inibitore della NADPH ossidasi, il difenileneiodonio (DPI). I microorganismi target utilizzati sono un battere gram negativo (*E. coli*), un gram positivo (*S. aureus*) e un fungo (*C. albicans*).

La Figura 11 mostra che l'uccisione di *E. coli* da parte di neutrofilo NADPH ossidasi deficienti è parzialmente difettosa nei primi 5-30 minuti di contatto cellule/batteri, ma diventa paragonabile a quella dei neutrofilo di controllo quando i tempi di incubazione sono prolungati (45-60 minuti).

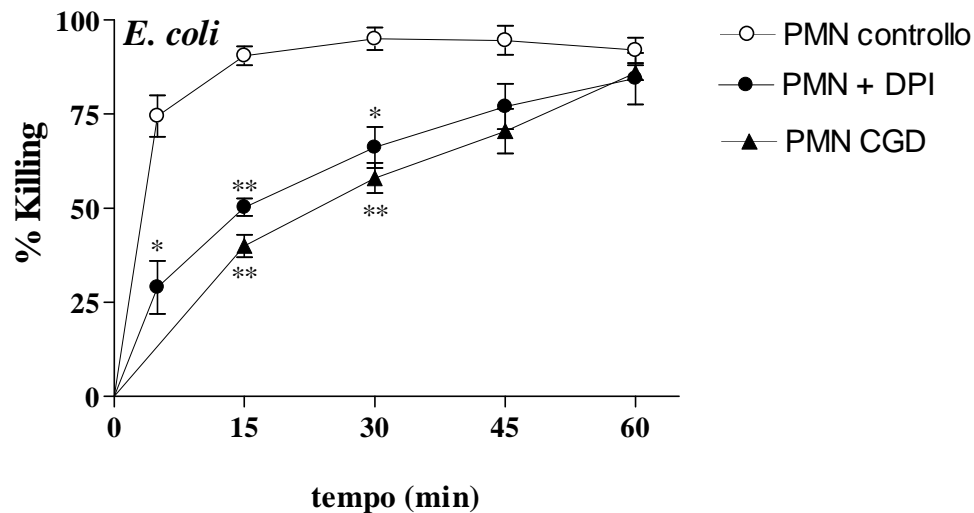
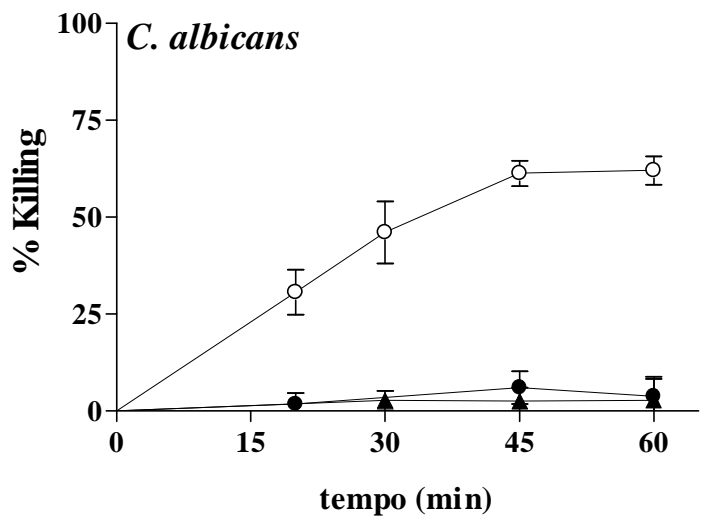
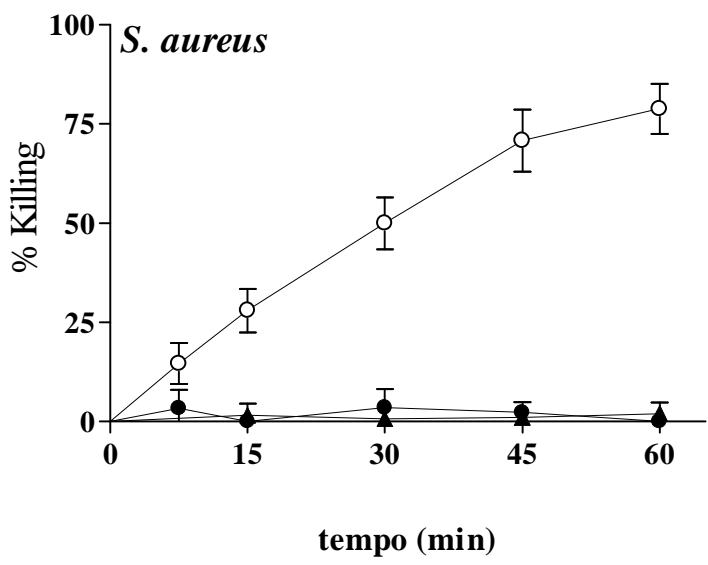


Figura 11: Cinetiche di killing di *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* da parte di neutrofili di controllo, trattati con DPI e neutrofili CGD. I neutrofili (5×10^6 cellule/mL) venivano preincubati per 10' a 37°C, in agitazione, in assenza o in presenza di DPI (c.f. 5 μ M). Seguiva l'aggiunta dei batteri o dei funghi opsonizzati in modo da avere un rapporto *E. coli*:PMN di 5:1, stafilococchi:PMN di 3:1 e candide:PMN di 2:1. Ai tempi indicati, venivano prelevati 50 μ L da ciascuna sospensione e diluiti in 2,5 mL di H₂O a pH 11. Dopo 5' a temperatura ambiente, 50 μ L di ogni sospensione di lisi venivano ulteriormente diluiti in un opportuno volume di NaCl, di modo che la concentrazione finale di batteri e funghi risultasse pari a 2×10^3 /mL. Seguiva, infine, la semina in terreno solido su piastra Petri di 100 μ L di ciascuna sospensione. I dati sono espressi in percentuale di microorganismi uccisi ai tempi indicati, rispetto all'inoculo iniziale (tempo 0' di fagocitosi). I risultati sono la media \pm DS di almeno 4 esperimenti indipendenti, condotti in duplicato. **, P<0.01; *, P<0.05.



Questo suggerisce che l'attività del complesso NADPH ossidasi è necessaria per un killing ottimale di *E. coli* nelle fasi precoci dei processi microbicidi successivi alla fagocitosi, ma che nei neutrofili sono operativi anche altri meccanismi che possono contribuire all'eliminazione di questo microorganismo, anche in assenza di una NADPH ossidasi funzionante. Invece, neutrofili CGD o trattati con DPI non sono in grado di uccidere *S. aureus* e *C. albicans* durante i 60 minuti incubazione, indicando che il killing di questi microorganismi dipende interamente dalla NADPH ossidasi.

4.A.2 Ruolo dei flussi di K^+

Dopo aver stabilito che l'attività della NADPH ossidasi è indispensabile all'uccisione di *S. aureus* e *C. albicans*, abbiamo voluto investigare circa il possibile contributo dei flussi di ioni potassio, uno dei meccanismi che è stato recentemente ipotizzato come implicato nei fenomeni di killing, guidato dall'attivazione dell'ossidasi (Reeves et al., 2002; Ahluwalia et al., 2004). Questi flussi di ioni K^+ sarebbero mediati da canali calcio attivati e voltaggio dipendenti (BK_{Ca}): abbiamo quindi voluto testare l'effetto di due inibitori selettivi dei BK_{Ca} , l'iberiotossina e la paxillina, sul killing di *S. aureus* e *C. albicans*. In questa serie di esperimenti abbiamo utilizzato anche un inibitore ad ampio spettro dei canali K^+ , il tetratetilammonio (TEA). La Figura 12A mostra che nessuno di questi inibitori influenza il killing di *S. aureus* e *C. albicans* da parte dei neutrofili umani.

Usando un approccio complementare, abbiamo poi voluto verificare se l'attivazione di flussi di potassio fosse in grado di ripristinare l'attività microbica in neutrofili trattati con DPI. A questo scopo abbiamo utilizzato un attivatore selettivo dei BK_{Ca} , il composto NS1619. I risultati sono riportati nella Figura 12B: risulta evidente come questo opener dei canali a potassio non migliori l'attività microbica dei neutrofili in cui l'attività NADPH ossidasi è inibita dal DPI.

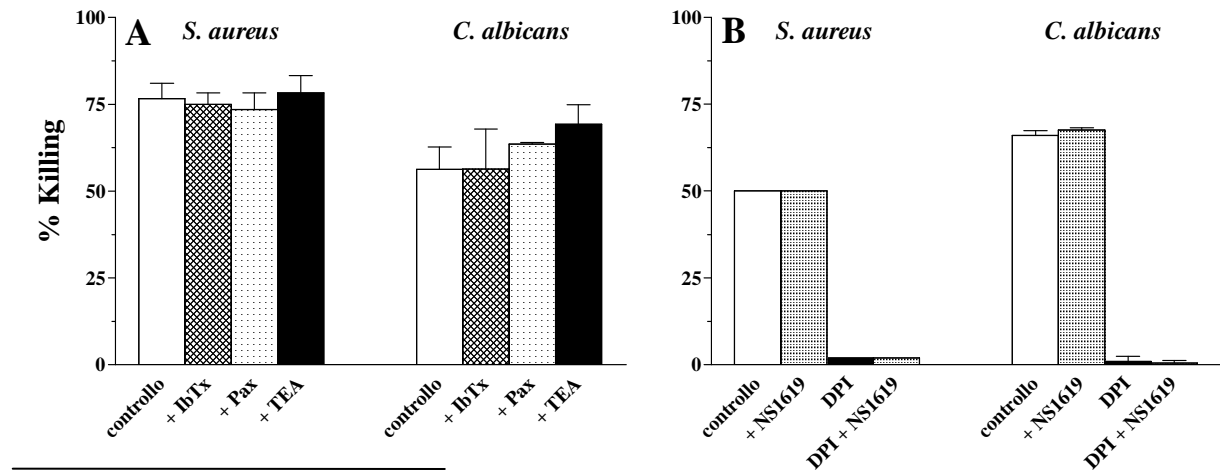


Figura 12: Ruolo dei flussi di potassio nell'attività microbica dei neutrofilii. A) Effetto di inibitori dei BK_{Ca} iberiotossina (IbTX) e paxillina (Pax), sul killing di *S. aureus* e *C. albicans* da parte di neutrofilii di controllo. B) Effetto dell'opener dei BK_{Ca}, NS1619, sull'attività stafilocida e candidacida di neutrofilii di controllo e trattati con DPI. Le condizioni sperimentali sono quelle descritte nella sezione Mat. e met. § 3F; in breve, i neutrofilii (5×10^6 cellule/mL in soluzione HEPES-ioni) venivano preincubati 10' in presenza o in assenza di DPI (5 μ M), iberiotossina (IbTX) 100 nM, paxillina (Pax) 300 nM, tetraetilammonio (TEA) 10 mM, o NS1619 30 μ M. Seguiva l'aggiunta dei microorganismi opsonizzati in modo da avere un rapporto stafilococchi:neutrofilii di 5:1 e candide:neutrofilii di 3:1. Dopo 45' (*S. aureus*) o 60' (*C. albicans*) di incubazione a 37°C, i neutrofilii venivano lisati in H₂O a pH 11 e i microorganismi seminati in piastra Petri. I dati sono espressi come percentuale di microorganismi uccisi dopo 60' di fagocitosi, rispetto all'inoculo iniziale (tempo 0' di fagocitosi). I risultati sono la media \pm DS di almeno 4 (inibitori dei BK_{Ca}) e 2 (opener NS1619) esperimenti condotti in duplicato.

4.A.3 Ruolo dell'alcalinizzazione intrafagosomale

La dismutazione dell'anione superossido, accompagnata dal consumo di protoni, rende il microambiente fagosomale alcalino: nei neutrofilii normali, si assiste infatti ad un aumento del pH a 7.8-8 nei primi minuti successivi alla fagocitosi, seguito da una diminuzione del pH a circa 6.0 (Segal et al., 1981; Cech et al., 1984) in seguito all'attivazione di un antiporter Na⁺/H⁺, di una pompa protonica vacuolare ATP-asi e di un meccanismo di conduttanza a ioni H⁺ (Nanda et al., 1994) che determinano un influsso di protoni dal citoplasma al fagosoma. L'iniziale alcalinizzazione é ritenuta importante per l'attività delle proteine antimicrobiche contenute nei granuli citoplasmatici, che esplicherebbero la loro azione in modo ottimale a pH leggermente alcalino. Nei neutrofilii NADPH ossidasi deficienti, manca l'alcalinizzazione iniziale e si osserva, invece, una rapida e sostenuta acidificazione del pH intrafagosomale; a ciò viene attribuito, almeno in parte, il difetto di attività microbica che caratterizza queste cellule. Sulla base di questa ipotesi, abbiamo voluto verificare se fossimo

in grado di ripristinare l'attività microbica dei neutrofili NADPH ossidasi deficienti inducendo un aumento del pH vacuolare, che permetta l'attivazione delle proteasi granulari antimicrobiche. A questo scopo abbiamo utilizzato basi deboli lisosomotropiche, l'ammonio cloruro e la metilammina, composti che si accumulano preferenzialmente nei compartimenti acidi delle cellule (Poole et al., 1981), un inibitore della pompa vacuolare H^+ -ATPasi, la bafilomicina, e l'inibitore dell'antiporter Na^+/H^+ , 5-(N,N-esametilene) amiloride, HMA, composti in grado di contrastare la precoce acidificazione fagosomale osservata nei neutrofili NADPH ossidasi deficienti (Grinstein et al., 1988). La Figura 13 mostra che nessuna di queste sostanze é in grado di migliorare l'attività stafilocida o candidacida dei neutrofili trattati con DPI, indicando che l'alcalinizzazione intrafagosomale non é sufficiente, di per sé, all'attività antimicrobica.

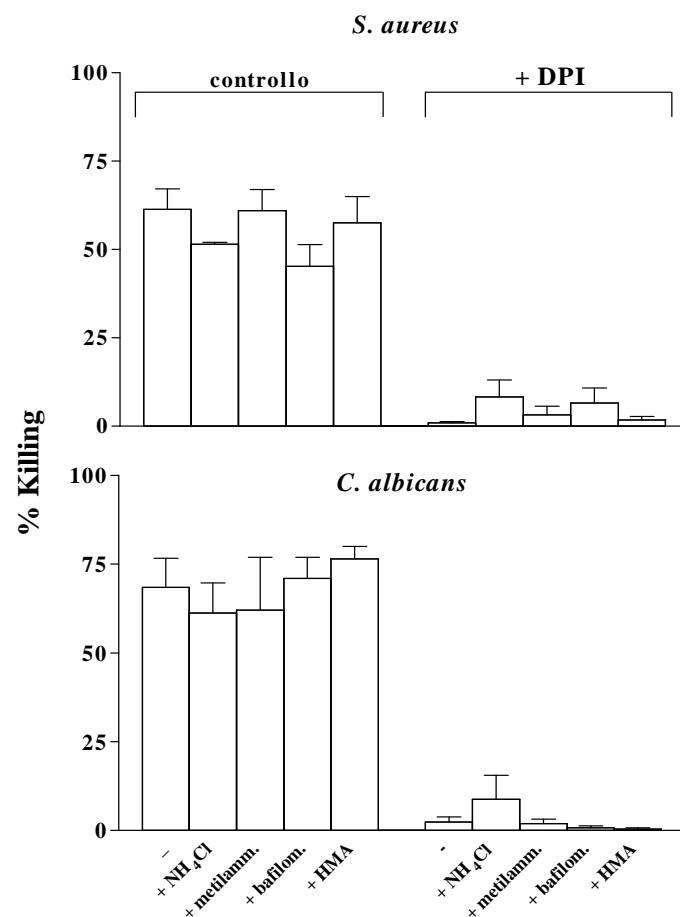


Figura 13: Ruolo dell'alcalinizzazione fagosomale nell'attività microbica dei neutrofili. Effetto di basi deboli lisosomotropiche (NH_4Cl e metilammina), inibitore della pompa H^+ -ATPasi (bafilomicina) e inibitore dell'antiporter Na^+/H^+ (amiloride) sul killing di *S. aureus* e di *C. albicans*. I neutrofili (5×10^6 cellule /mL) venivano preincubati per 30' a 37°C in presenza o in assenza di metilammina (10 mM) o ammonio cloruro (NH_4Cl , 10 mM) o per 10' a 37°C in presenza o in assenza di bafilomicina (10 nM) o amiloride (HMA, 2.5 μM). Dopo l'aggiunta dei microorganismi opsonizzati, le cellule venivano lisate in H_2O a pH 11 e i microorganismi seminati in piastra Petri. I dati sono espressi come media \pm DS di almeno 3 esperimenti indipendenti, condotti in duplicato.

4.A.4 Ruolo del sistema MPO-H₂O₂-Cl⁻

4.A.4.1 Effetto dell'inibizione del sistema microbicida MPO dipendente sul killing di *S. aureus* e *C. albicans*

Poiché é noto che l'anione superossido e il perossido di idrogeno prodotti durante l'attivazione del complesso NADPH ossidasi hanno, di per sé, una scarsa attività antimicrobica, abbiamo esaminato il contributo del sistema microbicida dipendente dalla MPO, che com'è noto, in presenza di H₂O₂ e ioni cloruro catalizza la formazione di acido ipocloroso, HOCl, una specie fortemente tossica. Il ruolo del sistema MPO nell'attività antimicrobica dei neutrofili è stato inizialmente studiato utilizzando inibitori della mieloperossidasi e scavengers dell'acido ipocloroso, HOCl. I neutrofili normali sono stati trattati con KCN, un inibitore aspecifico della MPO, con acido salicilidrossamico (SHAM), un inibitore selettivo della MPO (Davies et al., 1989) e con gli aminoacidi metionina e taurina, composti in grado di reagire rapidamente con HOCl e di neutralizzarlo (Jelrich et al., 2000). La Figura 14 mostra che il killing di *S. aureus* e *C. albicans* é fortemente inibito dagli inibitori della mieloperossidasi (KCN e SHAM) e dai composti scavengers di HOCl.

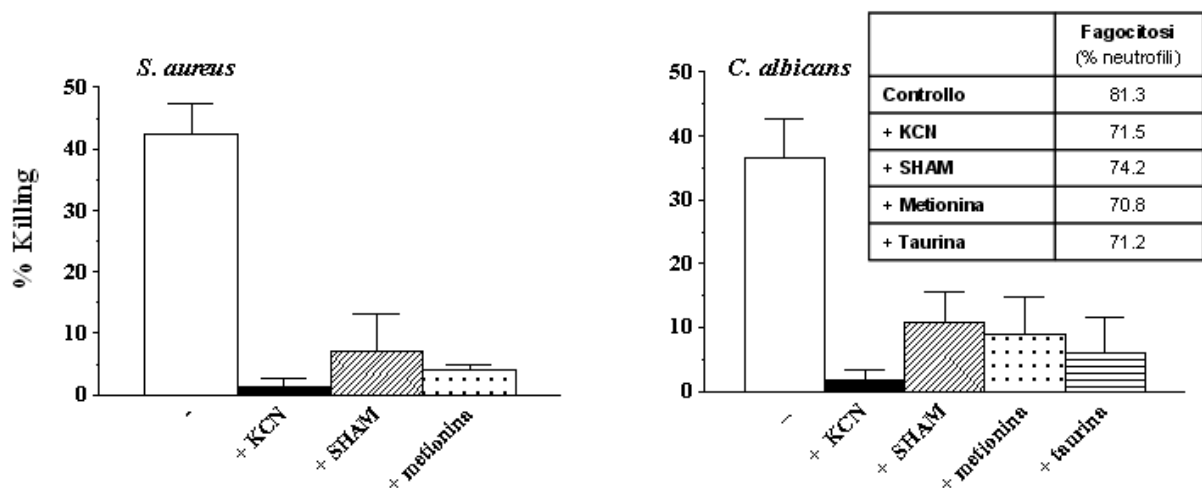


Figura 14: Ruolo del sistema MPO-alogenuro nell'attività microbicida dei neutrofili. Effetto di inibitori della MPO (KCN e SHAM) e di scavengers dell'HOCl (Metionina e Taurina) sul killing di *S. aureus* e *C. albicans*. I neutrofili (5×10^6 cellule/mL) venivano incubati 10 min a 37°C in presenza o meno di KCN (1 mM), SHAM (100 μ M) e metionina (10 mM); dopo l'aggiunta dei microorganismi opsonizzati le cellule venivano lisate in H₂O a pH 11 e i microorganismi seminati in piastra Petri. I dati sono espressi come media \pm DS di 3 (*S. aureus*) e 4 (*C. albicans*) esperimenti condotti in duplicato.

4.A.4.2 Attività microbica dei neutrofili di soggetti MPO-deficienti

Un altro approccio sperimentale da noi utilizzato per comprendere il ruolo della mieloperossidasi nel killing antimicrobico è rappresentato dalla valutazione dell'attività microbica di neutrofili di soggetti MPO deficienti. La Figura 15 mostra le cinetiche di attività microbica di neutrofili carenti in MPO e di neutrofili normali, in presenza o in assenza di KCN, nei confronti di *S. aureus* e *C. albicans*. Nei neutrofili carenti di MPO il killing di entrambi i microorganismi risulta virtualmente assente a brevi tempi di incubazione (10-20 min), e resta significativamente più basso rispetto al killing di neutrofili di controllo anche prolungando l'incubazione a 45-60 minuti. Questo fatto risulta particolarmente evidente nel caso della *C. albicans*, il cui killing da parte dei PMN MPO deficienti é fortemente difettoso anche dopo 60 minuti di incubazione. Come ci si attendeva, il killing dei neutrofili normali trattati con l'inibitore della MPO, KCN, é paragonabile a quello dei neutrofili di soggetti MPO deficienti. È importante notare che KCN non influenza l'attività microbica di neutrofili carenti in MPO, escludendo in questo modo la possibilità che l'effetto inibitorio osservato sul killing dei PMN di controllo possa dipendere da meccanismi diversi dall'inibizione della MPO.

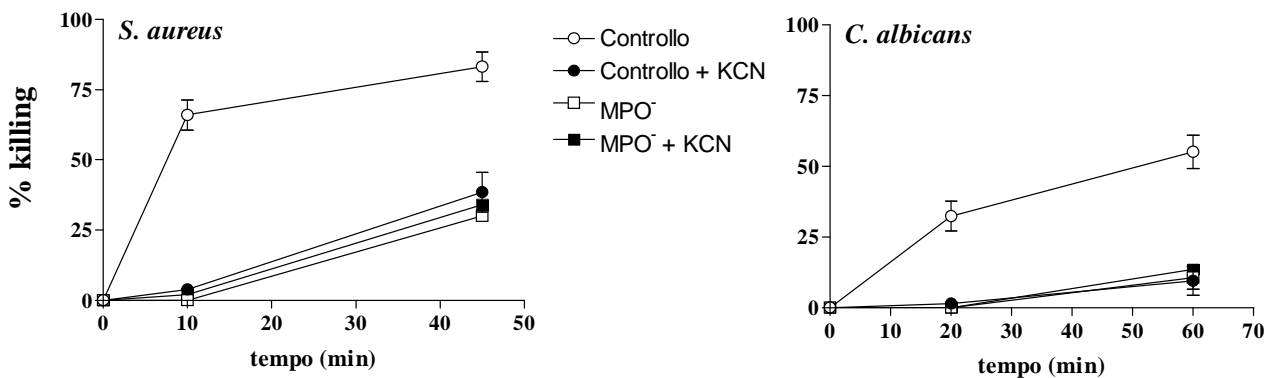


Figura 15 : Cinetica di killing di *S. aureus* e *C. albicans* da parte di neutrofili di controllo, neutrofili trattati con KCN e neutrofili di soggetti MPO-deficienti. Le condizioni sperimentali sono analoghe a quelle descritte in Fig. 14. I dati sono espressi come media \pm DS di 3 esperimenti condotti in duplicato.

Il ruolo del sistema MPO-H₂O₂-Cl⁻ é stato anche studiato attraverso una serie di esperimenti in cui l'attività antimicrobica dei neutrofili trattati con DPI veniva ricostituita attraverso un sistema generante H₂O₂ (glucosio/glucosio ossidasi). Come mostrato nella Figura 16, l'aggiunta della Glucosio ossidasi (GO) al mezzo di incubazione contenente glucosio ripristina parzialmente l'attività di killing dei neutrofili normali trattati con DPI e dei neutrofili di soggetti CGD, sia nei confronti di *S. aureus* che di *C. albicans*. Questo sistema non ha invece alcun effetto sui neutrofili di soggetti MPO deficienti trattati con DPI.

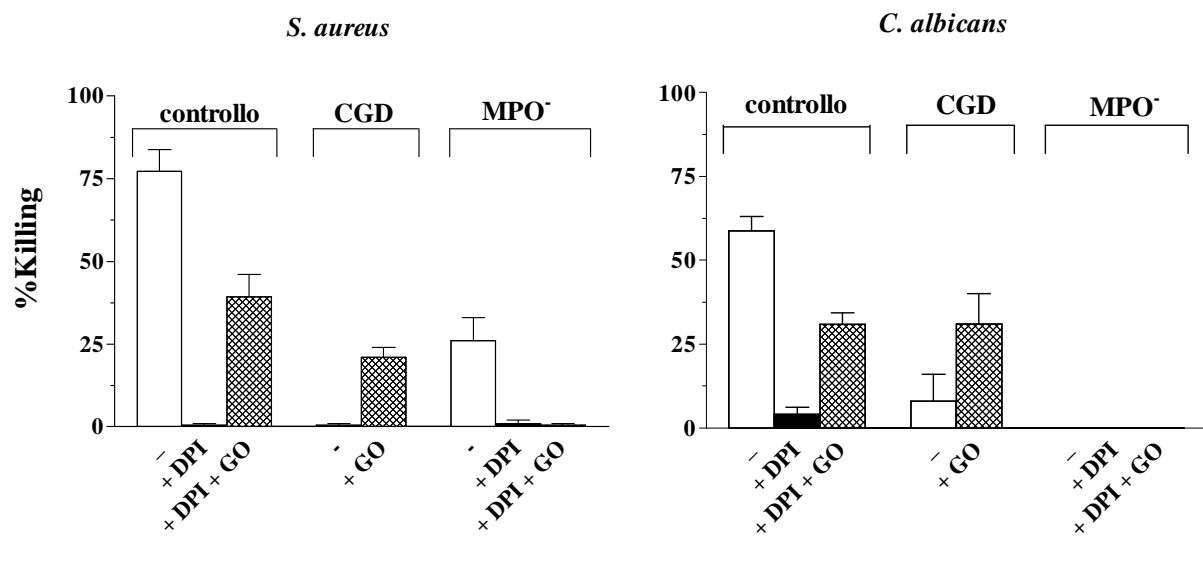


Figura 16: Attività stafilocida e candidacida di neutrofili di controllo, neutrofili di soggetti CGD e neutrofili di soggetti MPO⁻. Effetto della glucosio ossidasi (GO) sull'attività microbica. I neutrofili (5×10^6 cellule/mL) venivano incubati 10 min a 37°C in presenza o meno di DPI (5 μ M) prima dell'aggiunta della GO (1U/mL) e dei microorganismi opsonizzati; trascorsi 45 (*S. aureus*) e 60 min (*C. albicans*) di fagocitosi, le cellule venivano lisate in H₂O a pH 11 e i microorganismi seminati in piastra Petri. I dati sono espressi come media \pm DS di 3 esperimenti condotti in duplicato.

Come mostrato in Figura 17, il killing ripristinato dal sistema glucosio/glucosio ossidasi viene totalmente abolito quando l'attività perossidasi è inibita (con KCN o SHAM) o neutralizzando l'acido ipocloroso (con metionina o taurina). Questo indica che il sistema dipendente dalla mieloperossidasi é di per sé sufficiente ad assicurare un'attività microbica anche in assenza di altri meccanismi antimicrobici attivati dalla NADPH ossidasi.

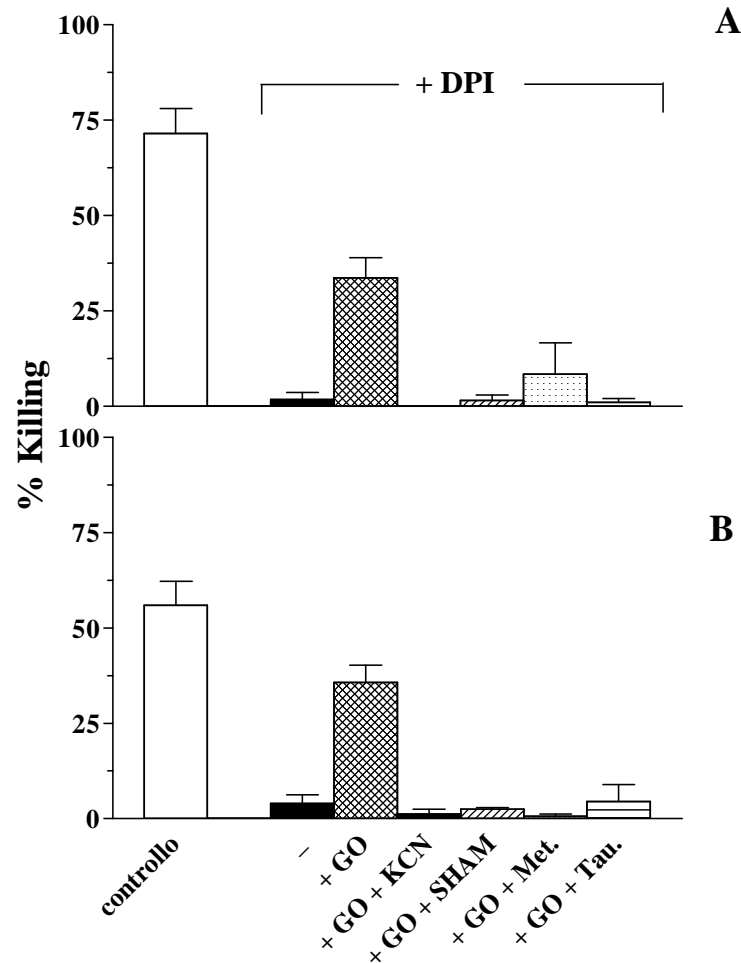


Figura 17: Effetto di inibitori della MPO e scavengers di HOCl sull'attività stafilocida e candidacida di neutrofilii trattati con DPI in presenza di GO. I neutrofilii (5×10^6 cellule/mL) venivano incubati 30 min a 37°C in presenza o meno di Metionina (10 mM), Taurina (10 mM); al termine dei primi 20' di incubazione, venivano aggiunti, ove richiesto, KCN (1 mM) SHAM (100 μM) o DPI (5 μM) per ulteriori 10' di incubazione; seguiva l'aggiunta della GO (1U/mL) e dei microorganismi opsonizzati; trascorsi 45 (*S. aureus*) e 60 min (*C. albicans*) di fagocitosi, le cellule venivano lisate in H_2O a pH 11 e i microorganismi seminati in piastra Petri. I dati sono espressi come media \pm DS di 3 esperimenti condotti in duplicato.

4.A.5 Killing MPO-indipendente

I neutrofilii MPO deficienti e i neutrofilii normali trattati con l'inibitore della mieloperossidasi, KCN, che non sono in grado di uccidere i microorganismi a brevi tempi di incubazione, mostrano un'attività microbica "residua" nei confronti di *S. aureus* (meno evidente nei confronti di *C. albicans*), quando i tempi di incubazione vengono prolungati, come appare in Figura 15. Le specie reattive dell'ossigeno e le proteasi contenute nei granuli citoplasmatici

attivati dalle modificazioni fisicochimiche del fagolisosoma, indotte dall'attivazione della NADPH ossidasi, potrebbero teoricamente spiegare questa attività antimicrobica residua, osservata in assenza di mieloperossidasi. Abbiamo quindi eseguito una serie di esperimenti intesi a caratterizzare i meccanismi responsabili dell'attività antimicrobica residua indipendente dalla MPO. A questo scopo abbiamo utilizzato neutrofilii normali trattati o meno con KCN. Per testare il contributo del perossido di idrogeno abbiamo fatto ricorso al sistema Glutazione/Glutazione perossidasi (GSH/GSHPO) che ha un'alta affinità per H_2O_2 e quindi la neutralizza. Il contributo dei flussi di potassio è stato analizzato usando iberiotossina e paxillina, due inibitori selettivi dei canali BK_{Ca} , e il tetraetilammonio (TEA), un inibitore aspecifico dei canali a potassio. I risultati ottenuti in questa serie di esperimenti sono riportati in Figura 18, dove si può notare come il sistema GSH/GSHPO non influenza l'attività staffilocida delle cellule prive di attività perossidasi. L'iberiotossina e la paxillina compromettono l'attività di killing, mentre il TEA esercita una significativa inibizione dell'attività staffilocida.

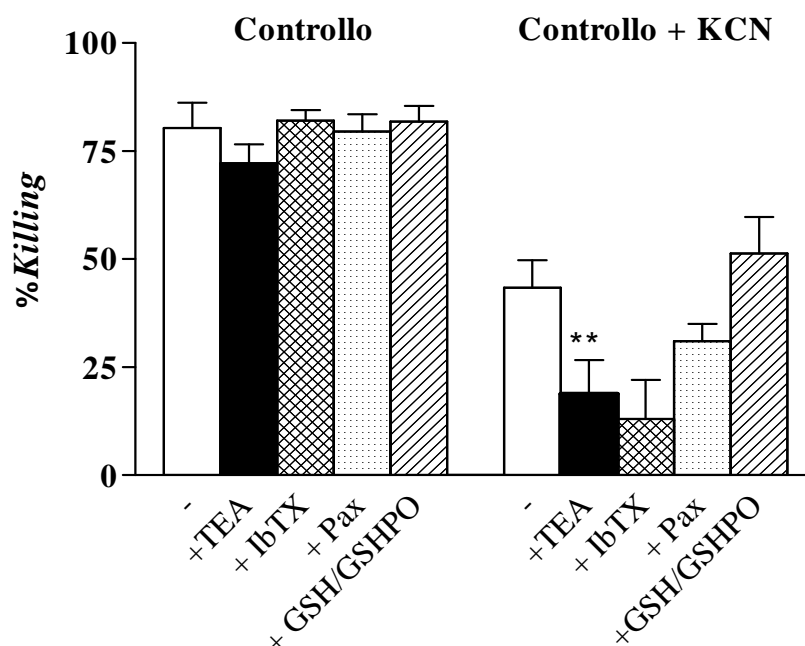


Figura 18: Killing MPO-indipendente. Effetto di inibitori dei BK_{Ca} e del sistema GSH/GSHPO sull'attività staffilocida di neutrofilii di controllo e trattati con KCN. I neutrofilii (5×10^6 cellule/mL) venivano incubati 10 min a $37^\circ C$ in presenza o meno di KCN (1 mM), iberiotossina (100 nM), paxillina (300 nM) o TEA (10 mM); seguiva l'aggiunta, ove richiesto, di GSH (1 mM), GSHPO (2 U/mL) e dei microorganismi opsonizzati. Trascorsi 45' di fagocitosi, le cellule venivano lisate in H_2O a pH 11 e i batteri seminati in piastra Petri. I dati sono espressi come media \pm DS di 5 esperimenti condotti in duplicato.

4.A.6 Discussione

Gli studi pubblicati finora sull'attività microbica di neutrofili NADPH ossidasi deficienti mostrano dati fortemente variabili, che vanno da un killing fortemente compromesso ad un killing quasi normale (Decleva et al., 2006): tale eterogeneità di risultati è dovuta al fatto che la tecnica comunemente utilizzato per la misura dell'attività microbica è inficiato da un errore metodologico che causa una sovrastima dell'attività di killing. Parte di questo lavoro di tesi è stato quello di riesaminare il ruolo relativo dei meccanismi ossidativi e non ossidativi nell'attività microbica dei neutrofili. La metodica recentemente messa a punto nel nostro laboratorio per la valutazione dell'attività microbica dei neutrofili (Decleva et al., 2006) ci ha permesso di dimostrare che i sistemi ossidativi, dipendenti dall'attivazione della NADPH ossidasi, sono implicati nel killing di tutti i microorganismi.

Alcuni patogeni (quali *E. coli*) risultano efficacemente uccisi anche in assenza di attività ossidasica (è il caso dei PMN di pazienti CGD o dei PMN normali trattati con l'inibitore della NADPH ossidasi, DPI). L'attività NADPH ossidasica risulta essere invece indispensabile per il killing di altri microorganismi, quali lo *S. aureus* e la *C. albicans* (Figura 11).

In base al modello che era stato proposto dal gruppo del prof. Segal, il ruolo della NADPH ossidasi nella difesa dell'organismo sarebbe strettamente connesso all'azione antimicrobica delle proteasi rilasciate nel fagosoma (Reeves et al, 2002; Ahluwalia et al, 2004). Secondo questa ipotesi un massiccio influsso di ioni potassio nel *lumen* fagosomale attraverso i canali BK_{Ca} causerebbe la solubilizzazione delle proteasi dalla matrice dei granuli primari, che potrebbero quindi esercitare la loro azione antimicrobica.

Ora, se le suddette correnti di ioni potassio fossero critiche per l'attività microbica, ci si aspetterebbe che le modificazioni della concentrazione di K⁺ nel microambiente fagosomale determinassero effetti drastici sull'efficacia del killing dei neutrofili. I risultati presentati in questa tesi dimostrano da un lato, che l'abolizione dell'ingresso di potassio nel vacuolo di fagocitosi, realizzata attraverso l'utilizzo di inibitori specifici (iberiotossina, paxillina) e aspecifici (TEA) dei canali BK_{Ca}, non ha alcun effetto sull'attività microbica di neutrofili di controllo (Figura 12A); e dall'altro, che il ripristino dell'influsso di potassio nel vacuolo di fagocitosi in neutrofili NADPH ossidasi deficienti, grazie all'impiego dell'opener selettivo per questi canali del potassio, il composto NS1619 (Lawsan 2000), non è in grado di migliorare l'attività microbica di queste cellule (Figura 12B). Ne abbiamo dedotto che

l'influsso di ioni K^+ nel vacuolo di fagocitosi non é implicato nei meccanismi microbici di dei neutrofilo.

In un secondo momento ci siamo interessati al ruolo del pH intrafagosomale nella modulazione dell'attività microbica. Come abbiamo già detto, nei neutrofilo normali, il burst respiratorio è accompagnato da una fase transitoria di alcalinizzazione del pH vacuolare seguita da una fase di acidificazione (Segal et al., 1981; Cech et al., 1984; Jiang et al., 1997; Morgan et al., 2009). L'alcalinizzazione è ritenuta essenziale per l'attivazione degli enzimi granulari all'interno del fagosoma. L'osservazione che nei neutrofilo NADPH ossidasi deficienti, questa fase di alcalinizzazione manca e il pH del fagosoma si acidifica precocemente ha suggerito l'ipotesi che l'alterazione nell'omeostasi del pH intrafagosomale sia uno dei fattori coinvolti nel difetto di attività microbica che caratterizza i soggetti affetti da CGD. La nostra idea è stata quindi quella di servirci di composti in grado di contrastare la precoce acidificazione del fagosoma osservata nei neutrofilo CGD, per tentare di ripristinare l'attività di killing. A questo scopo abbiamo utilizzato due basi deboli con caratteristiche lisosomotropiche (la metilammina e l'ammonio cloruro), un inibitore della pompa vacuolare ATP-dipendente (la bafilomicina) e l'inibitore dello scambiatore Na^+/H^+ (l'amiloride). I risultati da noi ottenuti dimostrano che nessuno dei composti capaci di correggere le anomali condizioni di pH osservate nei neutrofilo NADPH ossidasi deficienti, è in grado di ripristinare l'attività stafilocida o canidacida di queste cellule (Figura 13).

Ne abbiamo concluso che l'alcalinizzazione del pH fagosomale non è di per sé sufficiente a garantire l'uccisione di *S. aureus* e *C. albicans*.

I risultati fin qui esposti depongono a sfavore di un possibile ruolo dall'alcalinizzazione fagosomale e dagli influssi di potassio nell'attività microbica contro *S. aureus* e *C. albicans*. Abbiamo quindi voluto stabilire quale fosse il ruolo dei meccanismi ossidativi, e, in particolare, del sistema microbica dipendente dalla MPO, nell'uccisione di questi microorganismi.

A questo scopo, sono stati utilizzati diversi approcci sperimentali. I dati da noi ottenuti evidenziano l'importanza dell'attività del sistema MPO- H_2O_2 -cloruro nel killing di *S. aureus* e *C. albicans*. Infatti, in presenza degli inibitori della MPO e di scavengers dell'acido ipocloroso l'attività microbica dei neutrofilo risulta quasi abolita, nei confronti di entrambi i microorganismi.

L'importanza della mieloperossidasi nell'evento microbica è confermata dai risultati che abbiamo ottenuto nel corso di studi su pazienti MPO-deficienti.

I risultati da noi ottenuti in vitro, mostrano che i PMN MPO-deficienti non sono in grado di uccidere normalmente i microorganismi: il killing di *S. aureus* e *C. albicans* da parte dei PMN MPO deficienti era infatti assente nei primi 10 (*Staphylococcus*) e 20 (*Candida*) minuti di contatto neutrofilo/microorganismi e resta significativamente più basso del killing di controllo anche prolungando i tempi di incubazione (Figura 15). Complessivamente i nostri dati ci permettono di concludere che il killing di *S. aureus* e *C. albicans* a tempi brevi di incubazione dipende esclusivamente dall'azione della mieloperossidasi. In accordo con i risultati da noi ottenuti, è stato dimostrato che citoplasti dei neutrofili (neutroplasti, cellule prive di nucleo e dei granuli citoplasmatici, e quindi, privi di MPO), caratterizzati da una fagocitosi e da un burst respiratorio normali, non sono in grado di uccidere lo *Staphylococcus aureus* (Odell et al., 1988). Inoltre, diversi ricercatori hanno riportato casi clinici di pazienti MPO deficienti caratterizzati da un'elevata suscettibilità alle infezioni da *C. albicans* (Lehrer et al., 1969; Moosmann et al., 1975; Kitahara et al., 1979; Cech et al., 1979; Nguyen et al., 1997). È importante sottolineare che i neutrofili MPO deficienti possiedono una fagocitosi normale (Cech P et al, 1979; Larrocha et al, 1982; Lehrer et al, 1969) e un burst respiratorio esuberante (Patriarca P et al, 1975; Rosen H et al, 1976; Nauseef et al, 1983).

L'importanza della mieloperossidasi nell'uccisione dei microorganismi è confermata anche dai risultati ottenuti nel corso di esperimenti in cui il sistema microbicide MPO dipendente veniva ricostituito mediante glucosio e glucosio ossidasi, fornendo quindi una fonte esogena di H_2O_2 a neutrofili CGD o neutrofili normali trattati con DPI che non sono in grado di produrlo. In queste condizioni il difetto di attività microbicide che caratterizza queste cellule risultava parzialmente corretto (Figura 16). Che l'attività microbicide osservata in presenza della fonte esogena di H_2O_2 fosse dovuta alla MPO è dimostrato dal fatto che il ripristino di tale attività era bloccato da inibitori della MPO e da agenti neutralizzanti HOCl.

Per quanto concerne l'attività microbicide residua dei neutrofili carenti in MPO, riscontrata prolungando i tempi di incubazione, in particolare nei confronti di *Staphylococcus aureus*, essa sembra attribuibile a sistemi microbicide compensatori, che sono attivi anche in assenza di una mieloperossidasi funzionante (Figura 17). Le specie reattive dell'ossigeno, in particolare il perossido di idrogeno, in assenza di mieloperossidasi, non sembrano essere direttamente coinvolte nell'attività di killing, né nelle fasi precoci dell'evento microbicide, né in quelle più tardive: infatti, l'aggiunta di un sistema neutralizzante l' H_2O_2 , come quello rappresentato da glutazione e glutazione-perossidasi non aveva alcun effetto sul killing dei

PMN di controllo, né su quello di PMN privi di attività perossidasi. I flussi di ioni potassio sembrano, almeno parzialmente, implicati nel killing residuo indipendente dalla mieloperossidasi: l'inibizione dei canali di potassio mediante il TEA, un inibitore ad ampio spettro dei canali del potassio, causa infatti una diminuzione del killing di *S. aureus*. Tale inibizione non si osserva usando inibitori selettivi dei BK_{Ca} (iberiotossina e paxillina). Questi risultati non sorprendono: infatti, in contrasto con quanto precedentemente ipotizzato da Ahluwalia e colleghi, è stato recentemente dimostrato che i canali BK_{Ca} sono assenti nei neutrofili umani (Essin et al., 2007). E' possibile quindi, che canali per il K⁺ diversi dai BK_{Ca} siano coinvolti nell'attività microbica residua da noi osservata, indipendente dal sistema MPO-H₂O₂-cloruro. Le nostre conclusioni riguardanti il ruolo dei movimenti di potassio dipendenti dai canali BK_{Ca} nell'evento microbica dei neutrofili sono confortate dai risultati recentemente ottenuti da altri ricercatori che hanno dimostrato che il killing batterico di topi knockout per i canali BK_{Ca} è normale, suggerendo che l'attività di questi canali non costituisce un elemento essenziale della difesa antibatterica (Femling et al., 2006; Essin et al., 2007).

Lavoro realizzato al

Centro di Diagnosi e Ricerca sulla CGD

- Ospedale Universitario di Grenoble -

Resp: Dr. Marie-José Stasia

4.B Studio dei meccanismi molecolari dell'attività microbica dei neutrofili nelle cellule PLB-985

4.B.1 La scelta della linea cellulare PLB-985

I neutrofili sono cellule terminalmente differenziate, prive di capacità proliferative, con una breve emivita e refrattarie alla manipolazione genetica; negli ultimi trent'anni sono state sviluppate varie linee cellulari potenzialmente differenziabili in granulociti; in particolare, le linee cellulari promielocitiche leucemiche umane HL-60 e PLB-985 sono state oggetto di numerosi studi come modello di differenziazione mieloide (Collins et al., 1977; Newberger et al., 1979; Tucker et al., 1987). Si tratta di cellule allo stadio promielocitico che acquisiscono alcune delle caratteristiche funzionali e morfologiche dei granulociti in seguito all'induzione della differenziazione grazie all'uso di composti quali dimetilsolfossido (DMSO), dimetilformammide (DMF), acido retinoico (RA), dibutiril cAMP, soli o in associazione (Tucker et al., 1987; Collins, 1987; Johnston et al., 1992; Gregoire et al., 1998).

Il modello cellulare delle PLB-985 rappresenta uno strumento particolarmente interessante per effettuare studi di rapporto struttura-funzione del complesso NADPH ossidasi. L'equipe di M.C. Dinuer ha infatti creato una linea di PLB-985 knock-out (KO) in cui il gene *CYBB*, codificante per la proteina Nox2 (o gp91*phox*, subunità β del citocromo b₅₅₈), è stato inattivato per ricombinazione omologa (Zhen et al., 1993). Questa linea, che dunque simula il fenotipo di malattia granulomatosa cronica di tipo X91⁰, resta incapace di esibire un burst respiratorio e quindi di generare anioni superossido in seguito all'induzione della differenziazione granulocitica. La transfezione stabile del plasmide contenente il cDNA codificante per la proteina Nox2 permette di ripristinare l'attività ossidasica dopo la differenziazione (cellule "WT-Nox2") (Zhen et al., 1993; Bionda et al., 2004). La transfezione stabile del plasmide "vuoto" (privo, cioè, del cDNA codificante per Nox2), permette di ottenere la linea definita "X-CGD". Secondo questo approccio sperimentale, è inoltre possibile modificare per mutagenesi direzionale il cDNA di Nox2 e clonarlo in un vettore di espressione eucariota, che viene poi transfettato in modo stabile nella linea cellulare delle PLB-985 KO.

Lo studio dell'effetto di determinate modificazioni della proteina Nox2 sul fenotipo delle cellule PLB-985 ha permesso di migliorare la caratterizzazione della sintesi e del funzionamento del complesso NADPH ossidasi. Tra gli studi effettuati e attualmente in corso nel centro di diagnosi

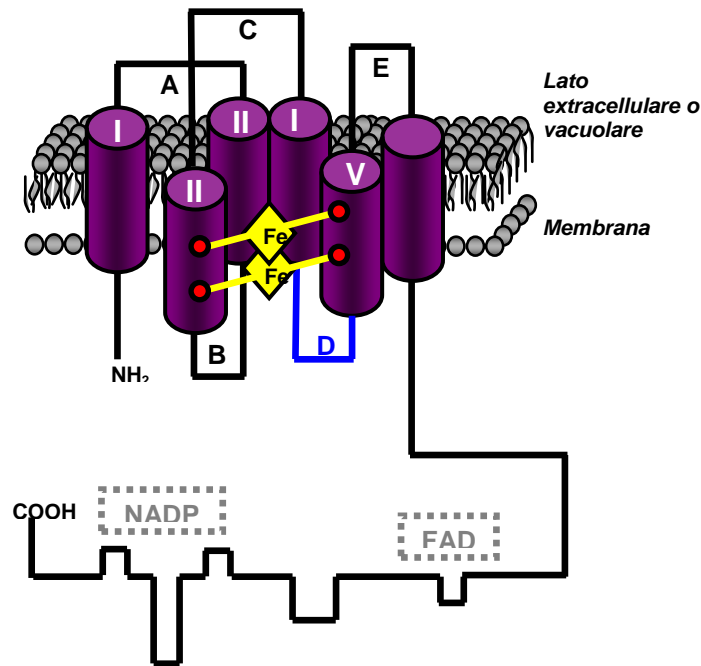
e ricerca sulla malattia granulomatosa cronica dell'ospedale di Grenoble, dove è stato svolto parte del lavoro di questa tesi, citiamo:

- **Riproduzione delle mutazioni umane dei casi CGD X91⁺**: la doppia mutazione His303Asn/Pro304Arg inibisce la traslocazione dei fattori citosolici (Stasia et al., 2002; Bionda et al., 2004); la mutazione Leu505Arg altera l'interazione di p67*phox* con il citocromo b₅₅₈ e la fissazione dell'NADPH (Stasia et al., 2005; Li et al., 2005). L'esistenza di un dominio di fissazione del NADPH comprendente la Pro415 e la Cys537, e un dominio di fissazione del FAD comprendente la Thr341 è stata confermata attraverso studi funzionali *in vitro* e *ex vivo*; sono stati inoltre identificati gli aminoacidi della regione C-terminale citosolica di Nox2 essenziali al processo di assemblaggio del complesso NADPH ossidasi: la Cys369, la Gly408, i residui 507-509, la Leu546 e il Glu568 (Debeurme et al., 2010; in preparazione).
- **Riproduzione delle mutazioni umane dei casi CGD X91⁻** (lavoro di ricerca in corso svolto da Sylvain Beaumel, laboratorio CGD, Grenoble);
- **Studi dei siti funzionali di Nox2 per mutagenesi direzionale**: l' α elica 484-504 è indispensabile per l'attività ossidasica, per l'assemblaggio del complesso ossidasi e per il trasferimento di elettroni dal NADPH al FAD (Li et al., 2007).

4.B.2 Il mutante Dloop_{Nox4}-Nox2

Il laboratorio CGD ha recentemente svolto un lavoro di ricerca sul ruolo della seconda ansa intracitosolica di Nox2 (o loop D, ¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰, Fig. 19A) nell'attivazione del complesso NADPH ossidasi: il cDNA codificante per Nox2 è stato modificato per mutagenesi direzionale a livello della sequenza corrispondente al loop D, clonato nel vettore di espressione eucariota pEF-PGKneo, e successivamente transfettato in modo stabile per elettroporazione nel modello cellulare PLB-985 KO; i cloni sono stati infine selezionati per diluizione limite (cfr. § 3.E.4). I risultati ottenuti hanno dimostrato che il loop D è necessario per il trasferimento di elettroni dal FAD all'ossigeno molecolare attraverso i gruppi eme. Inoltre, la sostituzione della sequenza del loop D con quella proveniente dall'omologa ossidasi Nox4 (Fig. 19B) ha messo in evidenza un significativo aumento dell'attività ossidasica in risposta a stimoli solubili (Li et al., 2005; Carrichon, Defendi et al., 2010; in revisione BBActa).

A :



B :

| | | | | | | | | | | |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 191 | | | | 195 | | | | 200 | |
| D-loop Nox2 | T | S | S | T | K | T | I | R | R | S |
| D-loop Nox4 | • | A | • | • | Y | A | • | • | V | • |

Figura 19: A) Rappresentazione schematica della struttura di Nox2. La seconda ansa citosolica (loop D) di Nox2 è evidenziata in blu. Nelle cellule definite “PLB-985 Dloop_{Nox4}-Nox2”, questa sequenza è stata sostituita con quella dell’omologa ossidasi, Nox4. **B) Mutagenesi del loop D citosolico** ¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰. La prima linea riporta la sequenza amminoacidica wild-type di Nox2; la seconda, la sequenza amminoacidica mutata, corrispondente a quella dell’ossidasi Nox4. I punti indicano i residui amminoacidici conservati nelle due sequenze.

Per lo studio qui presentato sono state utilizzate cellule **PLB-985 WT**, **X-CGD** (cellule transfettate con il vettore privo della parte codificante per Nox2 e quindi caratterizzate dall’assenza di attività ossidasica), **WT-Nox2** (cellule PLB-985 KO transfettate con il cDNA di Nox2) e cellule **Dloop_{Nox4}-Nox2** (cellule PLB-985 KO transfettate con il cDNA di Nox4).

4.B.3 Verifica dell'espressione della NADPH ossidasi

Le cellule PLB-985 sono differenziate in granulociti o pseudo-neutrofili in presenza di 0.5% (v/v) dimetilformammide (DMF), come descritto in Mat. e met. § 3.A.3. Questa differenziazione permette di indurre l'espressione endogena dei componenti di membrana (p22 $phox$ e Nox2) e dei fattori citosolici (p47 $phox$, p67 $phox$ e p40 $phox$) della NADPH ossidasi (Zhen et al., 1993; Pedruzzi et al., 2002).

Tutte le cellule PLB-985 differenziate utilizzate per le nostre ricerche esprimono in modo identico le tre subunità citoplasmatiche del complesso ossidasi.

La verifica dell'espressione di Nox2 viene realizzata ogni qualvolta le cellule vengono rimesse in coltura: è infatti necessario assicurarsi che il ripristino dell'espressione di Nox2, dipendente dall'efficacia della transfezione del vettore di espressione, sia identica in tutti i tipi di cellule transfettate (WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2); in questo modo possiamo essere certi che le variazioni di fenotipo osservate sono dovute a mutazioni a carico di Nox2 e non ad una differenza nel tasso di espressione della proteina. L'aggiunta di geneticina (1,5%) al mezzo di coltura permette di selezionare le cellule che hanno incorporato il vettore eucariota (quest'ultimo possiede infatti il gene di resistenza per l'antibiotico, cfr § 3.A.2). L'espressione di gp91 $phox$ viene quindi verificata in due modi:

A) tramite citometria a flusso (FACS), utilizzando l'anticorpo monoclonale 7D5, diretto contro un epitopo esterno di Nox2 (Mat. e met. § 3.D.1.1);

B) tramite immunorivelazione per western blot (Mat. e met. § 3.C.3).

La Figura 20A mostra i risultati di un esperimento rappresentativo di citometria a flusso concernente la verifica dell'espressione di gp91 $phox$ nelle cellule PLB-985 X-CGD, WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2. Come ci si può attendere, la proteina gp91 $phox$ risulta assente nelle cellule PLB-985 X-CGD, ottenute per transfezione con il vettore vuoto. L'espressione di Nox2 risulta invece paragonabile nei due tipi cellulari PLB-985 WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2.

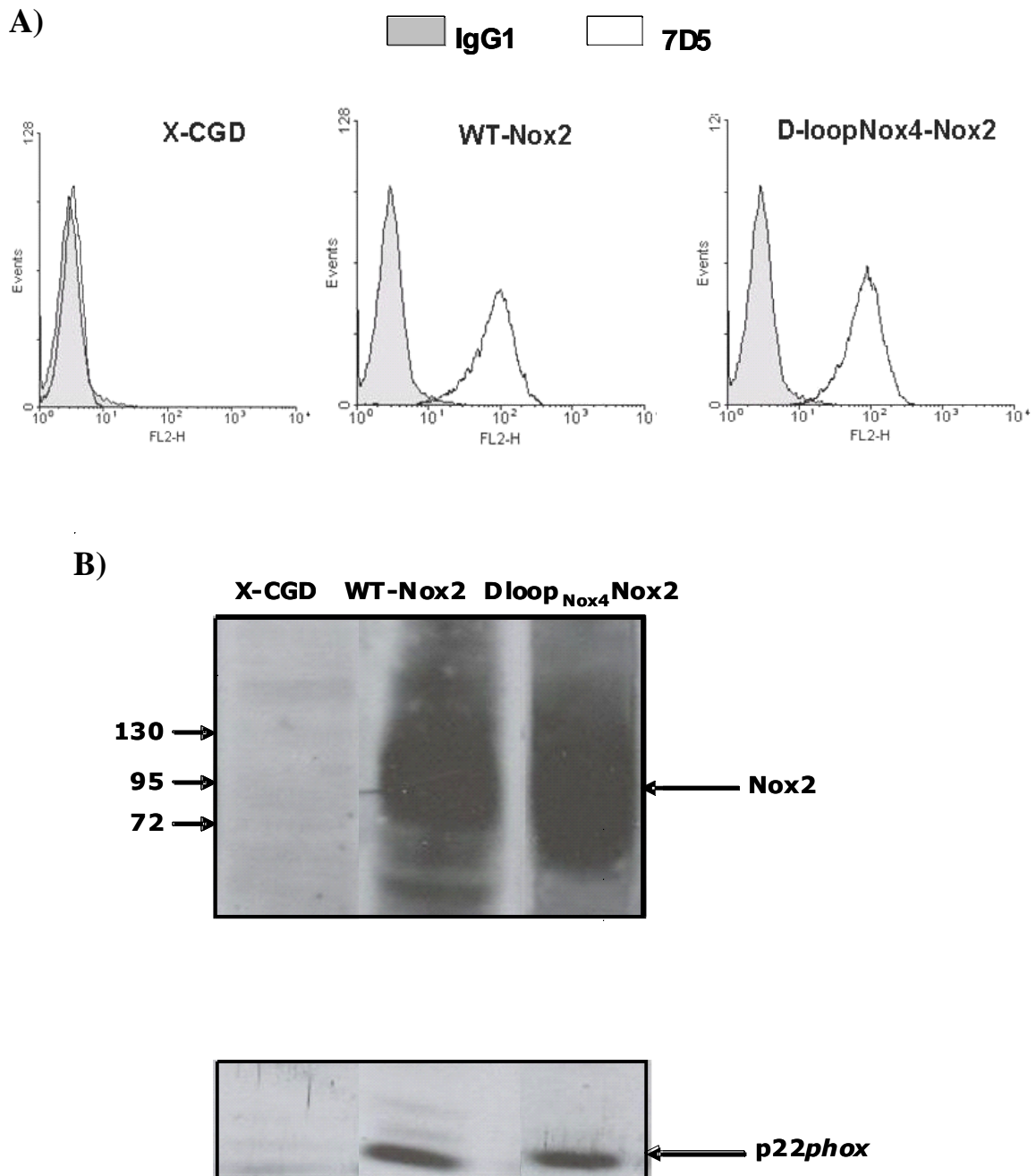


Figura 20: Espressione della proteina Nox2 *wild type* e mutata nelle cellule PLB-985 transfettate.
A) Analisi citofluorimetrica: le cellule ($10^7/\text{mL}$ in PBS addizionato con 0.2% (p/v) di BSA e 1 mM CaCl_2) sono incubate 30 min in ghiaccio con 0.5 μg di mAb 7D5 o IgG1; dopo 3 lavaggi di 10 sec a $10000 \times g$ nello stesso tampone, le cellule sono incubate nelle stesse condizioni con l'anticorpo secondario anti-IgG di topo, coniugato con PE. Al termine dell'incubazione, le cellule subiscono 2 lavaggi nel medesimo tampone e vengono infine risospese in 500 μL dello stesso tampone. I campioni vengono poi conservati in ghiaccio fino alla lettura al citofluorimetro. **B) Immunorivelazione tramite western blot della proteina Nox2 e p22phox:** l'immunorivelazione è realizzata a partire da 30 μg di estratto solubile di membrana in 1% Triton X-100, proveniente dalle cellule X-CGD, WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2 (la marcatura è realizzata con gli anticorpi monoclonali 48 e 449).

In parallelo, la presenza delle due subunità funzionali del citocromo b_{558} , Nox2 e $p22phox$, è stata verificata tramite western blot realizzato sugli estratti solubili di membrana preparati a partire dalle differenti linee di PLB-985 transfettate (§ 3.C.3). I risultati mostrati nella Figura 20B confermano quanto ottenuto dall'analisi citofluorimetrica, dimostrando che nelle linee cellulari PLB-985 WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2 l'espressione della proteina Nox2 è equivalente (la proteina Nox2 migra su una banda larga, che si estende tra 90 e 130 kDa) così come quella della subunità α del citocromo b_{558} , $p22phox$. E' inoltre possibile evidenziare la limitata presenza della proteina $p22phox$ nella linea cellulare PLB-985 X-CGD, a conferma dell'ipotesi di una stabilizzazione reciproca delle due proteine: in assenza di Nox2, la proteina $p22phox$ è espressa in quantità ridotte.

La misura dello spettro di assorbimento differenziale del citocromo b_{558} realizzato a partire dagli estratti solubili di membrana, permette inoltre di rivelare la corretta incorporazione dei gruppi eme e di confermare che la quantità di citocromo b_{558} è equivalente in tutte le nostre linee cellulari PLB-985 transfettate con il cDNA di Nox2 wild-type o mutato (Tabella 3). D'altra parte, risulta evidente la discrepanza rispetto ai neutrofili umani: il contenuto in citocromo b nella linea cellulare PLB-985 è circa 10 volte inferiore a quello nei PMN.

| Cellule | Citocromo b_{558} (pmoli/mg) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| PLB-985 WT | 13.1 ± 1.5 |
| PLB-985 WT-Nox2 | 12.7 ± 1.3 |
| PLB-985 Dloop _{Nox4} -Nox2 | 11.1 ± 0.7 |
| PLB-985 X-CGD | 0 |
| Neutrofili umani | 139.2 ± 19.9 |

Tabella 3: Quantità di citocromo b_{558} (espressa in pmoli/mg di proteine) nelle cellule PLB-985 e nei neutrofili umani. Lo spettro di assorbimento differenziale è realizzato su 80 μ g di estratto solubile di membrana in 1% Triton X100, come descritto in Mat. e met. § 3.C.4. (n=3).

4.B.4 Valutazione simultanea dell'espressione di Nox2 e dell'attività ossidasica tramite citometria a flusso

Questa metodica è stata utilizzata allo scopo di poter valutare simultaneamente l'espressione di gp91 $phox$ e l'attività NADPH ossidasica delle cellule PLB-985 (cfr Mat. e met. § 3.D.1.2).

La Figura 21 riporta il risultato di un esperimento rappresentativo, ottenuto analizzando al citofluorimetro cellule PLB-985 X-CGD, WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2, sottoposte a doppia marcatura e attivate dalla fagocitosi di stafilococchi opsonizzati. I dot plots ottenuti dall'analisi dei due segnali di fluorescenza confermano che l'espressione di Nox2 è equivalente nelle cellule Dloop_{Nox4}-Nox2 e WT-Nox2. Infatti, la media geometrica (G mean) della fluorescenza, indicante la distribuzione della popolazione cellulare in funzione dell'espressione di Nox2 (in ascissa) risulta pari a 30.8 ± 2.5 per le cellule WT-Nox2 e 28.5 ± 2.9 per le cellule Dloop_{Nox4}-Nox2, laddove la popolazione delle cellule X-CGD ha una G mean corrispondente a 3.1 ± 0.8 (n=2-4). E' interessante notare che l'espressione di superficie di Nox2 non viene modificata in seguito all'attivazione con i batteri opsonizzati: la G mean associata alla fluorescenza della DHR nelle cellule resting é infatti di 29.5 ± 1.7 per le WT-Nox2 e 30.4 ± 2.0 per le Dloop_{Nox4}-Nox2. In seguito alla stimolazione da parte dei batteri opsonizzati, la produzione di metaboliti dell'ossigeno da parte delle cellule mutate Dloop_{Nox4}-Nox2 risulta superiore a quella delle cellule WT-Nox2: la G mean associata alla fluorescenza della DHR ossidata (in ordinata) aumenta di circa un fattore 5 per le cellule Dloop_{Nox4}-Nox2 passando da 56.5 ± 5.3 per le cellule a riposo (resting) a 280.6 ± 6.9 per le cellule attivate, mentre nel caso delle cellule WT-Nox2 la G mean aumenta solamente di un fattore 2, passando da 45.8 ± 7.1 per le cellule resting, a 105.3 ± 5.2 per le cellule attivate. Per i neutrofili umani, la G mean della popolazione di cellule attivate è circa 25 volte superiore a quella corrispondente alle cellule a riposo (dati non mostrati). La specificità dell'attivazione del complesso NADPH ossidasi da parte dei batteri opsonizzati è confermata dagli esperimenti condotti preincubando le cellule in presenza di difenileneiodonio (DPI, c.f.: 5 μ M): questo inibitore irreversibile della NADPH ossidasi aboliva totalmente la risposta metabolica di tutti i tipi cellulari analizzati.

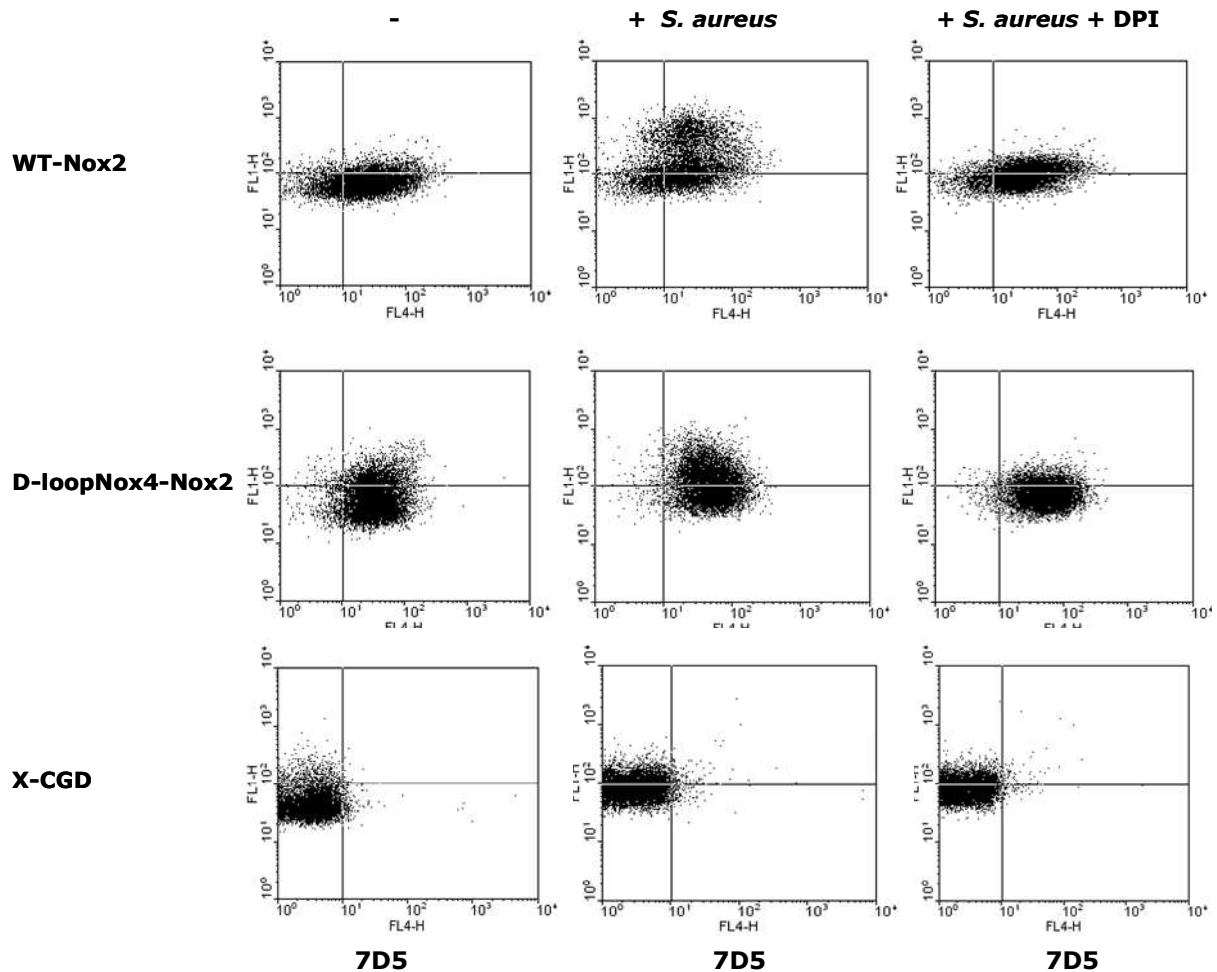


Figura 21: Misura simultanea dell'espressione di Nox2 e dell'attività NADPH ossidasica di cellule differenziate PLB-985 WT-Nox2, Dloop_{Nox4}-Nox2 e X-CGD. L'espressione di Nox2 (in ascissa) è rivelata grazie al mAb 7D5 e all'Ab secondario Alexa Fluor[®] 633 (F(ab')₂) che fluoresce nel canale FL4; l'attività ossidasica (in ordinata) è rilevata grazie all'ossidazione della DHR a rodamina, che fluoresce nel canale FL1. Questa doppia marcatura è realizzata su cellule a riposo (prima colonna), attivate per 15 min con *S. aureus* opsonizzati (MOI 50) in assenza (seconda colonna) o in presenza (terza colonna) di DPI 5 μ M, come descritto in Mat. e met. § 3.D.1.2 La figura mostra i risultati di un esperimento rappresentativo di 4.

4.B.5 Misura del metabolismo ossidativo per chemiluminescenza

- **Stimoli solubili**

L'attività NADPH ossidasica delle cellule differenziate WT-Nox2, Dloop_{Nox4}-Nox2 e X-CGD e dei neutrofili umani è stata misurata per chemiluminescenza, in presenza di luminolo (cfr. § 3.D.2). Le cinetiche di produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) di ogni tipo cellulare sono state caratterizzate e confrontate in base a due parametri: la produzione totale di ROS

(ROS tot) corrispondente alla somma delle unità relative di luminescenza (*relative luminescence units*, RLU) misurate nell’arco di 15, 30 o 60 minuti; il valore di RLU del picco massimo di produzione (RLU max). Gli esperimenti effettuati nel nostro laboratorio hanno evidenziato che le cellule PLB-985 Dloop_{Nox4}-Nox2 rispondono all’attivazione da parte di stimoli solubili (quali PMA, fMLF) attraverso una “super-attività” ossidasica. Quando le cellule sono attivate dal PMA, il picco di produzione di ROS (RLU max) è circa 4 volte più elevato nella linea cellulare Dloop_{Nox4}-Nox2, rispetto alla linea WT-Nox2. Il valore del picco di RLU risulta infatti pari a 10.1 ± 1.8 RLU per le cellule Dloop_{Nox4}-Nox2 e a 2.6 ± 0.4 RLU per le cellule WT-Nox2. (Tabella 4; da Carrichon, Defendi et al., 2010; in revisione BBActa). Inoltre, se prendiamo in considerazione la produzione totale di ROS, la risposta metabolica indotta dal PMA nelle cellule mutanti risulta paragonabile a quella ottenuta con i neutrofili umani (223.0 ± 18.6 RLU per la linea cellulare Dloop_{Nox4}-Nox2 e 249.2 ± 12.6 RLU per i neutrofili umani).

La super-attività NADPH ossidasica delle cellule mutate risulta ancora più evidente in risposta al fMLF: l’attività del mutante Dloop_{Nox4}-Nox2 è infatti circa 5 volte superiore a quella delle cellule WT-Nox2, sia in termini di produzione totale di ROS (146.0 ± 32.6 e 26.7 ± 6.6 RLU rispettivamente), sia in termini di picco massimo della risposta (8.3 ± 1.5 e 1.6 ± 0.5 RLU rispettivamente). Questa super-attività ossidasica della linea cellulare Dloop_{Nox4}-Nox2 non raggiunge tuttavia i valori della risposta metabolica ottenuta con i neutrofili umani, corrispondenti a 341.9 ± 146.4 (somma RLU) e a 14.7 ± 6.8 (RLU max).

| Stimolo | Cellule | Prod. ROS tot (RLU) | RLU max | % ROS tot rispetto a WT-Nox2 |
|-------------|--------------------|---------------------|------------------|------------------------------|
| PMA | PLB X-CGD | 0.5 ± 0.1 | 0 | 0 |
| | PLB WT-Nox2 | 119.6 ± 4.9 | 2.6 ± 0.4 | 100 |
| | PLB DloopNox4-Nox2 | $223.0 \pm 18.6^*$ | $10.1 \pm 1.8^*$ | 187 |
| | Neutrofili | $249.2 \pm 12.6^*$ | $17.6 \pm 2.8^*$ | 208 |
| fMLF | PLB X-CGD | 0.4 ± 0.0 | 0 | 1 |
| | PLB WT-Nox2 | 29.7 ± 6.6 | 1.6 ± 0.5 | 100 |
| | PLB DloopNox4-Nox2 | $146.0 \pm 32.6^*$ | $8.3 \pm 1.5^*$ | 492 |
| | Neutrofili | $341.9 \pm 146.4^*$ | $14.7 \pm 6.8^*$ | 1152 |

Tabella 4: Attività NADPH ossidasica di cellule PLB-985 e di neutrofili umani indotta da stimoli solubili. La produzione di ROS è stata misurata per chemiluminescenza, in presenza di luminolo. Le cellule (10^7 /mL in PBS) vengono incubate per 60 min in presenza di PMA (c.f. 80 ng/mL) o per 15 min in presenza di fMLF (4×10^{-7} M). La produzione totale di ROS rappresenta la somma delle RLU misurate per il tempo di incubazione indicato. RLU max indica il valore del picco massimo di produzione. I dati rappresentano la media \pm DS di almeno 4 esperimenti indipendenti, eseguiti in triplicato. *, $p < 0.05$. (Da Carrichon, Defendi et al., 2010; in revisione BBActa).

- **Stimoli particolati**

Sulla base dei risultati precedentemente ottenuti in risposta a stimoli solubili, abbiamo voluto valutare l'effetto dell'attivazione da parte di stimoli particolati (microorganismi) sul metabolismo ossidativo delle cellule PLB-985. In questi esperimenti, le cellule venivano incubate in presenza di particelle di *S. aureus* o di blastospore di *C. albicans*, precedentemente opsonizzate con 10% siero umano (cfr Mat. e met. § 3.D.2). L'attività ossidativa delle cellule differenziate è misurata per chemiluminescenza, in presenza di luminolo; la reazione è seguita per 30 minuti, con una frequenza di misurazione di 30 secondi. La Figura 22A mostra la cinetica della produzione delle specie reattive dell'ossigeno da parte delle cellule PLB-985 WT-Nox2, Dloop_{Nox4}-Nox2 e X-CGD, utilizzando *S. aureus* come stimolo.

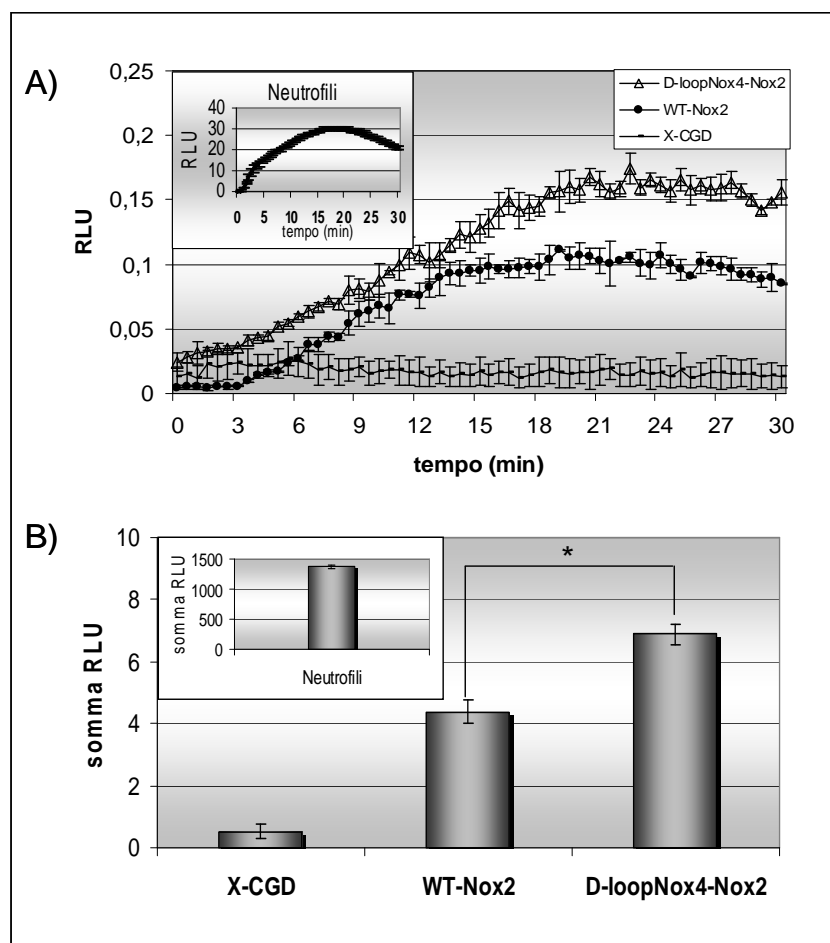


Figura 22 : Produzione di ROS nelle cellule differenziate PLB-985 transfettate e nei neutrofilii umani dopo stimolazione con *S. aureus*. A) Cinetica di produzione di ROS. Le cellule (10^7 /mL in PBS) sono incubate per 30 min in presenza di particelle opsonizzate di *S. aureus* (MOI: 100) I risultati sono espressi come unità di luminescenza relative (RLU). B) Produzione totale di ROS espressa come somma di RLU registrate in 30 min. Questi dati rappresentano la media \pm DS di 5 esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata eseguita con il test *t* di Student su dati appaiati, confrontando i risultati ottenuti per le cellule WT-Nox2 e per le cellule Dloop_{Nox4}-Nox2. *, $P < 0.05$.

Si può notare come la velocità e la durata della cinetica della produzione di ROS siano paragonabili nei neutrofili umani e nelle cellule PLB-985 transfettate: in tutti i tipi cellulari, il picco massimo di attività viene raggiunto dopo circa 20 minuti dall'aggiunta dello stimolo (Figura 22A). Risulta evidente come l'attività ossidasica della linea cellulare PLB-985 sia notevolmente inferiore rispetto ai neutrofili umani (circa 180 volte più bassa). Tuttavia, confrontando tra loro i dati relativi alla produzione totale di ROS da parte delle differenti linee cellulari transfettate, riscontriamo che la “super-attività” ossidasica delle cellule PLB Dloop_{Nox4}-Nox2 rilevata in risposta a stimoli solubili, risulta confermata in seguito all'attivazione da parte di *S. aureus*. L'istogramma della Figura 22B mostra infatti che la differenza tra la risposta metabolica delle cellule PLB Dloop_{Nox4}-Nox2 e le cellule WT-Nox2 è statisticamente significativa. L'aggiunta di DPI (c.f.: 5 µM) aboliva totalmente il burst ossidativo delle cellule (dati non mostrati).

Risultati analoghi sono stati ottenuti misurando, tramite chemiluminescenza, il burst respiratorio delle PLB-985 transfettate indotto da blastospore opsonizzate di *C. albicans* (Figura 23). Rispetto a quanto osservato in seguito all'attivazione da *S. aureus*, la cinetica della risposta metabolica delle PLB-transfettate e dei neutrofili in seguito all'attivazione da parte di *C. albicans* risulta molto più rapida (il picco di produzione dei metaboliti reattivi dell'ossigeno è raggiunto entro i primi 3-4 minuti dall'aggiunta dello stimolo) e si esaurisce più rapidamente. La produzione totale di ROS da parte delle cellule PLB-985 transfettate risulta ancora una volta inferiore rispetto a quella ottenuta con i neutrofili umani, ma la differenza nell'attività metabolica di questi due tipi cellulari appare meno importante rispetto a quanto ottenuto in risposta allo *S. aureus* (circa 8 volte più bassa nelle PLB-985). Nel caso della stimolazione da parte di *C. albicans*, l'attività ossidasica totale del mutante Dloop_{Nox4}-Nox2 risulta superiore di circa il 70% rispetto alle cellule WT-Nox2 (2.6 ± 0.4 e 1.5 ± 0.4 RLU rispettivamente).

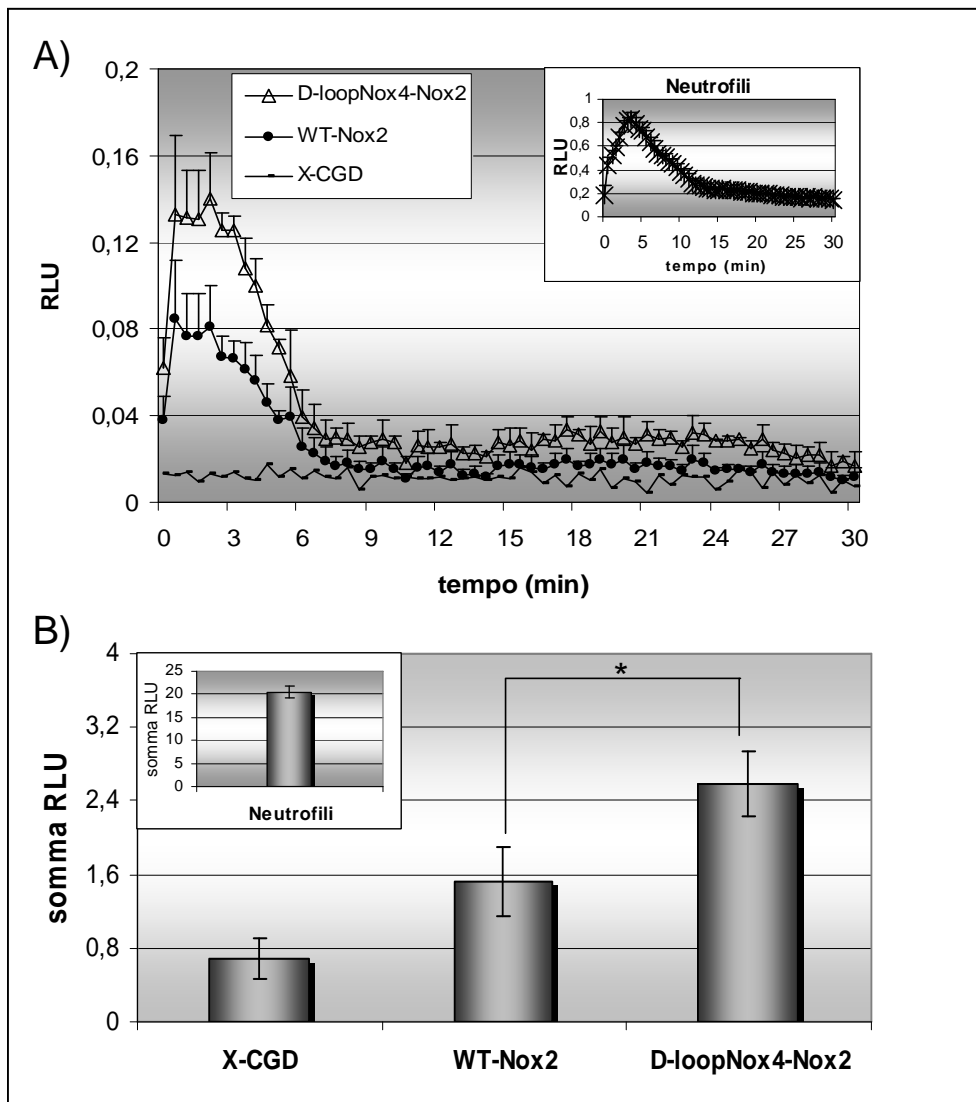


Figura 23 : Produzione di ROS nelle cellule differenziate PLB-985 transfettate e nei neutrofilii umani dopo stimolazione da *C. albicans*. A) Cinetica di produzione di metaboliti reattivi dell'ossigeno. Le cellule ($10^7/\text{mL}$ in PBS) sono incubate per 30 min in presenza di blastospore opsonizzate di *C. albicans* (MOI: 30). I risultati sono espressi come unità di luminescenza relative (RLU). B) Produzione totale di ROS espressa in somma di RLU registrate in 30 min. Questi dati rappresentano la media \pm DS di 4 esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata eseguita con il test *t* di Student su dati appaiati, confrontando i risultati ottenuti per le cellule WT-Nox2 e per le cellule Dloop_{Nox4}-Nox2. *, $P < 0.05$.

4.B.6 Valutazione dell'attività microbica di cellule PLB WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2

Dopo aver dimostrato che il mutante Dloop_{Nox4}-Nox2 mostra, rispetto alle cellule WT-Nox2, un'attività ossidativa aumentata nei confronti di stimoli particolati quali i patogeni *S. aureus* e *C. albicans*, abbiamo voluto verificare ciò si riflettesse anche in una potenziata attività microbica di queste cellule nei confronti degli stessi microorganismi, il cui killing è noto

essere strettamente dipendente dai processi ossidativi (questa tesi, § 4.A.1; Rada et al., 2004). Questa serie di esperimenti è stata effettuata applicando il metodo di misura dell'attività microbica dei neutrofili messo recentemente a punto presso il Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste (Decleva et al. 2006).

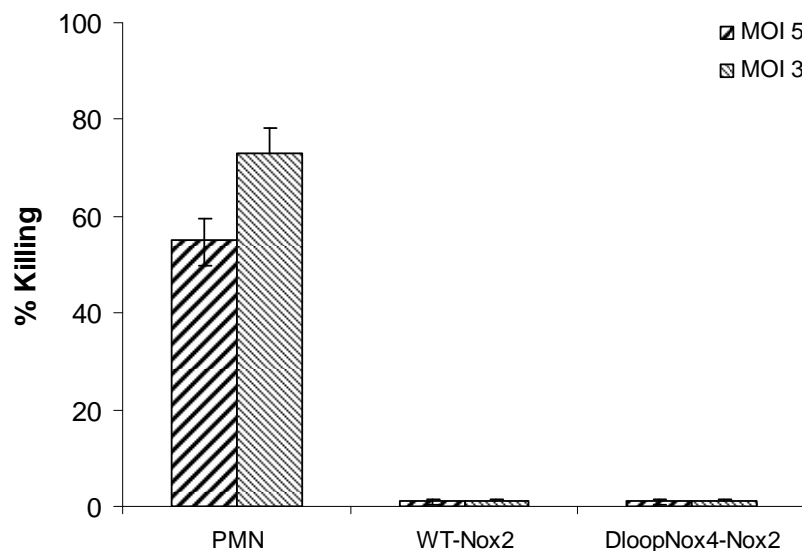


Figura 24: Attività stafilocida di PMN umani, cellule PLB-985 WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2. Le cellule (5×10^6 in PBS-ioni) venivano preincubate 10 minuti a 37°C prima dell'aggiunta dei batteri opsonizzati, in modo da avere una MOI pari a 5 o 3 (c.f. PMN: 4×10^6 /mL). Al termine dell'incubazione, aliquote delle sospensioni cellulari venivano lisate in H₂O a pH 11, diluite in 0,9% NaCl e seminate in piastra Petri come descritto nella sezione Mat. e met. § 3.F. I dati, espressi come percentuale di stafilococchi uccisi dopo 30' di fagocitosi rispetto all'inoculo iniziale (tempo 0' di fagocitosi) sono la media \pm ds di 5 (PMN) e 4 (PLB) esperimenti condotti in duplicato.

Dal grafico riportato in Figura 24 risulta evidente come il potenziale microbica delle cellule PLB-985 sia nettamente inferiore rispetto a quello dei neutrofili umani: quando la MOI (multiplicity of Infection, numero di batteri per neutrofilo) era pari a 3 o 5 (rapporto utilizzato abitualmente nei saggi con i PMN), non vi era killing batterico da parte delle cellule PLB-985, mentre la percentuale di stafilococchi uccisi dai neutrofili era superiore al 50% per entrambi i rapporti cellule:batteri utilizzati. Abbiamo quindi stabilito di ridurre il valore di MOI a 0,5, corrispondente quindi a 2 cellule per 1 microorganismo.

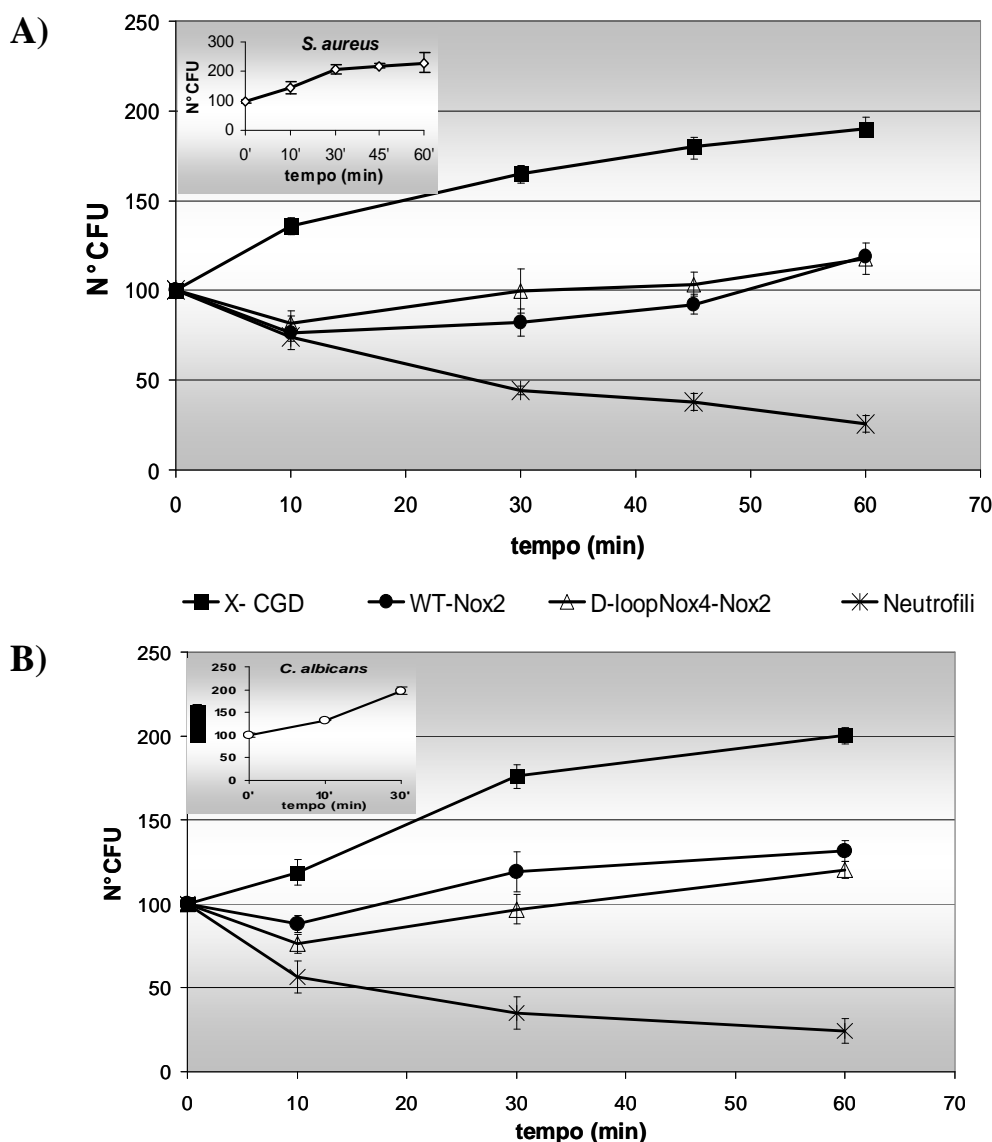


Figura 25: Cinetiche di attività stafilocida (A) e candidacida (B) di cellule PLB-985 transfettate e neutrofili umani. Le condizioni sperimentali sono quelle riportate in fig. 24, con una MOI pari a 0.5. I dati, espressi in termini di unità formanti colonie (CFU), sono la media \pm DS di 8 (PLB-985) e 5 (neutrofili) esperimenti condotti in duplicato. Inserti: andamento della crescita degli stafilococchi e delle candide incubati in assenza di cellule.

La Figura 25A mostra i risultati ottenuti nella valutazione del killing di *S. aureus*. Risulta evidente come, pur riducendo il rapporto batteri:cellule, l'attività stafilocida delle cellule PLB-985 transfettate resta nettamente inferiore rispetto a quella dei neutrofili umani ad ogni tempo di incubazione, eccetto che a 10 minuti di fagocitosi. Infatti, nei primi minuti di incubazione con i batteri, il killing delle cellule PLB-985 WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2 risulta sovrapponibile a quello dei neutrofili umani; tuttavia, mentre l'attività stafilocida di questi ultimi prosegue anche

dopo 30, 45 e 60 minuti di incubazione, il killing delle cellule PLB-985 WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2 sembra arrestarsi dopo i primi 10 minuti di contatto; prolungando il tempo di fagocitosi infatti la crescita degli stafilococchi prende il sopravvento.

Appare inoltre evidente come non vi sia alcuna sostanziale differenza tra le cinetiche di killing delle cellule Dloop_{Nox4}-Nox2 e quella delle cellule PLB WT-Nox2.

Le cellule PLB X-CGD, caratterizzate, lo ricordiamo, da assenza di attività NADPH ossidasi, non sono in grado di uccidere lo stafilococco aureo.

Una serie analoga di esperimenti è stata effettuata utilizzando come patogeno il fungo *C. albicans*. I risultati ottenuti sono mostrati in Figura 25B. Diversamente da quanto osservato nel caso dello stafilococco, l'attività di killing delle cellule WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2 nei confronti di *C. albicans* risulta più debole rispetto ai neutrofili umani anche a 10 minuti di incubazione. Trascorso questo lasso di tempo, la crescita delle blastospore riprende, analogamente a quanto visto in precedenza per lo stafilococco. L'attività candidacida dei PMN, invece, prosegue anche dopo 45 e 60 minuti di incubazione con le blastospore. Il potenziale candidacida delle cellule PLB Dloop_{Nox4}-Nox2 appare, peraltro, leggermente superiore a quello delle cellule WT-Nox2: a 10 minuti di fagocitosi il numero di CFU osservato per le cellule Dloop_{Nox4}-Nox2 è di 76.2 ± 5.5 , mentre per le cellule WT-Nox2 è di 88.7 ± 5.2 ; a 30 minuti di fagocitosi, il numero di CFU risulta pari a 96.6 ± 8.7 per le cellule mutanti, rispetto a 119.2 ± 8.7 per le WT-Nox2; la differenza rimane tuttavia non significativa per entrambi gli intervalli di tempo considerati. Le cellule PLB X-CGD non manifestano, come ci si attende, alcuna attività candidacida.

Infine, abbiamo voluto testare l'attività battericida delle cellule PLB-985 transfettate nei confronti di un microorganismo il cui killing risulta efficace anche in assenza di attività NADPH ossidasi, il battere *E. coli* (questa tesi, § 4.A.1; Rada et al., 2004; Decleva et al., 2006).

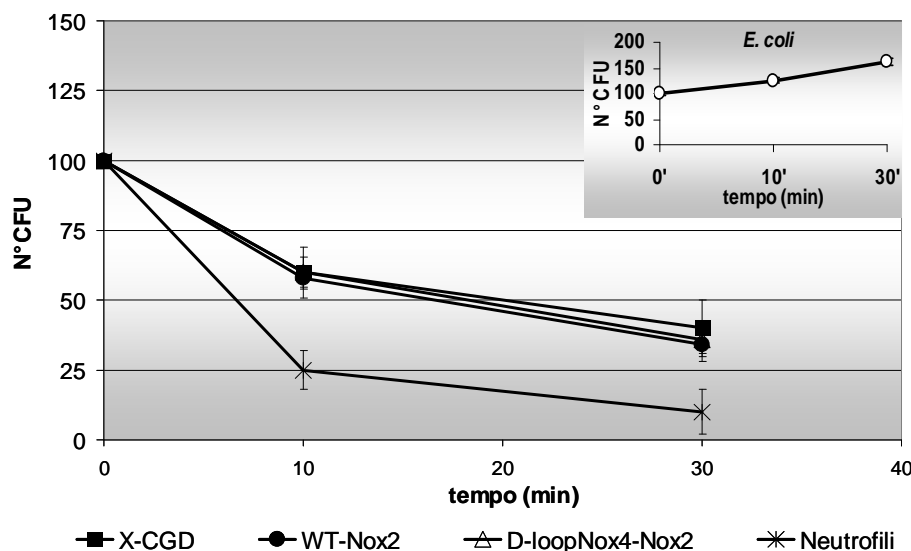


Figura 26: Cinetiche di killing di *E. coli* da parte di cellule PLB-985 transfettate e neutrofili umani. Le condizioni sperimentali sono quelle riportate in fig. 24, con un rapporto cellule:batteri di 1:1. I dati, espressi in termini di unità formanti colonie (CFU), sono la media \pm DS di 2 (cellule PLB-985) e 3 (neutrofili) esperimenti condotti in duplicato. Insetto, andamento della crescita di *E. coli* incubati in assenza delle cellule.

La Figura 26 mostra che tutte le nostre cellule PLB-985 transfettate, comprese le PLB X-CGD, prive di una NADPH ossidasi funzionale, sono in grado di uccidere questi microorganismi in modo paragonabile tra loro. Tuttavia, il killing delle cellule PLB-985 rimane difettoso: infatti, il killing di *E. coli* da parte dei neutrofili è praticamente completo (90 ± 8.1 %) a 30 minuti minuti di fagocitosi, diversamente da quanto osservato con le cellule PLB-985.

4.B.7 Caratterizzazione dei compartimenti intracellulari delle cellule PLB-985

Sulla base dei risultati ottenuti, ci siamo chiesti se il grave difetto di attività microbica riscontrato nelle cellule PLB-985 fosse dovuto, oltre che ad un ridotto livello di citocromo b_{558} (un decimo rispetto ai neutrofili umani), e quindi ad un ridotto metabolismo ossidativo, anche ad un difetto di attivazione delle proteine microbicide contenute nei granuli citoplasmatici, che nel loro insieme costituiscono i meccanismi microbicidi ossigeno-indipendenti. Il killing dei microorganismi è infatti strettamente connesso alla capacità della cellula di mobilitare i propri

granuli citoplasmatici: le proteine granulari citotossiche rilasciate permettono l'uccisione e la degradazione dei microbi internalizzati nel fagolisosoma (cfr. Introduzione, § 1.C.1). Ci siamo quindi proposti, in un secondo momento, di studiare i granuli intracitoplasmatici della linea cellulare PLB-985, analizzando in particolare:

- nei granuli primari: il contenuto e il rilascio di mieloperossidasi (MPO), elastasi, catepsina G e β -glucuronidasi;
- nei granuli secondari: il contenuto e il rilascio di lattoferrina, lisozima e collagenasi (o MMP8);
- nei granuli terziari: il contenuto e il rilascio di gelatinasi (o MMP9);
- nelle vescicole secretorie, il contenuto e il rilascio di CD11b.

Per caratterizzare la composizione dei granuli intracitoplasmatici abbiamo scelto di lavorare con le cellule PLB-985 di tipo WT: queste cellule, lo ricordiamo, presentano infatti un contenuto di citocromo b_{558} paragonabile a quello delle cellule PLB-985 transfettate WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2 (e pari a circa un decimo del citocromo b_{558} nei PMN; cfr Tabella 3); le cellule WT esibivano inoltre una risposta metabolica ed un'attività microbica sovrapponibili a quelle delle cellule PLB transfettate. La caratterizzazione dei granuli citoplasmatici è stata effettuata seguendo parallelamente la progressione della differenziazione (indotta dal dimetilformammide, DMF), in modo da poter esaminare l'evoluzione della comparsa dei markers granulari durante la maturazione delle cellule PLB lungo la via mieloide e valutare quindi l'efficacia della differenziazione nel fenotipo granulocitico. I risultati ottenuti con questa linea cellulare vengono di volta in volta paragonati a quelli ottenuti con neutrofili umani.

Per confrontare l'esocitosi dai diversi compartimenti granulari, i risultati presentati in seguito sono espressi in termini di:

➤ **Attività Totale (A. tot):** Unità totali di enzima, o quantità di enzima che catalizza la conversione di una micromole di substrato al minuto;

➤ **Percentuale di rilascio (% rilascio) :**
$$\frac{\text{A. Tot surnatante attivato} \times 100}{\text{A. Tot surnatante e pellet attivati}}$$

4.B.7.1 Valutazione della differenziazione delle cellule PLB-985 WT

Per valutare il grado di differenziazione delle cellule PLB WT ed il livello di maturazione granulocitica raggiunto, utilizziamo come “marker” la produzione di specie reattive dell’ossigeno, misurata in termini di chemiluminescenza indotta da fMLF. L’attività NADPH ossidasica di queste cellule è infatti proporzionale al grado di differenziazione, e raggiunge l’apice al sesto giorno di differenziazione in presenza di DMF (Figura 27) (Bionda et al., 2004).

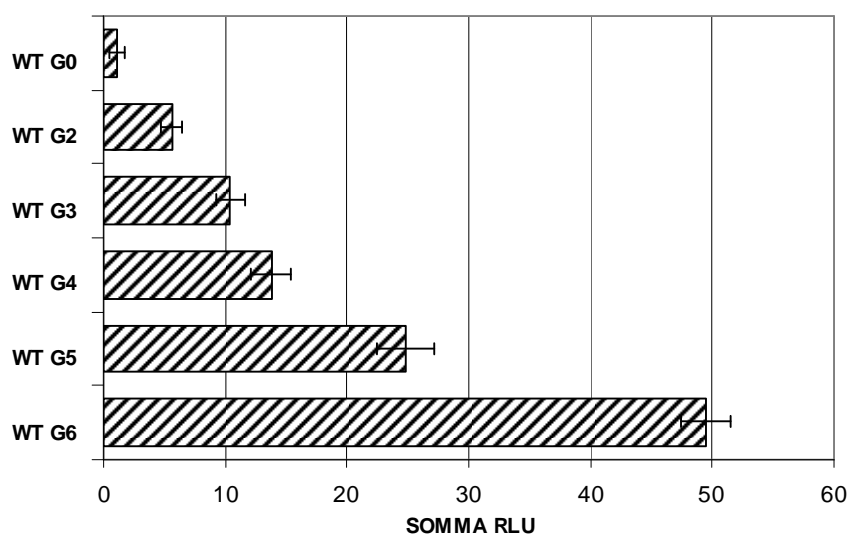


Figura 27: Metabolismo ossidativo di cellule PLB-985 WT indifferenziate (G0) e differenziate (G2 – G6) stimulate con fMLF. Le cellule ($10^7/\text{mL}$) sono incubate per 30 min in presenza di fMLF (c.f. 10^{-7} M) La produzione totale dei metaboliti dell’ossigeno è espressa in termini di somma delle RLU registrate in 30 min. Questi dati rappresentano la media \pm DS di almeno 5 esperimenti indipendenti condotti in duplicato (n=5-8).

4.B.7.2 Dosaggio delle proteine

Questo saggio viene effettuato mediante la metodica dell’acido bicinconinico (Mat. e met., § 3.C.1b). La Tabella 5 riporta l’insieme dei dati raccolti in questa serie di esperimenti; la concentrazione è espressa in microgrammi di proteine per millilitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

| | Surnatante (+ fMLF) | Pellet (+ fMLF) | Lisato cell. (- fMLF) |
|--------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| PMN | 205.5 ± 88.4 | 919.3 ± 188.5 | 1142.3 ± 206.6 |
| WT G0 | 38.4 ± 12.3 | 840.8 ± 82.9 | 839.7 ± 67.5 |
| WT G2 | 22.8 ± 5.8 | 792.5 ± 186.5 | 826.1 ± 89.6 |
| WT G3 | 22.1 ± 9.8 | 805.0 ± 176.4 | 851.6 ± 94.6 |
| WT G4 | 29.4 ± 17.1 | 836.7 ± 157.3 | 899.5 ± 77.4 |
| WT G5 | 30.8 ± 14.8 | 767.8 ± 192.5 | 794.2 ± 118.4 |
| WT G6 | 35.2 ± 11.9 | 852.8 ± 168.9 | 914.9 ± 84.3 |

Tabella 5: Concentrazione proteica dei campioni provenienti dall'esocitosi di PMN e cellule PLB-985. Le proteine sono dosate nei campioni sottoposti al saggio di degranolazione secondo la metodica descritta in Mat e met. § 3.C.1b. I dati, espressi in termini di µg di proteine per mL, rappresentano la media ± DS di almeno 6 esperimenti (n=6-9).

Osservando questi dati notiamo che nelle cellule PLB WT, sia indifferenziate, che a qualsiasi fase della loro differenziazione (da G2 a G6), la concentrazione proteica dei surnatanti di esocitosi ottenuti dopo stimolazione con fMLF è circa 5 volte inferiore rispetto a quella relativa ai neutrofili; invece, la quantità di proteine ritrovata nei pellets è paragonabile a quella dei neutrofili.

4.B.7.3 Test di vitalità cellulare: dosaggio della LDH

Allo scopo di verificare l'assenza di perturbazioni della permeabilità della membrana cellulare durante il saggio di degranolazione, viene effettuata regolarmente una valutazione della vitalità delle cellule tramite il test della lattato deidrogenasi (LDH). Questo saggio, che permette di dosare la LDH nei surnatanti e nei pellets ottenuti dalla degranolazione, oltre che nel lisato cellulare, va svolto nelle ore immediatamente successive al test di esocitosi per evitare la degradazione dell'enzima. La Tabella 6 riporta i risultati ottenuti dal dosaggio spettrofotometrico della lattato deidrogenasi nei campioni sottoposti al saggio di esocitosi (cfr. Mat. e met. § 3.H.1).

| | Surnatante (+ fMLF) | Pellet (+ fMLF) | Lisato cell. (- fMLF) |
|--------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| PMN | 99.3 ± 20.5 | 2608.9 ± 41.5 | 2685.3 ± 13.0 |
| WT G0 | 93.0 ± 11.4 | 2545.1 ± 21.6 | 2672.5 ± 29.4 |
| WT G2 | 92.8 ± 18.7 | 2622.5 ± 24.3 | 2703.4 ± 43.6 |
| WT G3 | 99.7 ± 22.9 | 2526.9 ± 26.5 | 2638.9 ± 41.0 |
| WT G4 | 96.8 ± 17.9 | 2726.4 ± 23.4 | 2848.6 ± 19.7 |
| WT G5 | 102.8 ± 12.7 | 2067.6 ± 27.0 | 2198.5 ± 33.7 |
| WT G6 | 101.1 ± 16.6 | 2415.4 ± 26.2 | 2507.7 ± 31.3 |

Tabella 6: Dosaggio della lattato deidrogenasi (LDH) nei campioni di esocitosi dei PMN e delle cellule PLB WT. I dati sono espressi come attività totale della LDH in UI/L ritrovata nei surnatanti delle cellule attivate o meno con fMLF e nel lisato delle cellule non stimolate. Le condizioni sperimentali sono descritte nella sezione Mat. e met. § 3.H.1. I risultati rappresentano la media ± DS di almeno 4 esperimenti (n=4-9).

Possiamo notare come, per tutte le cellule esaminate, l'attività enzimatica ritrovata nei surnatanti di esocitosi sia trascurabile rispetto all'attività totale del lisato cellulare. Il rilascio della lattato deidrogenasi nel surnatante di esocitosi è in media pari a $3.8 \pm 0.4\%$ per tutte le cellule analizzate. Si può pertanto concludere che il saggio di degranolazione non induce un significativo rilascio di LAD, ovvero non altera la permeabilità della membrana plasmatica.

4.B.7.4 Dosaggio della mieloperossidasi (MPO)

Per valutare la quantità di mieloperossidasi, enzima marker dei granuli azurofili, contenuta nelle cellule PLB abbiamo eseguito il saggio di ossidazione della *o*-dianisidina, secondo le modalità descritte in Mat. e met. § 3.H.2. I risultati ricavati da questa serie di esperimenti sono presentati in Tabella 7 come attività enzimatica totale (mmoli/min/10⁶ cellule) e in Figura 28 come percentuale di rilascio dell'enzima nei surnatanti di esocitosi delle cellule attivata da fMLF.

| | Surnatante (+ fMLF) | Pellet (+ fMLF) | Lisato cell. (-fMLF) |
|--------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| PMN | 665.0 ± 82.0 | 266.4 ± 35.1 | 1037.9 ± 87.8 |
| WT G0 | 101.5 ± 19.9 | 418.2 ± 104.7 | 481.7 ± 53.4 |
| WT G2 | 55.4 ± 11.7 | 198.7 ± 31.3 | 236.9 ± 17.3 |
| WT G3 | 67.9 ± 14.4 | 242.9 ± 60.5 | 277.3 ± 24.3 |
| WT G4 | 97.4 ± 14.8 | 208.7 ± 0.7 | 299.9 ± 7.4 |
| WT G5 | 135.0 ± 81.1 | 302.4 ± 88.0 | 415.3 ± 27.8 |
| WT G6 | 282.7 ± 63.4 | 667.4 ± 85.8 | 897.9 ± 31.5 |

Tabella 7: Dosaggio della MPO nei neutrofili umani e nelle cellule PLB-985 WT. Le condizioni sperimentali sono quelle descritte nel capitolo Mat. e met., § 3.H.2. I dati, che rappresentano la media ± DS dell'attività totale (in mmoli/min/10⁶ cellule), sono espressi come quantità di mieloperossidasi rilasciata (surnatante), quantità rimanente nelle cellule (pellet) dopo attivazione con fMLF, quantità presente nel lisato della sospensione di cellule non attivate (Lisato cell.) (n=3-7).

Risulta evidente dai dati esposti in tabella che la quantità di mieloperossidasi ritrovata nei surnatanti delle cellule PLB-985 WT attivate da fMLF e nei lisati delle cellule inattivate, è nettamente inferiore a quella ritrovata nei neutrofili umani, a qualsiasi fase della differenziazione. Prendendo in considerazione i valori relativi alla quantità di MPO nei surnatanti delle cellule attivate, si assiste peraltro ad un incremento dell'attività enzimatica parallelamente alla progressione della maturazione cellulare (da G2 a G6): infatti, l'attività totale della MPO a G2 di differenziazione è circa 12 volte inferiore rispetto all'attività enzimatica ritrovata nei PMN (55.4 ± 11.7 e 665.0 ± 82.0 mmoli/min/10⁶ cellule, rispettivamente), mentre a differenziazione terminata (G6) l'attività della MPO è circa 2 volte più bassa che nei PMN (282.7 ± 63.4 e 665.0 ± 82.0 mmoli/min/10⁶ cellule, rispettivamente). Considerando invece i valori relativi all'attività enzimatica nei lisati delle cellule inattivate, si può notare come la differenza tra le cellule PLB-985 WT e i PMN sia meno flagrante: nelle cellule a G2 di differenziazione la quantità di MPO è solamente 2 volte inferiore a quella dei PMN (481.7 ± 53.4 e 1037.9 ± 87.8 mmoli/min/10⁶ cellule, rispettivamente), e nelle cellule a G6 di differenziazione (897.9 ± 31.5 mmoli/min/10⁶ cellule) ritroviamo quantità di MPO paragonabili a quelle dei neutrofili umani.

La Figura 28 evidenzia, rispetto ai PMN, il difetto di secrezione della MPO da parte della linea cellulare PLB-985 la capacità di esocitosi delle PLB-985 aumenta con il progredire della maturazione cellulare: la percentuale più bassa di rilascio dell'enzima si ha infatti nelle cellule indifferenziate (WT G0: $20,5 \pm 1,7\%$), quella più elevata al sesto giorno di differenziazione in presenza di DMF (WT G6: $36,1 \pm 6,1\%$); tuttavia, la % di rilascio dell'enzima si mantiene sempre inferiore a quella dei PMN ($64,6 \pm 3,4\%$), nonostante le attività totali nei lisati siano paragonabili (rispettivamente, $897,9 \pm 31,5$ e $1037,9 \pm 87,8$ mmloi/min/ 10^6 cellule).

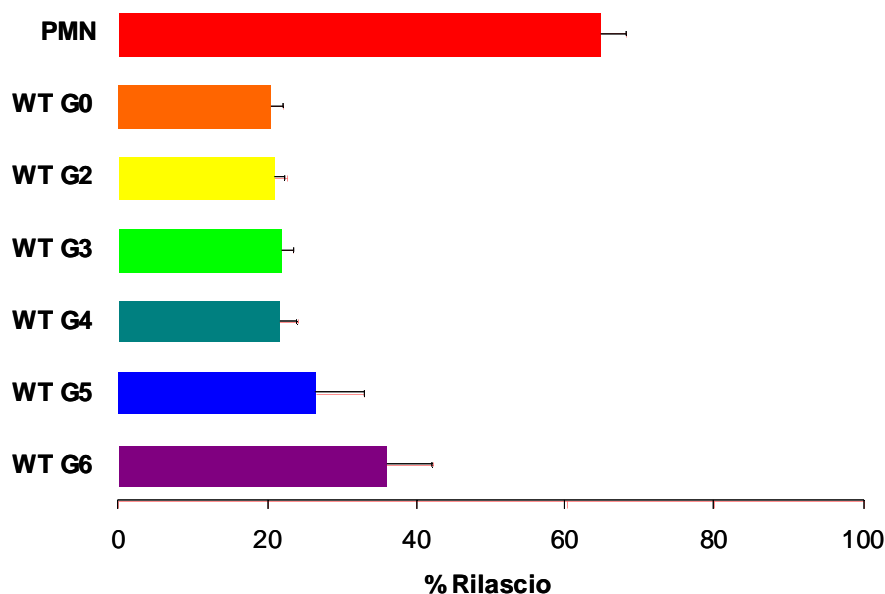


Figura 28: Rilascio della MPO nei surnatanti di esocitosi di PMN e cellule PLB-985 WT. I dati, espressi in termini di % di rilascio, rappresentano la media \pm DS di almeno 4 esperimenti condotti in duplicato (n=4-7).

4.B.7.5 Dosaggio dell'elastasi

Il dosaggio dell'elastasi, enzima marker dei granuli azurofili, viene effettuato secondo il test fluorimetrico descritto in Mat. e met., § 3.H.3. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 8.

| | Surnatante (+ fMLF) | Pellet (+ fMLF) | Lisato cell. (- fMLF) |
|--------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| PMN | 1889.4 ± 86.3 | 2620.4 ± 112.1 | 4366.9 ± 173.5 |
| WT G0 | 0.0 ± 0.0 | 269.3 ± 73.3 | 259.5 ± 38.8 |
| WT G2 | 0.0 ± 0.0 | 185.4 ± 46.7 | 201.7 ± 24.6 |
| WT G3 | 0.0 ± 0.0 | 200.5 ± 53.9 | 216.3 ± 29.4 |
| WT G4 | 15.3 ± 2.7 | 287.6 ± 53.3 | 303.1 ± 36.2 |
| WT G5 | 15.3 ± 5.2 | 281.9 ± 17.3 | 250.4 ± 41.3 |
| WT G6 | 33.9 ± 14.8 | 641.8 ± 13.6 | 679.3 ± 50.1 |

Tabella 8: Dosaggio dell’elastasi in neutrofili umani e cellule PLB-985 WT. Le condizioni sperimentali sono quelle riportate in nel § 3.H.3. I dati sono espressi come quantità di elastasi rilasciata (surnatante), quantità rimanente nelle cellule (pellet) dopo attivazione con fMLF, e quantità totale inizialmente presente (lisato della sospensione di cellule non stimolate). I valori assoluti rappresentano la media ± DS dell’attività totale (in $\mu\text{grammi}/\text{min}/10^6$ cellule) calcolata a partire da almeno 4 esperimenti (n=4-8).

E' interessante notare che nelle cellule PLB-985 WT, in corrispondenza delle fasi iniziali della maturazione granulocitica (da G0 a G3), l’attività dell’elastasi è assente nei surnatanti di esocitosi. Quando le cellule raggiungono gli stadi avanzati della maturazione granulocitica (da G4 a G6 di differenziazione) è possibile misurare l’attività enzimatica in queste frazioni cellulari. La quantità di elastasi ritrovata nel lisato dei neutrofili non attivati ($4366.9 \pm 173.5 \mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellule) risulta essere da 6 (PLB WT G6, $679.3 \pm 50.1 \mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellule) a 20 volte (PLB WT G2, $201.7 \pm 24.6 \mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellule) superiore.

Come osservato in precedenza nel caso della MPO, anche il rilascio dell’elastasi da parte di questa linea cellulare appare nettamente compromesso: la quantità d’enzima ritrovata nei surnatanti delle cellule PLB WT (da G4 a G6) attivate corrisponde mediamente al $5.1 \pm 1.3\%$ della quantità di elastasi totale contenuta in queste cellule, laddove il rilascio di questo stesso enzima da parte dei neutrofili attivati dall’fMLF raggiunge valori pari a circa il $45.6 \pm 6.7\%$ (Figura 29).

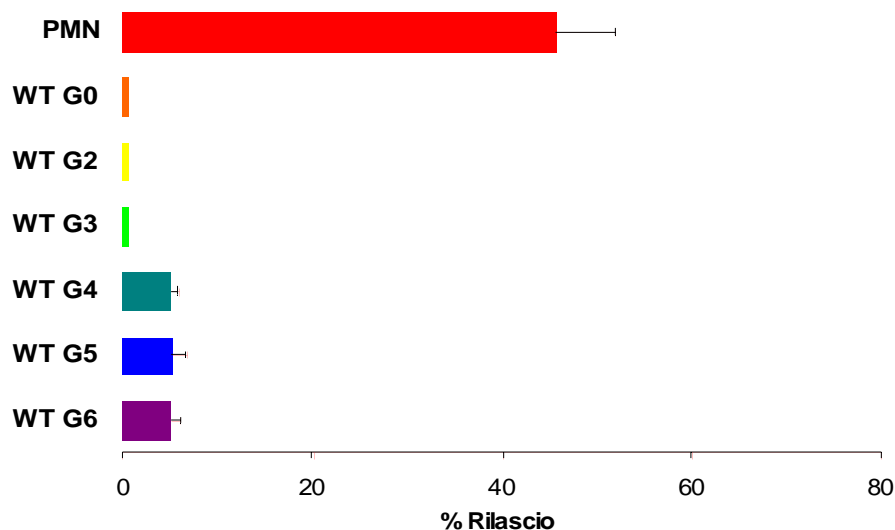


Figura 29: Rilascio dell’elastasi nei surnatanti di esocitosi di cellule PLB-985 WT e PMN umani. Il dosaggio enzimatico è effettuato secondo la procedura descritta nella sezione Mat. e met. (§ 3.H.3). I dati rappresentano la media \pm DS di almeno 3 esperimenti indipendenti condotti in duplicato (n=3-6).

4.B.7.6 Dosaggio della catepsina G

La catepsina G, un altro enzima marker dei granuli azurofilari dotato di attività antimicrobica, è stata quantificata attraverso il saggio colorimetrico descritto in Mat. e met., § 3.H.4; la Tabella 9 mostra l’attività totale della catepsina G riscontrata nei campioni di esocitosi delle cellule attivate dall’fMLF. Dai risultati presentati in tabella risulta evidente che l’attività enzimatica della catepsina G è gravemente compromessa in tutte le cellule PLB-985 WT, a qualsiasi stadio della maturazione in granulociti: se consideriamo i valori di attività enzimatica totale ottenuti a partire dal lisato delle cellule a riposo, la quantità di catepsina G ritrovata in questa linea cellulare è da 3 (WT G6, $14.2 \pm 4.3 \mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellule) a 30 volte (WT G0, $1.7 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellule) inferiore rispetto ai neutrofili ($50.9 \pm 8.7 \mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellule). Ancora una volta, la differenza più eclatante tra questi due tipi cellulari riguarda l’attività enzimatica ritrovata nei surnatanti di esocitosi: in questi campioni di degranulazione l’attività della catepsina G è pari a 0 nelle cellule WT indifferenziate e nelle fasi precoci della differenziazione (G2); anche nelle cellule terminalmente differenziate (G6) l’attività enzimatica resta estremamente debole se confrontata ai PMN (in media, 9 volte più bassa).

| | Surnatante (+ fMLF) | Pellet (+ fMLF) | Lisato cell. (- fMLF) |
|--------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| PMN | 36.6 ± 5.4 | 16.4 ± 2.8 | 50.9 ± 8.7 |
| WT G0 | 0.0 ± 0.0 | 2.2 ± 0.8 | 1.7 ± 0.3 |
| WT G2 | 0.0 ± 0.0 | 7.1 ± 1.2 | 5.9 ± 1.7 |
| WT G3 | 0.7 ± 0.1 | 9.9 ± 1.4 | 8.3 ± 2.1 |
| WT G4 | 3.0 ± 0.9 | 5.1 ± 1.4 | 8.3 ± 2.1 |
| WT G5 | 4.4 ± 1.3 | 6.8 ± 1.9 | 10.6 ± 2.0 |
| WT G6 | 4.2 ± 0.5 | 9.9 ± 2.3 | 14.2 ± 4.3 |

Tabella 9: Dosaggio della catepsina G in neutrofili umani e cellule PLB-985 WT. L'attività enzimatica è misurata secondo la metodica descritta nel § 3.H.4. I risultati sono espressi come attività totale (in $\mu\text{g}/\text{min}/10^6$ cellule), della catepsina G rilasciata (surnatante), rimanente nelle cellule (pellet) dopo attivazione da fMLF e attività totale nel lisato cellulare (totale). I dati sono la media \pm DS di almeno 3 esperimenti (n=3-5).

Queste considerazioni sono confermate dal grafico in Figura 30, che riporta i dati relativi all'efficacia della degranulazione: la percentuale di rilascio della catepsina G nei neutrofili attivati è del $69,1 \pm 8,9\%$ (n=3), mentre nelle cellule PLB WT varia da un valore minimo di $6.6 \pm 1.7\%$ per le cellule a G3 di differenziazione, ad un massimo di $39.3 \pm 2.7\%$ per le cellule a G5 di differenziazione (nelle cellule a G0 e G2 di differenziazione la catepsina G sembra non venire secreta affatto).

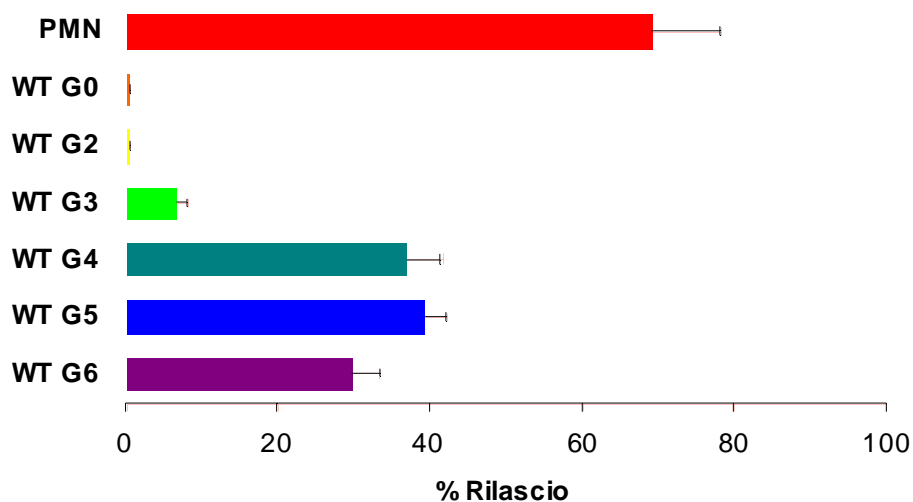


Figura 30: Rilascio della catepsina G nei surnatanti di esocitosi di cellule PLB-985 WT e PMN umani. Il dosaggio enzimatico è effettuato secondo la procedura descritta nella sezione mat. e met. (§ 3.H.4). I dati rappresentano la media \pm DS di almeno 3 esperimenti indipendenti condotti in duplicato (n=3-5).

4.B.7.7 Dosaggio della β -glucuronidasi

La β -glucuronidasi, enzima marker dei granuli azurofilici, è stata dosata secondo la tecnica fluorimetrica descritta in Mat. e met. (§ 3.H.5). I risultati ottenuti da questa serie di esperimenti sono mostrati in Tabella 10 che riporta i valori dell'attività totale della β -glucuronidasi ritrovata nelle frazioni di esocitosi (surnatante e pellet) e nel lisato delle cellule non attivate. Osservando i risultati relativi all'attività enzimatica nei surnatanti ottenuti dalla degranolazione, possiamo notare come vi sia un progressivo aumento dell'attività β -glucuronidasica parallelamente al progredire della maturazione granulocitica: l'attività totale passa infatti da 18.9 ± 5.3 nmoli/min/ 10^6 cellule (PLB WT indifferenziate) a 293.5 ± 37.5 nmoli/min/ 10^6 cellule (PLB WT terminalmente differenziate). Un andamento simile è osservato anche per l'attività enzimatica relativa ai pellet .

| | Surnatante (+ fMLF) | Pellet (+ fMLF) | Lisato cell. (- fMLF) |
|--------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| PMN | 510.8 ± 34.5 | 1879.8 ± 145.6 | 2854.9 ± 91.0 |
| WT G0 | 18.9 ± 5.3 | 917.9 ± 38.8 | 1041.8 ± 102.3 |
| WT G2 | 43.8 ± 6.1 | 538.4 ± 67.2 | 602.7 ± 41.3 |
| WT G3 | 86.1 ± 3.9 | 706.7 ± 14.5 | 827.4 ± 50.2 |
| WT G4 | 75.8 ± 33.1 | 1591.8 ± 303.5 | 1775.7 ± 61.8 |
| WT G5 | 134.3 ± 17.2 | 1210.2 ± 170.7 | 1181.1 ± 79.2 |
| WT G6 | 293.5 ± 37.5 | 1285.7 ± 159.0 | 1505.6 ± 88.6 |

Tabella 10: Dosaggio della β -glucuronidasi in neutrofilii umani e cellule PLB-985 WT. L'attività enzimatica è misurata secondo la metodica descritta nel § 3.H.5. I risultati sono espressi come attività totale (in nmoli/min/10⁶ cellule) dell'enzima rilasciato (surnatante), rimanente nelle cellule (pellet) dopo attivazione da fMLF e attività totale nel lisato cellulare (totale). I dati sono la media ± DS di almeno 3 esperimenti (n=3-6).

Rispetto ai neutrofilii umani, riscontriamo un difetto di attività enzimatica per le cellule PLB WT, ad ogni stadio di differenziazione, che risulta tuttavia meno importante nelle fasi finali della maturazione cellulare.

La Figura 31 mostra che il rilascio di questo enzima è minimo nelle cellule PLB WT indifferenziate (WT G0, 2.0 ± 0.4%), e aumenta nel corso della maturazione cellulare, per raggiungere valori paragonabili a quelli osservati nei neutrofilii umani negli stadi finali della differenziazione granulocitica (WT G6: 18.4 ± 3.5; PMN: 21.4 ± 3.3%).

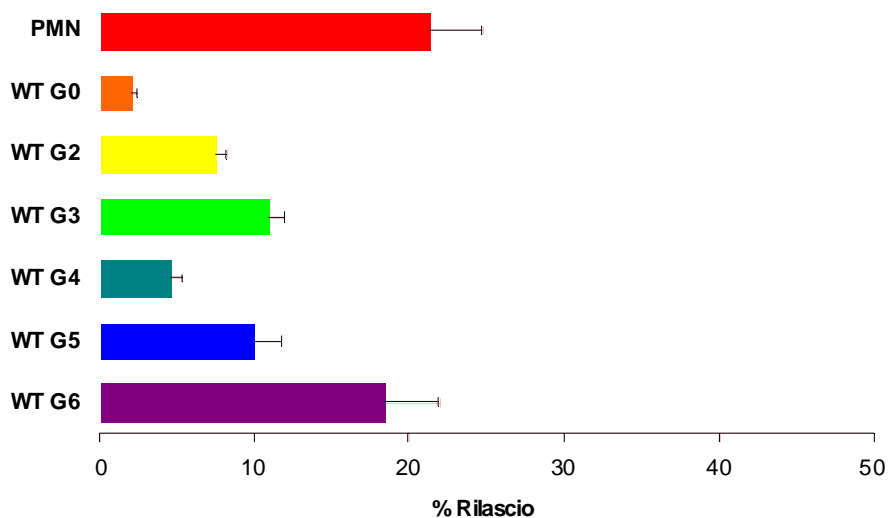


Figura 31: Rilascio della β -glucuronidasi nei surnatanti di esocitosi di cellule PLB-985 WT e PMN umani. I dati rappresentano la media ± di almeno 4 esperimenti indipendenti (n=4-6).

4.B.7.8 Dosaggio della Lattoferrina

Il dosaggio della lattoferrina viene realizzato tramite test Elisa (Mat.e met. § 3.H.7). Una curva standard è ottenuta a partire dei valori di assorbanza letti alla lunghezza d'onda di 450 nm, in funzione del logaritmo della concentrazione di LF standard in ng/mL. I valori relativi ai campioni del saggio di degranulazione sono quindi ottenuti per estrapolazione.

Nel corso di 6 esperimenti indipendenti, non è stata trovata alcuna traccia di attività enzimatica nei campioni di esocitosi testati (surnatante, pellet) nè nel lisato delle cellule PLB-985 WT, per qualsiasi fase della differenziazione granulocitica analizzata. La sensibilità del test è > 1 ng/mL. Per quanto concerne i neutrofili umani, il rilascio di LF era di $22.3 \pm 4.9\%$ per il lisato delle cellule non attivate e del $71.4 \pm 15.3\%$ per le cellule stimulate da fMLF (n=4) (La percentuale di rilascio è calcolata a partire dai dati di attività totale, in ng/mL).

4.B.7.9 Dosaggio del Lisozima

La secrezione del lisozima nel medium extracellulare nel corso della degranulazione è valutato tramite un saggio spettrofotometrico come descritto in Mat. e met., § 3.H.6. La Tabella 11 riporta i risultati ottenuti in questa serie di esperimenti: ancora una volta, è possibile osservare un aumento dell'attività enzimatica in funzione dell'evoluzione granulocitica: il lisozima è infatti assente negli stadi iniziali della maturazione cellulare (cellule da G0 e G2) ed è presente in quantità massima nelle cellule terminalmente differenziate (G6). In ogni caso, l'attività enzimatica nelle cellule PLB WT rimane notevolmente più bassa rispetto a quella ritrovata nei neutrofili umani. Per quanto riguarda l'efficacia dell'esocitosi, solo le cellule che hanno raggiunto un certo grado di maturazione granulocitica (G5-G6) sono in grado di rilasciare il lisozima nel medium extracellulare nel corso della degranulazione: in queste cellule l'entità del rilascio é pari a circa la metà di quanto osservato nei PMN 5(Figura 32).

| | Surnatante (+ fMLF) | Pellet (+ fMLF) | Lisato cell. (- fMLF) |
|--------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| PMN | 2037.9 ± 748.1 | 3549.6 ± 733.2 | 5917.0 ± 843.2 |
| WT G0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| WT G2 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| WT G3 | 0.0 ± 0.0 | 39.7 ± 2.9 | 42.3 ± 11.0 |
| WT G4 | 0.0 ± 0.0 | 45.8 ± 17.9 | 61.9 ± 20.3 |
| WT G5 | 34.3 ± 10.5 | 156.9 ± 32.5 | 180.8 ± 38.9 |
| WT G6 | 34.8 ± 4.4 | 252.2 ± 46.3 | 285.1 ± 38.5 |

Tabella 11: Dosaggio del lisozima in neutrofili umani e cellule PLB-985 WT. I dati sono espressi come quantità di enzima rilasciato (surnatante), quantità rimanente nelle cellule (pellet) dopo attivazione delle cellule con fMLF, e quantità totale inizialmente presente (lisato della sospensione di cellule non stimolate). I valori assoluti rappresentano la media ± DS dell'attività totale (in Unità Internazionali per 10⁶ cellule) calcolata a partire da almeno 5 esperimenti (n=5-8).

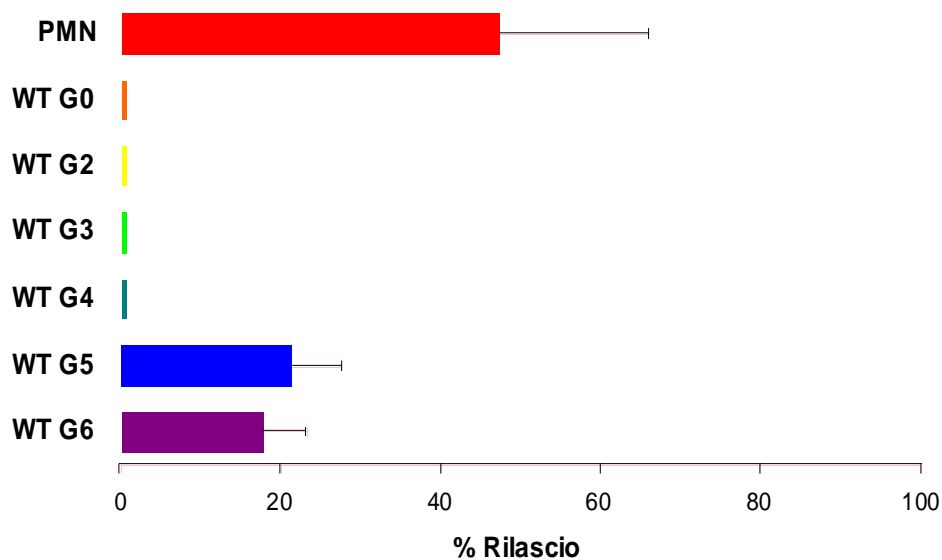


Figura 32: Rilascio del lisozima nei surnatanti di esocitosi di cellule PLB-985 WT e PMN umani. I dati rappresentano la media ± di almeno 5 esperimenti indipendenti (n=5-7).

4.B.7.10 Dosaggio della collagenasi (MMP-8)

Il rilascio della collagenasi è stato valutato grazie ad un test ELISA che permette di quantificare la MMP-8 presente sotto forma di pro-enzima (MMP-8 latente) o di enzima attivo, nei surnatanti e pellets ottenuti dalla degranolazione e nei lisati cellulari.

Nel corso di 5 esperimenti indipendenti effettuati in laboratorio, non è stata ritrovata alcuna traccia di collagenasi nei nostri campioni ottenuti dalla degranolazione (né nei surnatanti, né nei pellets) né nei lisati delle cellule PLB WT, per qualsiasi stadio della differenziazione granulocitica. La sensibilità del test è di 0.02 ng/mL. Per quanto riguarda i neutrofili umani, l'attività totale della collagenasi nel surnatante di esocitosi era di $1375,7 \pm 114,2$ ng/mL/ 10^6 cellule, con un rilascio pari al $74,2 \pm 5.1\%$ (n=4).

4.B.7.11 Dosaggio della Gelatinasi (MMP-9)

L'esocitosi dei granuli terziari è stata valutata misurando l'attività della gelatinasi o MMP-9 tramite zimografia, come descritto in Mat. e met., § 3.H.9.

In questa serie di esperimenti abbiamo scelto di testare l'attività gelatinolitica dei surnatanti dei mezzi di coltura delle cellule, oltre che quella dei surnatanti di esocitosi e ai lisati cellulari. La Figura 33 mostra lo zimogramma ottenuto nel corso di un esperimento rappresentativo, in cui sono stati testati per l'attività gelatinolitica i mezzi di coltura, i surnatanti di esocitosi e i lisati delle cellule WT indifferenziate e dopo 6 giorni di trattamento al DMF; il controllo positivo è rappresentato dal surnatante di esocitosi dei neutrofili.

E' noto che le metalloproteasi sono secrete sottoforma di precursore latente, con un peso molecolare più elevato (92 kDa) rispetto all'enzima maturo (85 kDa).

Nei lisati cellulari l'attività gelatinolitica è assente (cellule indifferenziate, G0) o estremamente bassa (cellule differenziate, G6: 112.6 pg/ 10^7 cellule per la pro-MMP9). Nei surnatanti provenienti dal saggio di esocitosi (SNT) la quantità di MMP-9 rilevata è assai ridotta, per entrambi i tipi cellulari analizzati: la lettura densitometrica delle bande a 92 kDa ha rivelato una quantità di enzima corrispondente a 67.8 pg/ 10^7 cellule G0 e a 111.4 pg/ 10^7 cellule G6. Sorprendentemente, abbiamo ritrovato l'attività enzimatica più elevata nei mezzi di coltura (MC): in questi campioni, infatti, la banda a 92 kDa (pro-MMP-9) è ben visibile sia nelle cellule indifferenziate (173.0 pg/ 5×10^6 cellule G0) che in quelle terminalmente differenziate

(740.4 pg/5 × 10⁶ cellule G6); in queste ultime, possiamo osservare anche la banda a 85 KDa, caratteristica della forma attiva della gelatinasi (132.7 pg/5 × 10⁶ cellule G6), e la banda a 72 kDa circa, corrispondente alla MMP-2 latente (88.2 pg/5 × 10⁶ cellule G6).

Come controllo positivo, abbiamo depositato 10 µl del surnatante di esocitosi dei PMN: come si può vedere dall'intensità della banda ottenuta, il nostro deposito è saturante; tuttavia, è distinguibile una banda a circa 130 KDa, corrispondente alla MMP-9 associata alla NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*). La quantità di MMP9 nel surnatante di esocitosi di PMN a 10⁷/mL è di circa 500 mg/mL.

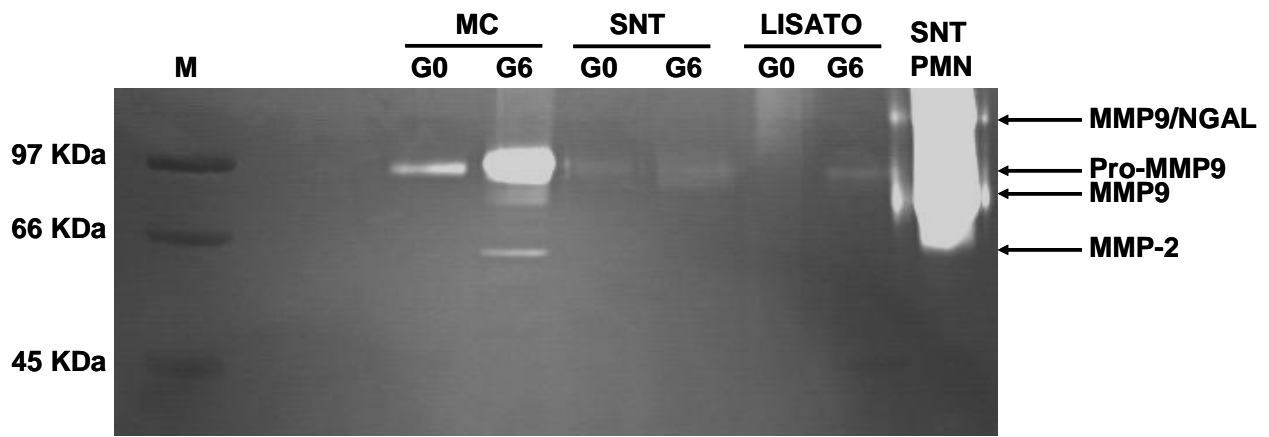


Figura 33: Zimogramma dell'attività gelatinasica di cellule PLB-985 WT. Per i mezzi di coltura (MC) stati depositati 130 µL dei mezzi di coltura di 5 × 10⁶ cellule indifferenziate (G0) o terminalmente differenziate (G6); per i surnatanti di esocitosi (SNT) sono stati depositati 150 µL dei surnatanti ottenuti dalla degranolazione di 10⁷ cellule stimulate da fMLF; i lisati cellulari (LISATO) sono ottenuti per sonicazione di 10⁷ cellule e successiva centrifugazione di 10' a 4000 × g a 4°C; è stato depositato l'equivalente di 20 µg di proteine. SNT PMN, surnatante di esocitosi di PMN; M, markers di peso molecolare.

4.B.7.12 Dosaggio di CD11b

Abbiamo poi valutato l'esocitosi dei granuli specifici e delle vescicole secretorie sulla base dell'espressione di superficie di CD11b, la catena leggera α della integrina $\alpha_M\beta_2$, valutata con tecniche citofluorimetriche (cfr Mat e met § 3.H.10) Come emerge dalla Figura 34, l'espressione di CD11b, minima nelle PLB WT indifferenziate, aumentava progressivamente nel corso della maturazione granulocitica, rimanendo tuttavia sempre inferiore ai livelli di espressione osservati nei neutrofili umani (2-3 volte più bassa). Inoltre, nelle cellule PLB WT l'espressione di CD11b aumentava solo lievemente in seguito all'aggiunta di fMLF 10⁻⁷ M,

utilizzato come stimolo per indurre la degranulazione, rispetto alle cellule a riposo. Nei PMN invece, la stimolazione da fMLF determinava un incremento significativo dell'espressione del recettore, rispetto a quella dei neutrofili in condizioni basali.

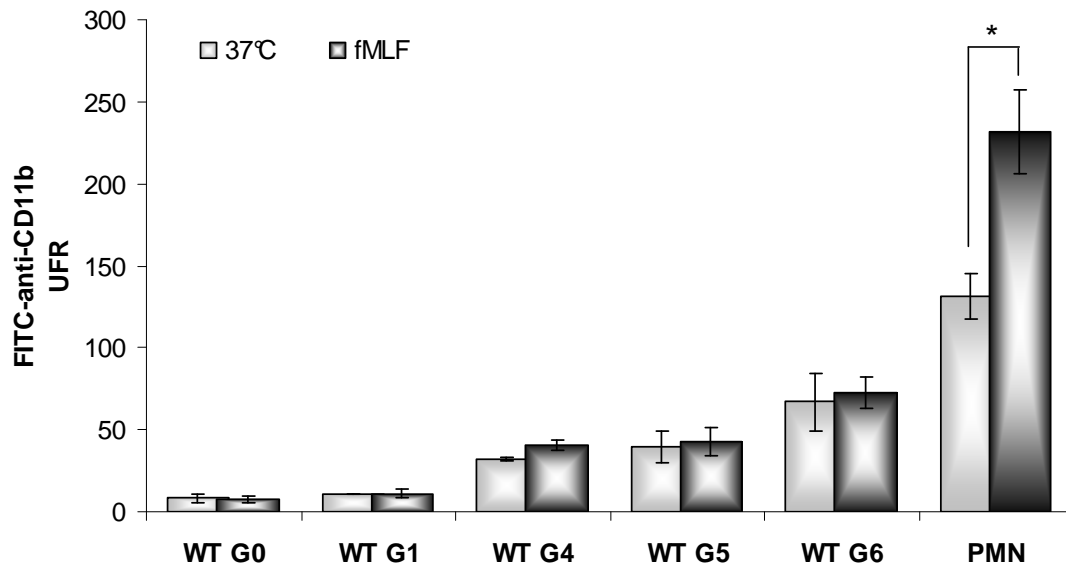


Figura 34: Espressione di superficie di CD11b nelle cellule PLB-985 WT e PMN umani. Il legame dell'anticorpo anti-CD11b FITC coniugato è valutato tramite citometria a flusso, come descritto nel § 3.H.10, attraverso l'acquisizione e l'analisi di 10000 eventi. I risultati sono la media \pm DS dei valori di unità di fluorescenza relativa (UFR) ottenuti in 3 esperimenti, ognuno condotto in duplicato. *, $P < 0.05$

4.B.8 Discussione

La linea cellulare promielocitica PLB-985 costituisce un modello sperimentale di differenziazione mieloide ampiamente utilizzato in letteratura per gli studi su svariate risposte funzionali dei neutrofili e, in particolare, sui meccanismi molecolari di attivazione del complesso NADPH ossidasi (DeCoursey et al., 2001; Pedruzzi et al., 2002; van Bruggen et al., 2004; Bionda et al., 2004; Li et al., 2005 e 2006; Pessach et al., 2006; Taylor et al., 2006; Cheng et al., 2007; Bissonnette et al., 2008; Pivot-Pajot et al., 2010).

Un lavoro precedentemente realizzato nel laboratorio di ricerca sulla CGD diretto dalla Dott.ssa Stasia ha messo in evidenza il ruolo della seconda ansa intracitosolica (o *loop D*) nell'attivazione del complesso ossidasi (Li et al., 2005). A questo scopo, la sequenza corrispondente al loop D del cDNA codificante per Nox2 é stata modificata per mutagenesi direzionale, prima di essere transfettata in modo stabile nel modello cellulare PLB-985 KO in cui il gene *CYBB* é inattivato per ricombinazione omologa (Zhen et al., 1993). Questo lavoro ha permesso di dimostrare che il loop D di Nox2, localizzato prima del quinto passaggio transmembrana, partecipa al trasferimento di elettroni dal FAD ai gruppi eme. La sostituzione della sequenza del loop D di Nox2 (¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰) con quella dell'ossidasi omologa Nox4 (¹⁹¹TASTYAIRVS²⁰⁰) ha inoltre permesso di evidenziare una super-produzione di anioni superossido in risposta ad agenti solubili da parte di queste cellule PLB-985 “super-mutanti”, definite Dloop_{Nox4}-Nox2.

Parte di questo lavoro di tesi è stato pertanto quello di verificare la capacità delle cellule Dloop_{Nox4}-Nox2 di rispondere con una “super-attività” ossidasica anche agli stimoli fagocitabili, e di valutarne l'impatto sull'attività microbica.

Il primo obiettivo è stato quello di caratterizzare il profilo di attivazione della NADPH ossidasi delle cellule PLB-985 WT-Nox2 e Dloop_{Nox4}-Nox2 in seguito alla stimolazione da parte di microrganismi quali *S. aureus* e *C. albicans*. I risultati da noi ottenuti ci permettono di effettuare alcune considerazioni:

- in tutte le cellule PLB-985 differenziate, la produzione di ROS indotta dai microrganismi è nettamente inferiore rispetto a quella esibita dai neutrofili umani. Quando invece le cellule erano stimulate con agonisti solubili (PMA, fMLF), la differenza tra la risposta metabolica delle cellule transfettate e quella dei neutrofili maturi era meno evidente: la generazione di ROS da parte delle cellule PLB-985 Dloop_{Nox4}-Nox2 stimulate da PMA raggiungeva valori paragonabili a quelli dei PMN (Tabella 4). Questa discrepanza potrebbe semplicemente

dependere da un difetto di fagocitosi delle PLB-985. Recentemente infatti, Pivot-Pajot e colleghi hanno dimostrato che la capacità fagocitica delle cellule PLB-985 raggiunge il livello massimo a 5 minuti di incubazione per poi diminuire, mentre aumenta progressivamente per i neutrofili umani (Pivot-Pajot et al., 2010). Tuttavia, gli esperimenti di microscopia confocale eseguiti nel nostro laboratorio hanno mostrato che le cellule PLB-985 fagocitano normalmente particelle di latex e di zymosan opsonizzate (Li et al., 2005; Debeurme et al., 2010, in preparazione). La debole attivazione delle cellule PLB-985 in risposta ad agonisti microbici potrebbe trovare spiegazione nella carenza di granuli specifici (e quindi, di citocromo b_{558} in essi immagazzinato): in queste cellule cioè, verrebbe a mancare l'attivazione intrafagosomale prolungata, dovuta ad un consistente e continuo apporto di citocromo b_{558} alla membrana fagosomale, necessaria contro gli stimoli particolati, laddove invece, stimoli solubili quali l'fMLF richiederebbero un'attivazione più transitoria e unicamente a livello della membrana.

- Infine, la debole attivazione dell'ossidasi delle cellule PLB-985 stimulate dai microrganismi potrebbe essere spiegata anche da un difetto nella risposta alle opsonine: in particolare, la via di trasmissione del segnale che porta all'attivazione del complesso NADPH ossidasi, mediata dalle Ig sembra compromessa in questa linea cellulare. Infatti, nel corso dei nostri studi sull'attivazione del sistema NADPH ossidasi da parte degli stimoli particolati, abbiamo messo in evidenza che le particelle di latex, opsonizzate unicamente con le immunoglobuline G, producevano un'attivazione 7 volte inferiore rispetto a quella ottenuta con lo zymosan siero-opsonizzato, che stimola contemporaneamente i recettori dei derivati del complemento (C3b/C3bi) e quelle delle Ig (Carrichon, Defendi et al., 2010).
- Ad ogni modo, l'iper-attività ossidasica delle cellule Dloop_{Nox4}-Nox2 rispetto alle WT-Nox2, già osservata in risposta a stimoli solubili, risulta confermata anche utilizzando agonisti particolati quali *S. aureus* e *C. albicans*. Tuttavia, in quest'ultimo caso, la differenza tra i due tipi cellulari (pari a un fattore 1.7 circa per entrambi i microrganismi) è meno marcata rispetto a quanto osservato in risposta a PMA e fMLF (pari circa ad un fattore 2 per il PMA e ad un fattore 5 per l'fMLF).. Nel nostro gruppo, il lavoro di tesi di Laure Carrichon ha in effetti dimostrato che le cellule Dloop_{Nox4}-Nox2 mostrano una “super-attività” ossidasica in particolare in risposta ad agonisti quali fMLF e ionomicina, che sono più sensibili all'aumento delle concentrazioni citoplasmatiche di calcio. L'influsso intracellulare di calcio è infatti fortemente coinvolto nella trasmissione del segnale all'origine dell'attivazione della NADPH ossidasi, in particolare nella trasduzione del

segnale attraverso svariate fosfolipasi e chinasi, responsabili delle fosforilazioni delle componenti del complesso enzimatico.

In un secondo momento ci siamo dedicati alla valutazione dell'attività microbica delle cellule PLB-985 per comprendere, da un lato, se questa linea cellulare potesse costituire un valido modello per lo studio dei processi microbicidi e, dall'altro, se l'aumentata produzione di ROS da parte delle cellule PLB-985 Δ loop_{Nox4}-Nox2 fosse accompagnata da un potenziamento dell'attività di killing rispetto alle WT-Nox2.

L'attività microbica è il risultato dell'azione coordinata di molteplici eventi: produzione di specie reattive dell'ossigeno (per attivazione della NADPH ossidasi e della MPO), rilascio di enzimi/peptidi antimicrobici, variazioni del pH e della tonicità vacuolare, che creano nell'ambiente fagosomale le condizioni ottimali per l'uccisione dei microrganismi. Come precedentemente dimostrato (cfr Risultati, § 4.A) l'attività NADPH ossidasica è indispensabile per l'eliminazione di alcuni microrganismi (*S. aureus* e *C. albicans*), mentre altri (quali *E. coli*) sono uccisi efficacemente anche in assenza dei processi ossidativi, come dimostrato dalla capacità dei neutrofili di soggetti affetti da malattia granulomatosa cronica (privi quindi di attività ossidasica) di uccidere quasi normalmente questi batteri (Defendi et al., 2009; Decleva et al., 2006).

I risultati da noi ottenuti hanno mostrato che, nei primi 10 minuti di fagocitosi, il killing di *S. aureus* e *C. albicans* da parte delle cellule PLB WT-Nox2 e Δ loop_{Nox4}-Nox2 è paragonabile a quello dei neutrofili umani; tuttavia, prolungando i tempi di incubazione il potere microbica di queste cellule si esaurisce e la crescita microbica prende il sopravvento. Complessivamente, questi dati evidenziano un difetto di attività microbica particolarmente grave da parte delle cellule PLB-985 nei confronti di *S. aureus* e *C. albicans*, anche quando si utilizza un rapporto cellule:microrganismi ridotto (2:1).

Se paragoniamo i risultati ottenuti con le cellule PLB-985 WT-Nox2 e Δ loop_{Nox4}-Nox2, osserviamo che l'aumentata produzione di ROS riscontrata per le cellule mutanti Δ loop_{Nox4}-Nox2 non è sufficiente a potenziare l'attività microbica di queste cellule rispetto alle cellule WT-Nox2, contro dei microrganismi la cui eliminazione è nota essere strettamente dipendente dai processi ossidativi. È interessante notare che, in risposta ai microrganismi citati, sembra esista una sorta di livello di attivazione “soglia” dell'ossidasi al di sopra del quale le ROS prodotte dalle cellule PLB-985 sono sufficienti a garantire una, seppur debole, attività microbica: le cellule WT-Nox2 generano infatti quantità di ROS pari a 8 (*S. aureus*) e 2 volte (*C. albicans*) quelle prodotte dalle cellule X-CGD che non esibiscono alcuna capacità di killing. Tuttavia, la differenza di attività ossidasica tra le cellule Δ loop_{Nox4}-Nox2 e WT-Nox2 (circa 1,6

volte per entrambi i microrganismi) non determina alcun miglioramento dell'azione microbica delle cellule "supermutanti".

Ci siamo in seguito proposti di valutare l'attività microbica delle nostre cellule nei confronti di un microrganismo che è eliminato efficacemente anche in assenza di attività ossidativa: *E. coli*. Le cellule PLB-985 WT-Nox2, Dloop_{Nox4}-Nox2 e X-CGD, che presentano livelli differenti di attività ossidativa, mostrano un killing di *E. coli* praticamente identico (Fig. 26). L'uccisione di questo microrganismo da parte di tutte queste cellule risulta tuttavia parzialmente deficitaria rispetto ai neutrofili umani.

Complessivamente, i nostri risultati mettono per la prima volta in luce una capacità microbica fortemente compromessa per la linea cellulare PLB-985. Questa osservazione può, almeno in parte, essere spiegata dal ridotto contenuto di citocromo b₅₅₈ delle cellule PLB-985 (un decimo rispetto ai PMN; cfr Tabella 3) e dal difetto di risposta alle opsonine che determinerebbe una carente attivazione dell'ossidasi; la conseguente diminuita produzione di ROS comprometterebbe in particolare l'eliminazione di microrganismi quali *S. aureus* e *C. albicans*, il cui killing è noto essere fortemente dipendente dall'attività ossidativa.

Accanto a ciò, il difetto di killing di *E. coli* da parte di tutte le cellule PLB-985 transfettate suggerisce una carenza anche a livello dei meccanismi microbicidi ossigeno-indipendenti. Ci siamo quindi interessati alla caratterizzazione del contenuto dei granuli citoplasmatici delle cellule PLB-985 allo scopo di valutare l'efficacia della differenziazione di queste cellule nel fenotipo granulocitico.

La mobilitazione dei granuli primari è stata monitorata analizzando il rilascio di mieloperossidasi, elastasi, catepsina G e β -glucuronidasi. I nostri risultati confermano la presenza dei granuli primari nel citoplasma delle cellule PLB-985, come precedentemente riportato da altri ricercatori (Tucker et al., 1987; Gaudreault et al., 2005; Kaldi et al., 2003; Pedruzzi et al., 2002; Pivot-Pajot et al., 2010). Tutti i markers dei granuli azurofili esaminati sono presenti già nelle cellule indifferenziate che corrispondono allo stadio della differenziazione mieloide di mieloblasta/promielocita. Abbiamo tuttavia messo in evidenza per la prima volta un difetto di attività per tutti questi enzimi dei granuli azurofili, in qualsiasi stadio della maturazione granulocitica; tale carenza appare estremamente grave nelle fasi iniziali della differenziazione, e si attenua solo parzialmente mano a mano che le cellule arrivano a maturazione: nelle cellule differenziate, infatti, solamente la mieloperossidasi raggiunge livelli di attività paragonabili a quelli osservati per i neutrofili umani; per gli altri markers, l'attività enzimatica rimane assai deficitaria (15% per l'elastasi, 30% per la Catepsina G e 50% per la β -glucuronidasi, se paragonate alle rispettive attività enzimatiche dei PMN).

I dati di letteratura sul contenuto dei granuli primari delle cellule PLB-985 sono assai scarsi, e limitati all'analisi dei livelli di RNA per la MPO: in accordo con i nostri risultati, Pivot-Pajot e collaboratori ritrovano la MPO nelle cellule indifferenziate e in quelle che hanno subito 6 giorni di induzione con DMF (Pivot-Pajot et al., 2010); Simons e collaboratori mostrano una diminuzione dei livelli di RNA per la MPO nei primi 4 giorni di differenziazione in presenza di DMF, rispetto alle cellule indifferenziate (Simons et al., 2008). I dati da noi ottenuti misurando l'attività perossidasi delle cellule PLB-985 alle varie fasi della maturazione mieloide mostrano un andamento simile: il trattamento con DMF sembra infatti indurre una iniziale diminuzione della quantità di MPO (G2-G4); l'attività perossidasi tende poi ad aumentare quando le cellule arrivano a maturazione (G5-G6; Tabella 5).

É da sottolineare in particolare la grave carenza delle proteine microbicide elastasi e catepsina G (Tabelle 8-9 e Figg. 29-30).

Un'altra considerazione importante riguarda l'efficacia della degranolazione nella linea cellulare studiata: il rilascio di MPO, elastasi e catepsina G dai granuli primari delle PLB-985 risulta estremamente compromesso: nelle cellule PLB WT terminalmente differenziate la quantità di elastasi rilasciata corrisponde a un decimo di quanto osservato per i PMN; la secrezione di MPO e catepsina G corrisponde circa al 50% del rilascio di questi stessi markers da parte dei neutrofili umani. Solamente l'esocitosi della β -glucuronidasi é paragonabile nei neutrofili umani e nelle cellule PLB WT terminalmente differenziate, anche se la quantità di enzima ritrovato corrisponda circa al 50% dell'attività nei neutrofili.

Possiamo quindi concludere che nella linea cellulare PLB-985 la mobilitazione dei granuli primari e la biogenesi delle proteine microbicide in essi contenute sono notevolmente difettose rispetto ai neutrofili umani e ciò potrebbe contribuire al difetto di attività microbica di questa linea cellulare: in particolare, la carenza di MPO comprometterebbe il killing nei confronti di stafilococco e candida, microorganismi la cui eliminazione é fortemente dipendente dall'attività perossidasi (cfr. Risultati 4.A).

Il dosaggio dei markers dei granuli secondari nelle cellule PLB-985 ha messo in evidenza l'assenza di proteine quali la lattoferrina e la collagenasi e una grave carenza di lisozima, sia in termini di attività (in media 20 volte inferiore rispetto ai neutrofili umani) che in termini di rilascio (circa la metà rispetto all'esocitosi di lisozima trovata nei PMN). In accordo con i nostri risultati, Pivot-Pajot e collaboratori non hanno ritrovato alcuna traccia di RNA per la lattoferrina nelle cellule PLB-985 prima o dopo differenziazione in presenza di DMF. Simons e collaboratori hanno invece mostrato che l'espressione del RNA per la LF era minima nei primi giorni di differenziazione (G1-G2) e massima a G4 (gli autori non riportano l'espressione a G5

e G6). Tuttavia, la presenza del RNA per la lattoferrina non è di per sé sufficiente a dimostrare (a) che la proteina sia sintetizzata, (b) che sia prodotta in forma attiva, (c) che sia immagazzinata nei granuli.

Pedruzzi et al., (2002) hanno descritto la degranolazione dei granuli specifici nelle cellule PLB-985 indotte da DMF in presenza di 1% Nutridoma SP, utilizzando come marker il CD11b: gli autori trovavano un aumento della sua espressione di superficie in seguito alla stimolazione da fMLF. I nostri risultati mostrano invece che l'espressione di CD11b aumenta con la differenziazione delle cellule, ma non è influenzata dall'attivazione con fMLF, contrariamente a quanto osservato per i neutrofili umani: ne abbiamo dedotto che, nelle nostre condizioni di differenziazione, il CD11b è espresso solamente a livello della membrana plasmatica e che la degranolazione indotta da fMLF non ne modifica l'espressione.

Complessivamente, l'assenza di lattoferrina e collagenasi, le ridotte quantità di lisozima, di CD11b e, lo ricordiamo, di citocromo b₅₅₈, supportano l'idea che le cellule PLB-985 presentino un difetto a livello della biogenesi dei granuli specifici, sia a livello della sintesi dei markers granulari che del loro immagazzinamento nelle strutture intracitoplasmatiche. Questo determinerebbe da un lato, la parziale o totale assenza delle proteine solubili (nel caso di lisozima, lattoferrina e collagenasi) e, dall'altro, la sola associazione al plasmalemma delle proteine che nei neutrofili sono confinate prevalentemente sulla membrana dei granuli perossidasi negativi (CD11b e citocromo b₅₅₈). Le nostre conclusioni sono in accordo con quanto osservato in precedenza per un'altra linea promielocitica umana, le HL-60: è stato infatti dimostrato che in queste il citocromo b₅₅₈ è localizzato quasi esclusivamente a livello della membrana plasmatica, oltre che nelle strutture che partecipano alla sintesi e al direzionamento delle proteine. Questo testimonierebbe l'incapacità di questa linea cellulare di generare i granuli specifici e lascerebbe intendere che quando la via normale di immagazzinamento nei granuli è bloccata, la via alternativa conduce alla superficie della cellula, risultando nella secrezione di proteine solubili (quali la NGAL) e nell'incorporazione a livello della membrana plasmatica delle proteine di membrana (quali il citocromo b₅₅₈) (LeCabec et al., 1997). Un'ulteriore conferma alla nostra ipotesi è fornita dai dati concernenti l'espressione di superficie del citocromo b₅₅₈. È noto infatti che nei neutrofili umani a riposo questo eterodimero è principalmente associato alla membrana dei granuli specifici (85%) oltre che alla membrana plasmatica (15%); quando le cellule sono stimulate, la secrezione dei granuli specifici determina il rilascio del citocromo b₅₅₈ e il conseguente aumento della sua espressione a livello della membrana plasmatica e/o fagosomale (Borregaard et al., 1983 e 1984). Contrariamente a quanto accade nei PMN, nel corso di numerosi esperimenti da noi

effettuati abbiamo potuto mettere in evidenza che l'espressione di superficie di Nox2 nelle cellule PLB-985 non varia prima o dopo l'attivazione (cfr Figura 21).

Il rilascio dei granuli terziari è stato valutato misurando, tramite zimografia, l'attività della gelatinasi MMP-9, enzima marker di questa popolazione granulare, nelle cellule indifferenziate (G0) e dopo 6 giorni di trattamento con DMF. Nei surnatanti di esocitosi e nei lisati cellulari provenienti da entrambe le popolazioni cellulari, la MMP-9 era assente o estremamente debole; nei mezzi di coltura delle cellule indifferenziate, invece, è stato possibile evidenziare una debole banda corrispondente alla forma latente della MMP-9; nelle cellule terminalmente differenziate (G6), la quantità di enzima secreto era invece più elevato ed era possibile distinguere oltre alla banda relativa alla MMP-9 latente a 92 kDa, anche quella corrispondente all'enzima attivato (a circa 82 kDa) e quella della MMP-2 (o gelatinasi A) a 72 kDa (Fig. 37). La secrezione della gelatinasi nel medium di coltura suggerisce che le cellule PLB-985 non immagazzinano, o accumulano solo parzialmente, la gelatinasi al loro interno prima di rilasciarla, contrariamente ai neutrofili che liberano il contenuto granulare in seguito a stimolazione (Borregaard et al., 1997; Morel et al., 1994). Analogamente a quanto abbiamo osservato per le cellule PLB-985, è stato dimostrato che i linfociti B (che non possiedono granuli citoplasmatici) sintetizzano e rilasciano al loro esterno la gelatinasi MMP-9, senza accumularla in compartimenti intracitoplasmatici (Trocmé et al., 1998). Questi dati sembrerebbero indicare che la linea cellulare PLB-985 presenta una carenza a livello della biogenesi dei granuli terziari. Nel loro studio pubblicato di recente, Pivot-Pajot e colleghi sostengono che l'efficacia della maturazione granulocitica delle PLB-985 dipenderebbe strettamente dall'agente di differenziazione utilizzato: ad esempio, le cellule differenziate con DMSO costituirebbero un modello di neutrophils-like preferenziale per lo studio della fagocitosi mediata dai recettori Fc γ , mentre per lo studio dei processi di esocitosi dei granuli terziari e della vescicole secretorie, il modello cellulare più valido sarebbe rappresentato dalle cellule PLB-985 differenziate con dbc-AMP (Pivot-Pajot et al., 2010).

Complessivamente i risultati presentati in questa tesi mostrano che, nelle nostre condizioni di differenziazione, le cellule PLB-985 possiedono la maggiorparte delle caratteristiche funzionali dei granulociti maturi quali burst respiratorio ed esocitosi; tuttavia, la loro risposta funzionale è generalmente più debole rispetto a quella dei neutrofili umani. Esse costituiscono pertanto un modello efficace per lo studio dei meccanismi di attivazione del complesso NADPH ossidasi; tuttavia, il grado di maturazione raggiunto (metamielocitico, probabilmente), che è caratterizzato da una carente degranulazione, rende questa linea cellulare inadatta allo studio dei meccanismi microbicidi.

Lavoro realizzato
in collaborazione tra il
Dipartimento di Scienze della Vita
(Università di Trieste)
e il Centro CGD
(Ospedale Universitario di Grenoble)

4.C Identificazione di una nuova mutazione puntiforme nel promotore del gene *CYBB* responsabile di un raro caso di CGD X91⁻

La malattia granulomatosa cronica è un'immunodeficienza congenita in cui i fagociti non sono in grado di produrre le specie reattive dell'ossigeno. Si tratta di un disordine genetico eterogeneo, causato da una grande varietà di mutazioni – delezioni, mutazioni *missense* o *nonsense*, alterazioni dei siti di splicing, inserzioni - localizzate nei geni codificanti per i componenti della NADPH ossidasi.

Esistono 2 tipi di trasmissione della malattia: la forma autosomica recessiva (concernente mutazioni nei geni codificanti per le subunità *p40phox*, *p47phox*, *p67phox* o *p22phox*) e la forma più comune, a trasmissione legata al cromosoma X (o *X-linked*) dovuta a difetti nel gene *CYBB* codificante per la proteina *gp91phox* o Nox2. La maggior parte dei casi di CGD diagnosticati (circa il 60%) è dovuta ad un difetto del gene *CYBB*. In questo contesto, le mutazioni genetiche determinano per lo più la perdita della proteina corrispondente: la forma CGD X91⁰, la più frequente, si traduce infatti nell'assenza delle due subunità del citocromo *b₅₅₈* e nella conseguente mancanza di attività ossidasica. Accanto a questa, una forma più rara di CGD è stata descritta in letteratura, definita CGD X91⁻, in cui la diminuita espressione del citocromo *b₅₅₈* o la normale espressione della forma mutata della proteina sono associate ad un'attività NADPH ossidasica ridotta (Stasia e Li., 2008).

Lo studio di queste rare varianti di CGD si rivela particolarmente interessante poichè permette di mettere in evidenza le regioni geniche coinvolte nella regolazione della sintesi di *gp91phox*, nella sua stabilizzazione, o ancora nei processi di attivazione del complesso enzimatico.

Parte dell'attività sperimentale svolta nell'ambito di questa tesi è stata dedicata alla caratterizzazione molecolare e funzionale di un raro caso di malattia granulomatosa cronica presente in due membri della stessa famiglia, da qualche anno oggetto di studio da parte del nostro laboratorio del Dipartimento di Scienze della Vita. Si tratta di una variante atipica di CGD di tipo *X-linked*, caratterizzata da una ridotta espressione della proteina *gp91phox* (CGD X91⁻).

Questo lavoro è stato realizzato in collaborazione tra il Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste e il Centro di Diagnosi e Ricerca sulla CGD dell'Ospedale di Grenoble; i risultati ottenuti sono stati successivamente pubblicati [cfr. *Defendi F. et al, Biochimica et Biophysica Acta 1792 (2009) 201-210*].

4.C.1 Descrizione dei casi clinici

L'albero genealogico della famiglia C è riportato nella Figura 35.

Il **paziente II-2** è nato nel 1947; la madre è morta qualche anno fa a causa di una patologia imprecisata, il padre è deceduto recentemente. Il figlio (III-1) gode di buona salute, le figlie (III-2 e III-3) sono portatrici della malattia. Le sorelle del paziente sono anch'esse portatrici di CGD, una di esse (II-4) è deceduta di recente. Il fratello (NT) è morto all'età di 14 anni a causa di una polmonite. Il paziente II-2 ha ricevuto la diagnosi di malattia granulomatosa cronica nel 1991, subito dopo che al nipote, allora ventenne, (il paziente III-5) era stata diagnosticata la CGD, nella fase terminale della malattia.

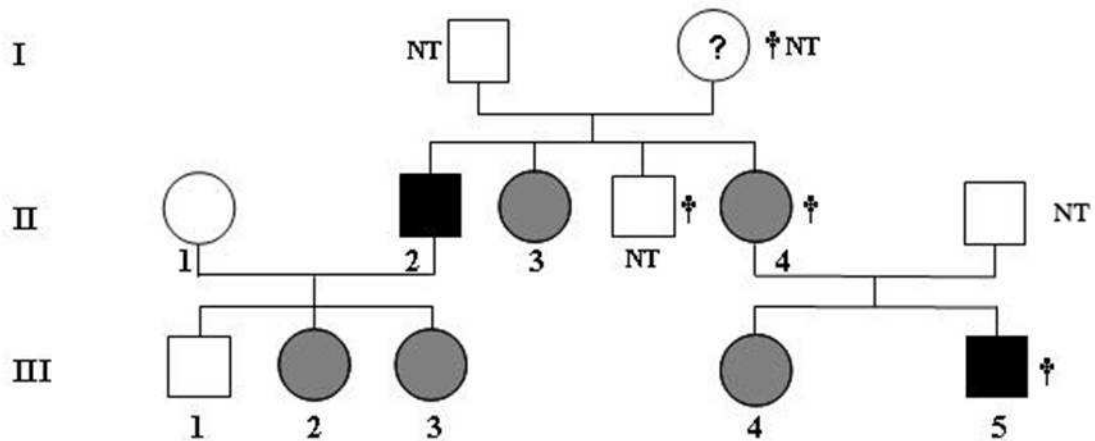


Figura 35: Albero genealogico della famiglia C. I soggetti II-3, II-4, III-2, III-3 e III-4 sono risultati portatrici della CGD *X-linked* sulla base del test di riduzione del NBT e del saggio di produzione del superossido (cfr Tabella 12). I soggetti II-1 e III-1 sono normali in termini di riduzione del NBT e di produzione di superossido. (Tabella 1). (□), Maschio normale; (○), Femmina normale; (●), Femmina portatrice; (■), Maschio affetto da CGD; (†), deceduto; NT, non testato.

Il paziente II-2 era relativamente in buona salute fino a qualche anno fa, quando ha manifestato successivamente numerosi ascessi cutanei, infezioni polmonari con pleuriti trattate con antibiotici. La sua storia clinica è caratterizzata da episodi ricorrenti di bronco-polmoniti, lesioni dermiche ulcero-necrotiche e un'otite media con perforazione della membrana timpanica, curata con terapia antibiotica. Allo stato attuale, il paziente gode di buona salute e non è sottoposto a profilassi antibiotica.

Il **paziente III-5**, nipote del paziente II-2, è nato nel 1970 e morto nel 1990. Fino all'età di 19 anni, il paziente godeva di buona salute e non presentava disturbi. Nel 1989 ha sviluppato svariate infezioni cutanee, con granulomi necrotici localizzati ai nodi latero-cervicali di destra, e una setticemia pleurica essudatizia che hanno richiesto il suo ricovero ospedaliero. L'analisi dei campioni sanguigni e linfonodali hanno evidenziato la presenza di *Serratia marcescens*. Le lesioni linfonodali e pleuriche hanno necessitato un drenaggio chirurgico. In questa occasione è stata effettuata una valutazione del burst respiratorio del paziente: l'attività ossidasica dei granulociti, misurata per chemiluminescenza in presenza di luminolo e indotta da zymosan opsonizzato, è risultata fortemente difettosa. La terapia antibiotica con ceftazimide e netilmicina ha determinato la remissione del paziente, nell'arco di 5 settimane. Sei mesi più tardi, nel marzo 1990, il paziente è stato nuovamente ricoverato in ospedale per febbre, tosse, dispnea e polmonite bilaterale. Qualche giorno dopo il ricovero, le sue condizioni sono gravemente peggiorate, rendendo necessario il trasferimento nell'unità di cure intensive. Due emocolture sono risultate positive per lo *Staphylococcus sp.* (non *aureus*). Dai broncoaspirati è stato possibile isolare *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. La terapia antibiotica, comprendente ceftazimide, piperacillina, netilmicina e teicoplanina si è rivelata inefficace contro la febbre e l'infezione polmonare.

Dopo che la diagnosi di CGD era stata posta e prima che venisse identificata la base molecolare della malattia, era stato ipotizzato che la ridotta attività NADPH ossidasica osservata per i neutrofili del paziente derivasse dall'instabilità del complesso enzimatico; si è quindi ipotizzato che cellule "più giovani" potessero avere un'attività ossidasica più elevata e fossero quindi in grado di uccidere più efficacemente i microorganismi. La citochina GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) era stata quindi utilizzata allo scopo di accelerare il rilascio di neutrofili dal midollo osseo e sfruttando inoltre la sua capacità di pre-attivare (*prime*) i neutrofili per aumentarne la risposta contro gli agonisti (Dale et al., 1998). Il GM-CSF ricombinante umano era stato somministrato al paziente III-5 con una dose di partenza di 5 µg/kg/giorno aumentando gradualmente fino ad un massimo di 10 µg/kg/giorno e modulando il dosaggio in modo da mantenere la conta dei globuli bianchi al di sotto dei $10 \times 10^9/L$. Il GM-CSF è stato somministrato per via sottocutanea ad intervalli di 12 ore. Il trattamento è proseguito per 22 giorni e ha determinato un rapido e consistente incremento nel numero di leucociti e di neutrofili, senza influenzare la concentrazione dell'emoglobina e la conta delle piastrine e senza che vi fossero effetti collaterali. Tuttavia, nonostante l'aumento della conta dei neutrofili, non è stato evidenziato alcun cambiamento nella percentuale delle cellule positive al test NBT o nella quantità di anione superossido indotto dalla stimolazione con PMA.

Dopo un debole e transitorio miglioramento clinico, le condizioni del paziente sono peggiorate, con febbre elevata, stati di incoscienza e dispnea che hanno richiesto l'assistenza respiratoria meccanica. L'insorgenza di un pneumotorace sinistro ha causato la morte del paziente 38 giorni dopo il ricovero. Nella fase terminale della malattia, erano stati nuovamente isolati *Pseudomonas* e *Staphylococcus* rispettivamente dai broncoaspirati e dalle emocolture.

4.C.2 Diagnosi di CGD

La diagnosi di malattia granulomatosa cronica è stata posta sulla base del test di riduzione del nitroblu di tetrazolio (NBT), della misura della produzione di anione superossido indotta da PMA e del contenuto di citocromo b_{558} (Tabella 12).

| Pazienti | Produzione $O_2^{\cdot-}$ (nmoli/min/10 cell.) | Riduzione NBT (% neutrofili NBT-positivi) | Quantità cit. b_{558} (pmoli/mg prot.) |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Famiglia C : | | | |
| II-1 | 226.0 | 100 forte | NT |
| II-2 | 13.2 | 100 debole-negativo | 20.0 |
| II-3 | 68.1 | 52 forte 48 debole-negativo | NT |
| II-4 | 83.3 | 53 forte 47 debole-negativo | NT |
| III-1 | 217.3 | 100 forte | NT |
| III-2 | 118.9 | 64 forte 36 debole-negativo | NT |
| III-3 | 91.3 | 53 forte 47 debole-negativo | NT |
| III-4 | 19.8 | 56 forte 44 debole-negativo | 72.5 |
| III-5 | 8.9 ± 1.8 (3) | 100 debole-negativo | 14.8 ± 4.3 (3) |
| Controllo | 197.9 ± 7.1 (3) | 100 forte | 166.0 |
| Famiglia di un paziente CGD X91 ⁰ : | | | |
| Padre | 181.9 | 100 forte | 100.7 |
| Madre | 99.2 | 61 forte 49 negativo | 62.5 |
| Figlio | < 0.5 | 100 negativo | < 5 |

Tabella 12: Produzione di anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), riduzione del NBT e contenuto di citocromo b_{558} dei neutrofili dei membri della famiglia C e della famiglia di un paziente CGD affetto dalla forma classica X91⁰. Le condizioni sperimentali sono quelle descritte in Mat. e met. §§ 3.C.4, 3.D.2 e 4.

Come si può notare, l'attività NADPH ossidasica è totalmente assente nei neutrofili di un paziente CGD X91⁰. Per quanto riguarda i neutrofili del paziente II-2, i risultati da noi ottenuti in termini di produzione di anioni superossido, riduzione del NBT e contenuto di citocromo b_{558} sono paragonabili a quelli ottenuti con i neutrofili del nipote, il paziente III-5. Infatti, la produzione, indotta da PMA, di $O_2^{\cdot-}$ da parte dei neutrofili dei pazienti II-2 e III-5 è pari al 7 e al

5% rispettivamente dei neutrofili di controllo. I neutrofili dei membri della famiglia II-3, II-4, III-2, III-3 e III-4 generano quantità di anioni superossido intermedie, che vanno dal 34 al 60% della produzione di $O_2^{\cdot-}$ del controllo.

Questi dati sono compatibili con un profilo di ereditarietà della malattia di tipo *X-linked*. Tale conclusione è confermata dalla presenza di mosaicism (cellule positive e cellule negative) osservata nel test di riduzione del NBT eseguito sui neutrofili dei soggetti femminili: II-3, II-4, III-2, III-3 e III-4. I neutrofili dei soggetti II-1 e III-1 appaiono invece 100% positivi al test NBT.

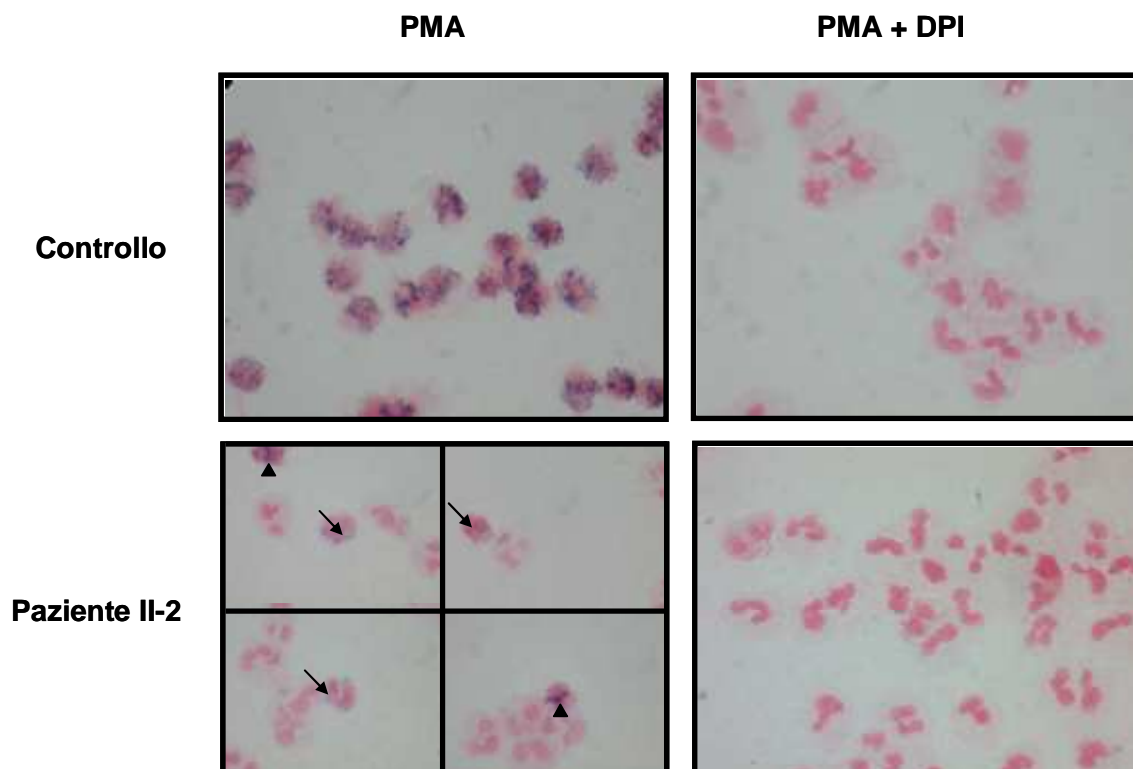


Figura 36: Test NBT su neutrofili del paziente II-2. I neutrofili purificati dal paziente II-2 e da un soggetto di controllo venivano preincubati in presenza o meno di DPI 5 μ M e stimolati con 20 ng/mL di PMA in presenza di 1 mM NBT per 15 min a 37°C, come descritto in Mat. e met. § 3.D.2. Le frecce indicano i neutrofili con colorazione debolmente positiva; le punte di freccia indicano gli eosinofili con una colorazione più fortemente positiva.

Per quanto riguarda i pazienti II-2 e III-5, si può osservare la presenza di una piccola percentuale di cellule colorate (Figura 36). Tale colorazione risulta abolita quando le cellule venivano incubate in presenza di difenileneiodonio (DPI, inibitore della NADPH ossidasi). Tra le cellule positive al NBT, quelle caratterizzate da una colorazione più debole (contrassegnate dalle frecce in figura 36) sono riconoscibili come neutrofili, mentre quelle caratterizzate da una

colorazione più intensa (contrassegnate dalle punte di frecce in figura 36), possono essere identificate come eosinofili, sulla base della forma del nucleo, della dimensione e del colore dei granuli intracellulari. Nei campioni sanguigni dei pazienti II-2 e III-5, la percentuale di eosinofili, stabilita sulla base dello striscio cellulare marcato al Diff-Quick, non era superiore al 3%.

4.C.3 Misura dell'attività ossidasica

Per poter stabilire se i neutrofili del paziente II-2 possedevano un'attività NADPH ossidasica, abbiamo successivamente valutato il burst respiratorio della popolazione di granulociti di questo paziente ricorrendo ad un saggio più sensibile rispetto al test NBT, e cioè il saggio citofluorimetrico di ossidazione della diidrorodamina 123 (DHR 123; cfr. § 3.D.1.2). La Figura 37 mostra i risultati di un esperimento rappresentativo. I neutrofili del paziente II-2 presentano una popolazione omogenea di cellule, con un picco di fluorescenza la cui intensità è pari a circa il 5% del controllo. Tale risposta metabolica viene totalmente abolita quando le cellule sono incubate in presenza di DPI. Come ci si attendeva, i neutrofili di un paziente CGD X^0 sono caratterizzati dall'assenza di attività ossidasica.

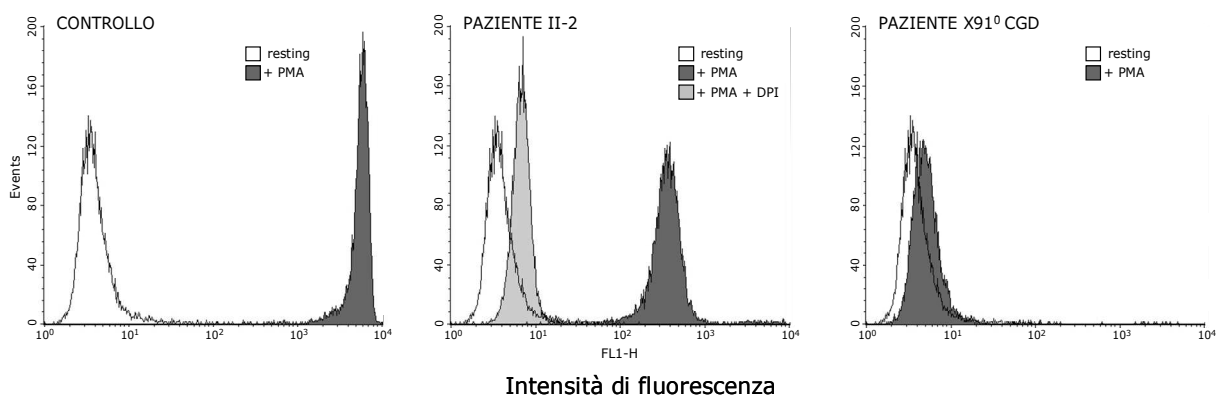


Figura 37: Istogrammi citofluorimetrici della produzione di perossido di idrogeno da parte di pazienti CGD. I neutrofili ($10^6/\text{mL}$) purificati da un donatore sano, dal paziente II-2 e da un paziente CGD $X91^0$ venivano marcati con la diidrorodamina (DHR) e incubati 15 min a 37°C in assenza (resting) o in presenza di 20 ng/mL PMA e in presenza o in assenza di 5 μM DPI, come descritto in Mat. e met. § 3.D.1.2 e analizzati al citofluorimetro.

4.C.4 Verifica dell'espressione di gp91 \textit{phox} in neutrofili ed eosinofili

Poiché le cellule più positive al test NBT sono state identificate come eosinofili, abbiamo voluto verificare se queste stesse cellule fossero caratterizzate da un'attività NADPH ossidasica misurabile con il saggio citofluorimetrico di ossidazione della DHR. A questo scopo, abbiamo condotto un esperimento in cui le cellule venivano sottoposte ad una “doppia marcatura”, utilizzando cioè l'anticorpo monoclonale anti-CRTH2, diretto contro un marker specifico degli eosinofili, e la DHR per valutare la produzione di perossido di idrogeno indotta da PMA (cfr Mat. e met. § 3.D.1.2). La Figura 38 mostra i risultati ottenuti in questa serie di esperimenti e che derivano dall'acquisizione di un numero di eventi (100000) più elevato rispetto a quelli acquisiti durante gli esperimenti in Fig. 37 (10000).

La preparazione di granulociti del paziente II-2 mostra la presenza di due popolazioni in grado di ossidare la sonda DHR (pannello in basso a destra): una popolazione più numerosa rappresentata dai neutrofili (cellule CRTH2 negative) con bassa attività ossidante la DHR e una popolazione minoritaria costituita da eosinofili (cellule CRTH2 positive) con elevata attività ossidante la DHR.

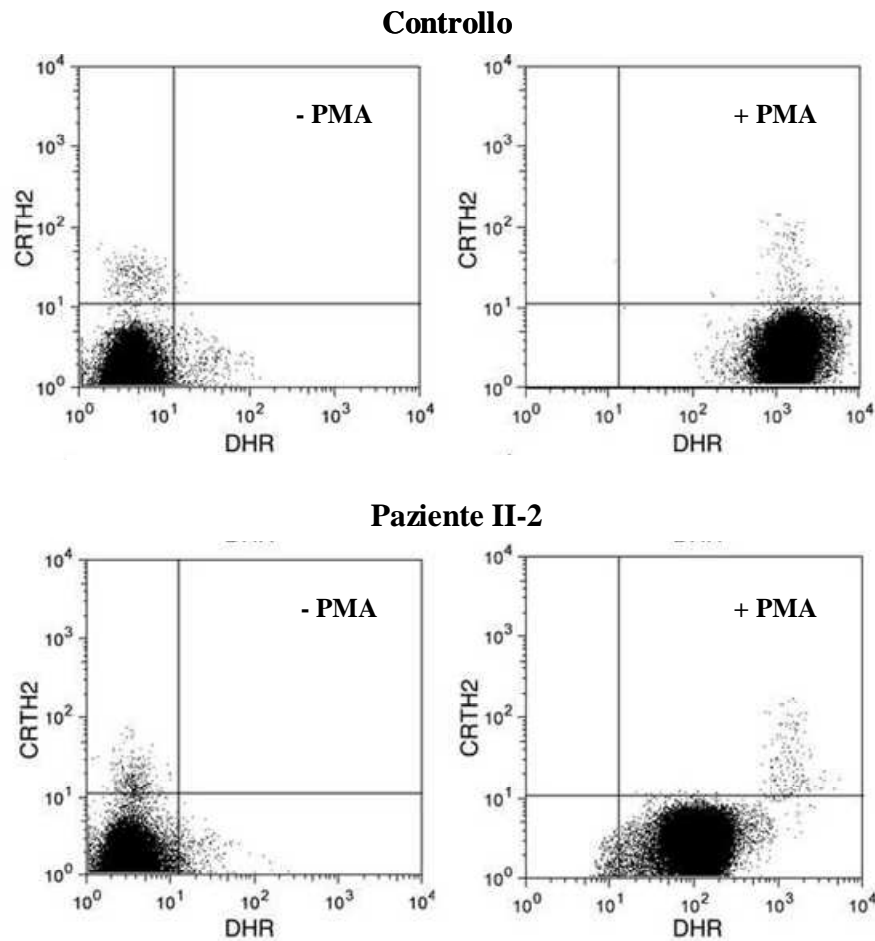


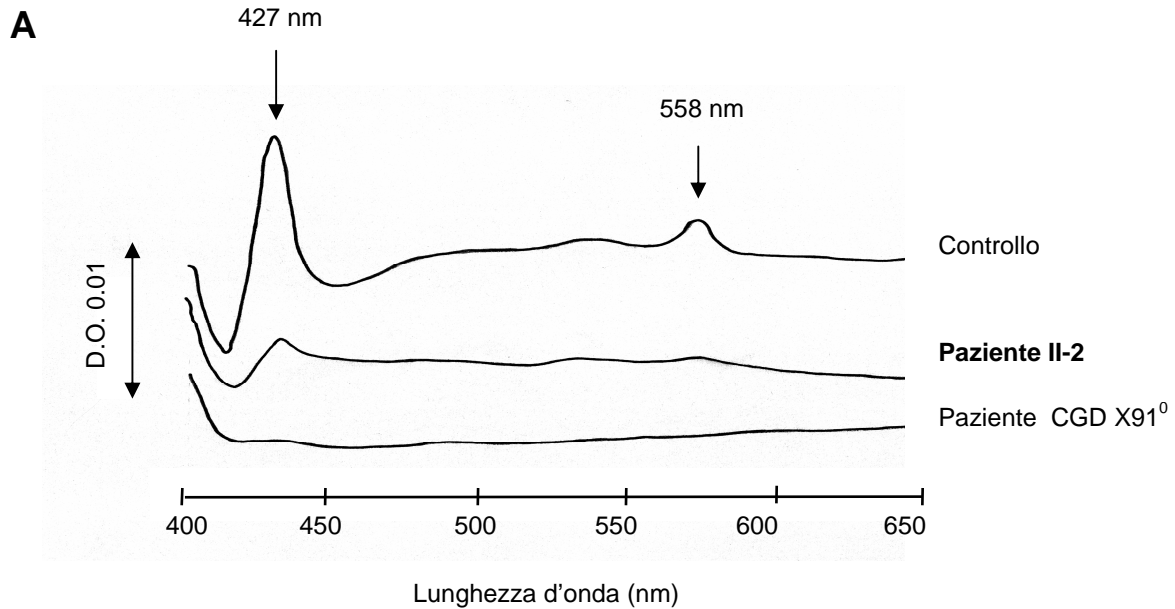
Figura 38: Analisi citofluorimetrica della produzione di perossido di idrogeno da parte di neutrofili ed eosinofili nella popolazione di granulociti di un soggetto di controllo (pannelli superiori) e del paziente II-2 (pannelli inferiori) a riposo (pannelli a sinistra) o dopo stimolazione da PMA (pannelli a destra). I granulociti ($10^6/\text{mL}$) venivano incubati con DHR e incubati 15 min a 37°C in assenza o in presenza di 20 ng/mL PMA. Dopo una diluizione in PBS freddo, le cellule venivano incubate per 30 min in presenza dell'anticorpo secondario anti CD294 coniugato al fluorocromo Alexa Fluor[®] 647 (CRTH2), quindi lavate e analizzate al citofluorimetro, come descritto in Mat. e met. § 3.D.1.2.

La presenza del citocromo b_{558} nei neutrofili dei pazienti è stata confermata attraverso:

- misura dello spettro differenziale ridotto-meno-ossidato;
- immunorivelazione mediante western blotting.

Come risulta dalla Figura 39A e dalla Tabella 12, la misura dello spettro differenziale ha evidenziato la presenza di una quantità ridotta ma misurabile di cotocromo b_{558} . Lo spettro ottenuto a partire da neutrofili di un paziente CGD X91⁰ non presenta i picchi caratteristici del citocromo b_{558} (426, 530 e 558 nm). Il contenuto di citocromo b_{558} nei granulociti dei pazienti II-2 e III-5 corrisponde, rispettivamente, al 14 e al 10% dei neutrofili di controllo; i neutrofili di

un membro eterozigote della famiglia C (il paziente III-4) possiede circa il 44% di citocromo b_{558} rispetto al controllo.



B

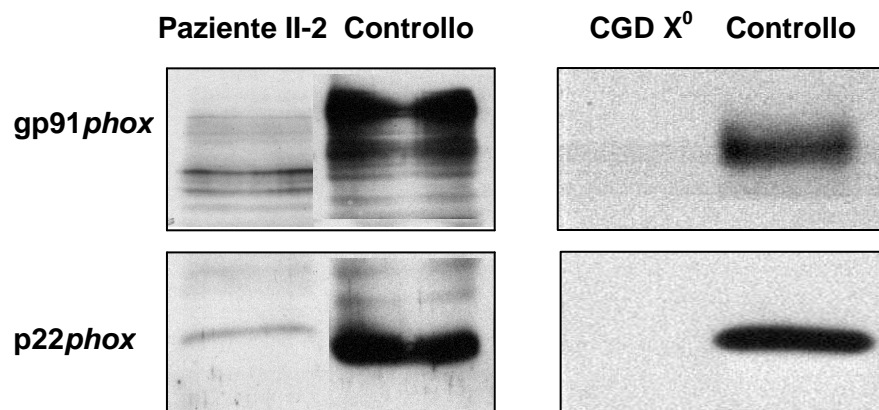


Figura 39: Spettro ridotto meno ossidato e western blot del citocromo b_{558} di neutrofilo di pazienti CGD. A) Spettro differenziale ridotto meno ossidato del citocromo b_{558} da neutrofilo di controllo, del paziente II-2 e di un paziente CGD X91⁰. B) Immunorivelazione delle due subunità (gp91phox e p22phox) del citocromo b_{558} di neutrofilo del paziente II-2, di un paziente CGD X91⁰ e neutrofilo di controllo. Le condizioni sperimentali sono descritte nella sezione Mat. e met. §§ 3.C.3-4.

La presenza di una quantità ridotta di citocromo b_{558} è stata confermata dall'analisi per western blotting, eseguita utilizzando depositando una identica quantità di estratto solubile in 1% Triton X-100 (50 μ g). La Figura 39B mostra infatti che le due bande corrispondenti a gp91phox e

p22 $phox$ sono notevolmente più deboli rispetto alle cellule di controllo. La specificità degli anticorpi monoclonali utilizzati per la rivelazione delle due subunità del citocromo b₅₅₈ (mAb 48 per gp91 $phox$ e mAb 449 per p22 $phox$) è confermata dall'assenza delle bande relative a queste stesse subunità negli estratti realizzati a partire dai neutrofilo di un paziente CGD X91⁰.

I fattori citosolici della NADPH ossidasi (p47 $phox$, p67 $phox$, p40 $phox$ e Rac2), rivelati per western blot, erano normalmente presenti (dati non mostrati).

Per poter distinguere l'espressione di Nox2 nei neutrofilo e negli eosinofilo, abbiamo condotto una serie di esperimenti in cui i granulociti del paziente II-2 venivano marcati contemporaneamente con l'anticorpo monoclonale BM16 (diretto contro il CRTH2 degli eosinofilo) e con l'anticorpo monoclonale 7D5 (diretto contro un epitopo esterno di gp91 $phox$) o con un anticorpo monoclonale aspecifico, come descritto in Mat. e met. § 3.D.1.4 (Figura 40). La percentuale di eosinofilo nelle due preparazioni cellulari era del 0.9% per le cellule di controllo e del 2.5% per le cellule del paziente II-2.

Il pannello in alto a destra mostra che sia i neutrofilo (99.2%) che gli eosinofilo (0.75%) del soggetto controllo esprimono la proteina gp91 $phox$. Per quanto riguarda il paziente II-2 (pannelli inferiori), nonostante la ridotta ma misurabile attività ossidasica evidenziata precedentemente (Tabella 12; Figg. 36-38), solamente gli eosinofilo (1.9%) esprimevano gp91 $phox$; tale proteina risultava infatti non espressa nelle cellule CRTH2 negative (97.0%).

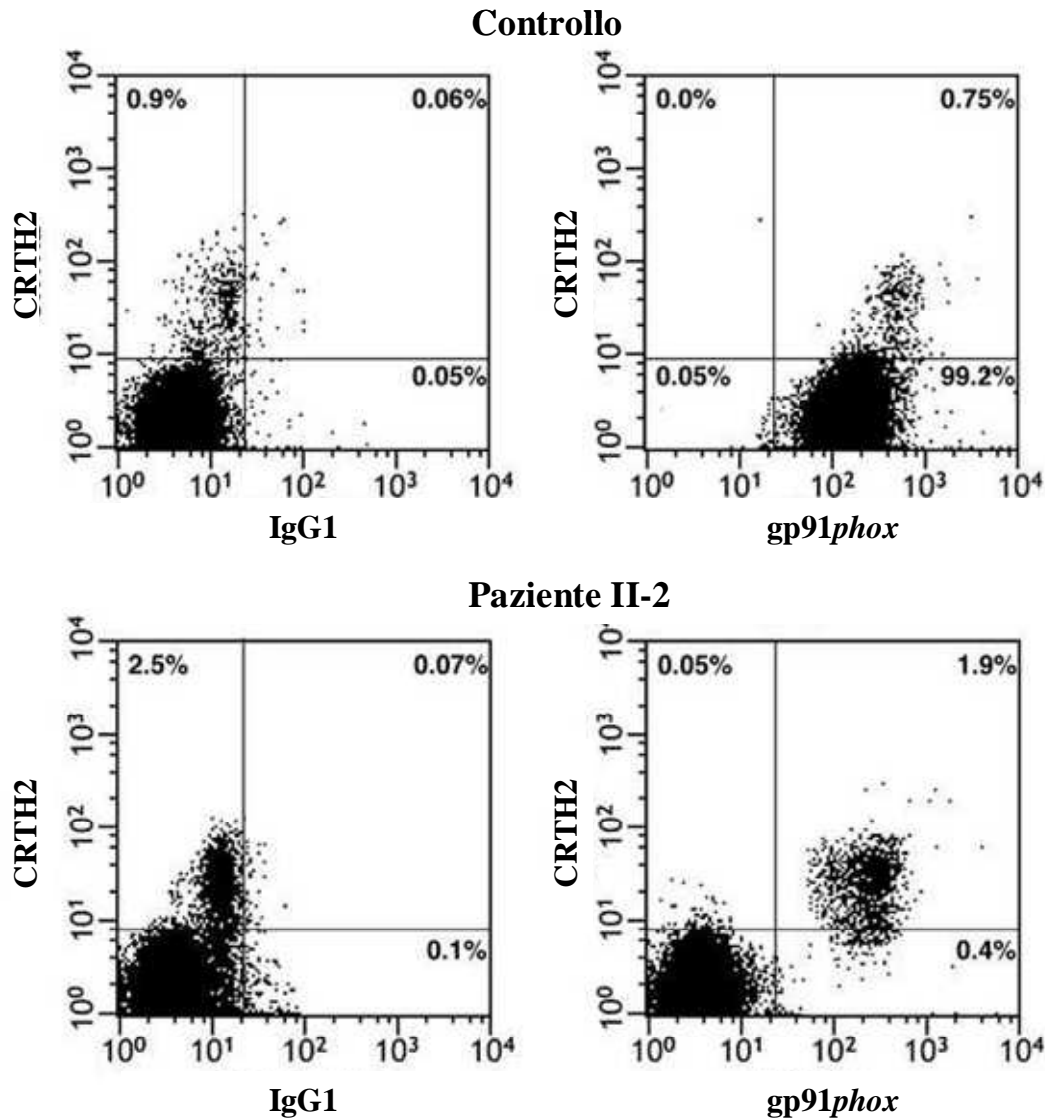


Figura 40: Analisi citofluorimetrica dell'espressione di superficie di gp91 $phox$ in neutrofilo ed eosinofilo. Le preparazioni granulocitiche del controllo (pannelli superiori) e del paziente II-2 (pannelli inferiori) sono marcate con il mAb 7D5, anti gp91 $phox$, e con il mAb BM16, anti CRTH2, (pannelli a destra) o con l'Ab aspecifico IgG1 e con il mAb anti CRTH2 (pannelli a sinistra). Le condizioni sperimentali sono quelle descritte nel § 3.D.1.4.

4.C.5 Identificazione del difetto molecolare

Per localizzare la mutazione nel mRNA codificante per gp91 $phox$ del paziente II-2, l'mRNA del paziente II-2 è stato trascritto tramite RT-PCR in 3 frammenti di cDNA sovrapposti, utilizzando tre paia di oligonucleotidi primers derivati dal cDNA di gp91 $phox$ (cfr Mat. e met. 3.E.2.2); i prodotti della PCR sono stati sequenziati e analizzati: nessuna mutazione è stata individuata nel cDNA della proteina gp91 $phox$. Abbiamo quindi deciso di amplificare per PCR

una parte della regione promotrice di *gp91phox* nel DNA genomico (Mat. e met. § 3.E.2.4; Stasia et al., 2003): l'analisi della sequenza ha permesso di mettere in evidenza l'inserimento di una timidina (T) tra le posizioni -54T e -56T (Figura 41A). Questa mutazione è localizzata tra le regioni “CCAAT” e “TATA”, in un sito di legame per i fattori di trascrizione del promotore di *gp91phox* responsabile della trascrizione del gene *CYBB* (Figura 41B).

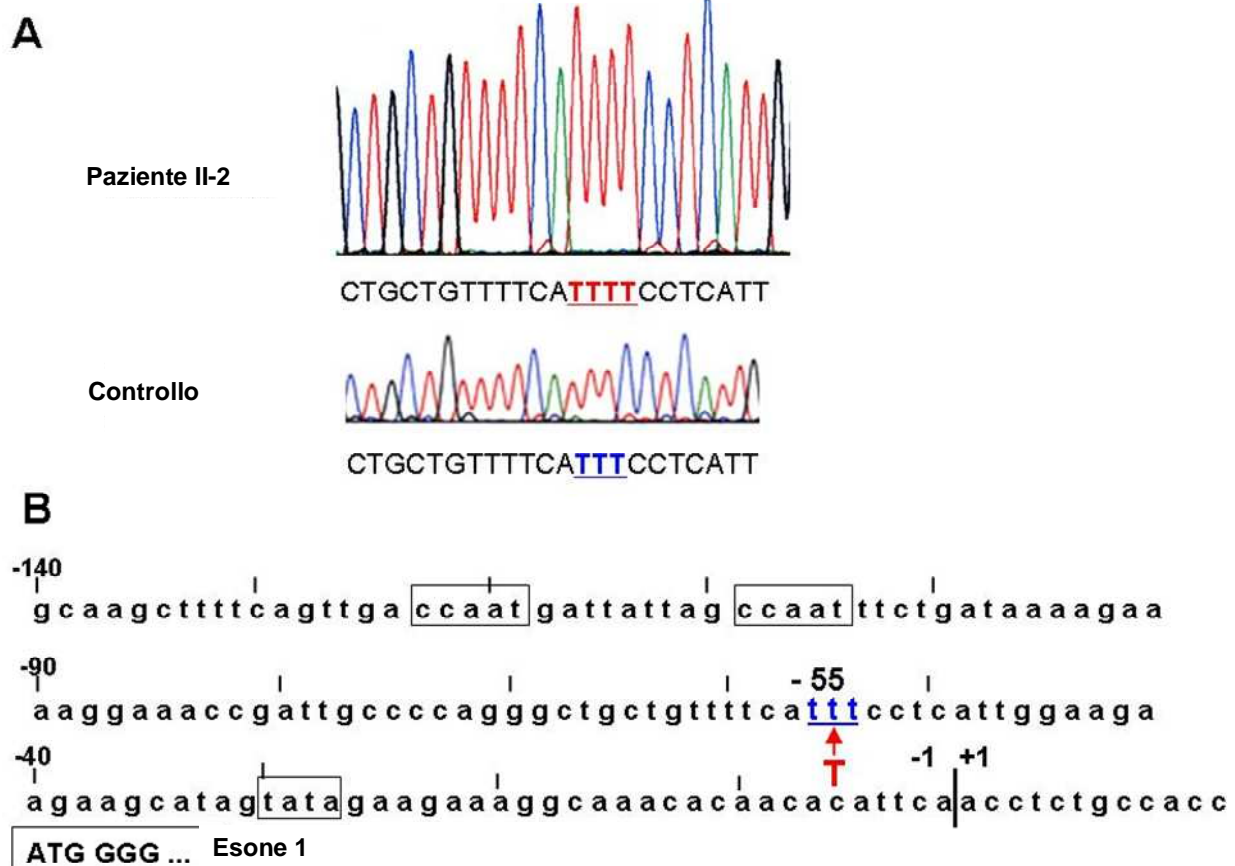


Figura 41: Analisi della mutazione nel gene *CYBB* del paziente II-2. I prodotti PCR sono purificati e sequenziati automaticamente dalla ditta Cogenics, Meylan, Francia, con i primers senso e antisense P1 e P2*. A) Inserzione di una timidina nella regione promotrice del gene *CYBB* del paziente II-2, in confronto alla sequenza di un soggetto controllo. B) Rappresentazione schematica della porzione del promotore del gene *CYBB*, con la localizzazione delle regioni “CCAAT” e “TATA”, il codone start ATG e la mutazione puntiforme descritta nel pannello A.

4.C.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Per valutare l'effetto della nuova mutazione nel promotore del gene *CYBB* sul legame specifico di un estratto nucleare ai fattori regolanti la trascrizione, abbiamo condotto una serie di esperimenti di *electrophoretic mobility shift assay*, secondo le procedure descritte in Mat. e met. § 3.G. Si tratta di una tecnica utilizzata per studiare l'interazione DNA-proteine e basata sul fatto che i complessi DNA-proteine migrano, in un gel di poliacrilammide, più lentamente rispetto al DNA non legato producendo uno "shift" nella migrazione del DNA marcato.

L'incubazione degli oligonucleotidi marcati a doppio filamento, corrispondenti alla regione promotrice (da -68 a -30), con l'estratto nucleare ottenuto dalle cellule PLB-985 permette di visualizzare sul gel la banda relativa al complesso DNA/proteine (Figura 42). La formazione di questo complesso risulta progressivamente inibita dall'aggiunta degli oligonucleotidi controllo (WT) non marcati a concentrazioni crescenti (20-, 50- e 100- volte più concentrati rispetto agli oligonucleotidi marcati). L'aggiunta di quantità crescenti di oligonucleotidi "mutati" (CGD X91) non marcati lasciava invece inalterato il complesso DNA/proteine.

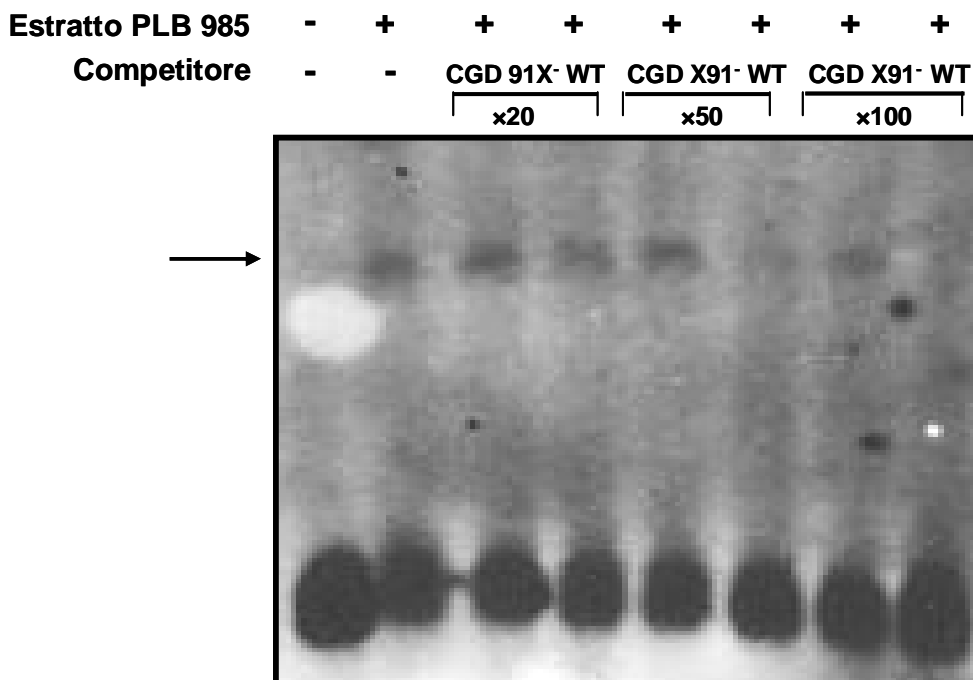


Figura 42: Electrophoretic Mobility Shift Assay. L'analisi per gel shift è eseguita come descritto in Mat. e met. § 3.G utilizzando la regione da -68 a -30 bp del promotore wild-type (WT) del gene *CYBB* come sonda marcata alla biotina. La sonda WT marcata è incubata in presenza di 10 µg di estratto nucleare ottenuto da cellule PLB-985 indifferenziate, dopo preincubazione con una concentrazione 20-, 50-, o 100- volte superiore di oligonucleotidi non marcati WT o mutati (CGD X91). I risultati sono rappresentativi di 3 esperimenti separati.

4.C.7 PCR semiquantitativa

Per valutare l'impatto della ridotta associazione dei fattori di trascrizione alla regione promotrice del gene *CYBB* mutato, ci siamo proposti di effettuare una stima della quantità di mRNA per *gp91phox* presente nei neutrofili del paziente II-2. A questo scopo abbiamo realizzato degli esperimenti di RT-PCR semiquantitativa, condotti in presenza di β -actina come gene di controllo ed in condizioni "non saturanti": la PCR è stata cioè eseguita per 25 cicli (invece dei 35 eseguiti classicamente); in questo modo l'amplificazione degli mRNA (per *gp91phox* e per la β -actina) si arrestava in corrispondenza della fase esponenziale, prima di raggiungere la saturazione. La Figura 43 mostra che, in queste condizioni, un frammento di 624 paia di basi (bp) di intensità paragonabile è ottenuto a partire dall'mRNA di *gp91phox* del soggetto controllo e dei pazienti CGD $X91^+$ e $X91^0$; invece, l'amplificazione dell'mRNA per *gp91phox* del paziente II-2 era sensibilmente più bassa. Il segnale corrispondente al gene della β -actina risultava invece paragonabile in tutti gli mRNA testati.

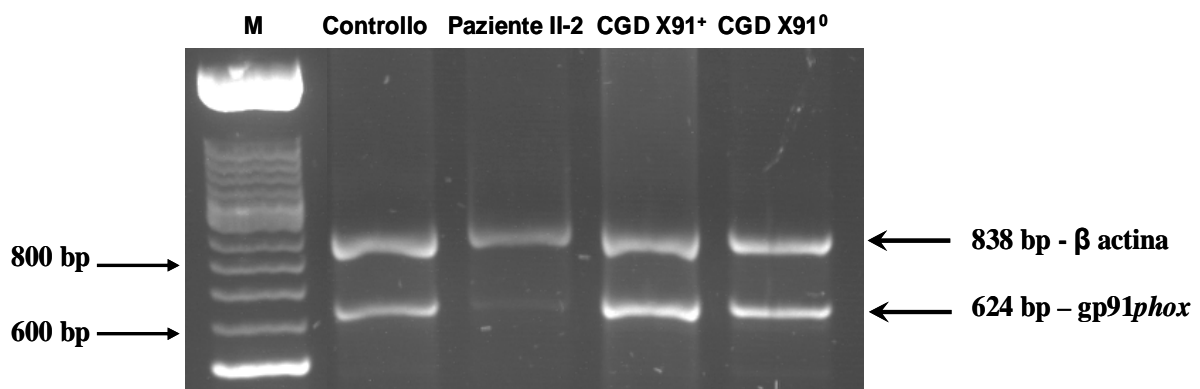


Figura 43: Amplificazione tramite RT-PCR semiquantitativa del mRNA di *gp91phox* del paziente II-2. L'mRNA di *gp91phox* del paziente II-2, di pazienti CGD $X91^+$ e $X91^0$ e di un soggetto controllo sono amplificati per RT-PCR secondo la procedura descritta in Mat. e met., § 3.E.2.5. Il gene della β -actina è utilizzato come controllo interno. M, markers di peso molecolare. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

4.C.8 Misura dell'attività microbica dei neutrofili del paziente

Infine, per valutare l'impatto della attività NADPH ossidasica residua sull'attività microbica dei neutrofili in vitro, abbiamo misurato il killing di queste cellule nei confronti dei batteri *S. aureus* ed *E. coli* e del fungo *C. albicans*: la Figura 44 mostra che l'attività microbica dei neutrofili del paziente II-2 è sovrapponibile a quella di un paziente CGD X⁰ (caratterizzato, lo ricordiamo, dall'assenza del citocromo b₅₅₈): i neutrofili del paziente CGD X⁻ non sono infatti in grado di uccidere *S. aureus* e *C. albicans*, nemmeno prolungando i tempi di incubazione (90 minuti); il killing di *E. coli*, che, com'è noto, è indipendente dall'attività NADPH ossidasica, risultava invece paragonabile a quello dei neutrofili controllo.

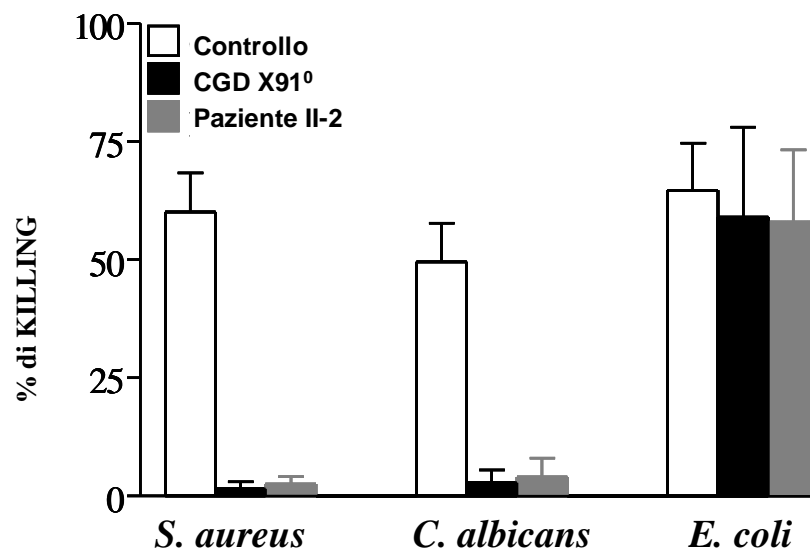


Figura 44: Attività microbica di neutrofili di pazienti CGD X. I neutrofili del soggetto controllo, del paziente II-2 e di un paziente CGD X91⁰ sono incubati con *S.aureus* opsonizzati a MOI 3-5:1, *C.albicans* a MOI 1-2:1 ed *E. coli* a MOI 3-5:1, secondo le modalità descritte in Mat. e met., § 3.F. I dati sono espressi come percentuale di killing dopo 45 min di incubazione per *S. aureus* ed *E.coli* e dopo 60 min di incubazione per *C. albicans*. I risultati sono la media \pm DS di 3-4 esperimenti per il paziente II-2 e 2-3 esperimenti per il paziente CGD X91⁰.

4.C.9 Discussione

In letteratura sono state finora descritte 26 mutazioni alla base di casi di CGD di tipo X⁻ *minus* (CGD X91⁻) (Stasia e Li, 2008); le mutazioni corrispondenti a questo fenotipo sono solitamente localizzate nella regione codificante (esoni) del gene *CYBB*. In qualche raro caso (<10%), le mutazioni a carico del gene *CYBB* determinano una riduzione dell'espressione della proteina gp91*phox* e, conseguentemente, una diminuzione dell'attività metabolica. Quattro di questi casi di CGD X⁻ sono dovuti a mutazioni presenti nel promotore di gp91*phox* (A-57C, T-55C, C-53T e C-52T), tutte localizzate tra le regioni "CCAAT" e "TATA", in un sito di legame per la famiglia dei fattori di trascrizione *ets* (da -57 a -50 paia di basi, 5'-GAGGAAAT-3', nel filamento leggero).

Nello studio qui presentato, abbiamo identificato una nuova mutazione alla base di un caso di CGD X⁻: l'inserimento di una timidina nella posizione da -54T a -56T nella regione promotrice del gene *CYBB*, responsabile della trascrizione della proteina gp91*phox*.

E' stato precedentemente dimostrato che le mutazioni C-52T e C-53T nel promotore del gene *CYBB* alterano l'espressione di gp91*phox* nei neutrofili dei pazienti CGD, rendendo queste cellule incapaci di generare i radicali attivi dell'ossigeno, senza alterare l'espressione della proteina negli eosinofili, che conservano quindi la loro attività ossidasica intatta (Weening et al., 2000). In quest'ultimo lavoro, la percentuale di eosinofili era elevata (pari al 20% e 26% della popolazione granulocitica totale), e potrebbe spiegare le condizioni cliniche relativamente buone di questa pazienti CGD. Diversi studi hanno infatti dimostrato in precedenza che l'espressione di gp91*phox* negli eosinofili è regolata dai fattori di trascrizione GATA (GATA-1, GATA-2 e GATA-3) e non dai fattori di trascrizione *ets* operanti nei neutrofili (Yang D et al., 2000; Kuribayashi et al., 1995). La prognosi clinica relativamente favorevole di questi pazienti CGD X⁻ troverebbe dunque spiegazione nella protezione contro gli agenti infettivi assicurata dal metabolismo ossidativo della NADPH ossidasi normalmente funzionale degli eosinofili, in una sorta di meccansimo compensatorio (Weening et al., 2000).

I casi di CGD X⁻ dovuti alle mutazioni T-55C o A-57C, sono invece caratterizzati da una piccola percentuale di neutrofili (5-10%) che esprimono una normale attività NADPH ossidasica (Newburger et al., 1994; Woodman et al., 1995), o da una debole attività metabolica residua (5% del controllo) omogeneamente ripartita in tutta la popolazione di neutrofili (Stasia et al., 2003); questi casi sono stati descritti come forme cliniche più gravi, in cui i pazienti soffrivano di infezioni severe e recidivanti. Le suddette mutazioni inibiscono fortemente il legame di Elf-1 e PU.1 (membri della famiglia di fattori di trascrizione *ets*, abbondantemente

espressi nelle cellule mieloidi) alla regione promotrice del gene *CYBB*: la conseguente diminuita espressione della proteina Nox2 sarebbe dovuta all'interferenza che tali mutazioni avrebbero sull'attività del promotore di *gp91phox*.

Nel caso clinico da noi riportato, il test NBT aveva messo in evidenza una, seppur debole, attività ossidasica residua nei neutrofili dei due pazienti. Tramite il saggio di riduzione della DHR, avevamo identificato un unico picco di fluorescenza, corrispondente ad una risposta metabolica omogenea e uniforme da parte della popolazione di neutrofili attivati dal PMA. Tale risposta equivaleva a circa il 6% della risposta metabolica ottenuta con i neutrofili di controllo.

I risultati da noi ottenuti al test NBT e al citofluorimetro avevano evidenziato una risposta fortemente positiva da parte degli eosinofili del paziente II-2 sia in termini di riduzione del nitroblu di tetrazolio sia in termini di ossidazione della DHR (Figg. 39 e 41). L'analisi citofluorimetrica della popolazione di neutrofili del paziente II-2 non ha tuttavia permesso di individuare la presenza di *gp91phox*: la quantità di proteina presente alla membrana è probabilmente inferiore ai limiti di sensibilità di questa metodica. In ogni caso, la ridotta percentuale di eosinofili nella preparazione granulocitica del paziente II-2 (corrispondente a circa il 2% del totale) non può spiegare la risposta metabolica, debole ma omogenea e inibita dal DPI, ottenuta in seguito alla stimolazione con PMA (Figg. 40 e 41).

La nuova mutazione da noi identificata è localizzata tra le sequenze "CCAAT" e "TATA", nella regione di legame dei fattori di trascrizione *ets* per *gp91phox*. E' noto che le mutazioni localizzate in questa regione sono correlate ad un'inibizione dell'associazione delle proteine leganti il DNA (in particolare, i fattori di trascrizione Elf-1 e P.U.1) e impediscono, di conseguenza, la normale e completa espressione del gene *CYBB* nei neutrofili e nei monociti (Newburger et al., 1994; Voo et al., 1999; Suzuki et al., 1998). Infatti, i risultati da noi ottenuti grazie agli esperimenti di *gel shift* hanno permesso di evidenziare la formazione di un complesso DNA-proteine a partire dell'estratto nucleare delle cellule PLB-985 e degli oligonucleotidi wild-type a doppio filamento, marcati alla biotina, della regione promotrice del gene *CYBB* (da -68 a -30) (Fig. 45). L'aumento della concentrazione delle sonde oligonucleotidiche WT non marcate causava la riduzione della formazione del complesso DNA-proteine, confermando la specificità del legame; invece, l'aggiunta delle sonde oligonucleotidiche mutate CGD X91⁻ non aveva alcun effetto sulla formazione del suddetto complesso. L'inibizione dell'associazione dei fattori di trascrizione alla regione promotrice causa quindi una riduzione dell'espressione dell'mRNA di *gp91phox* nei granulociti, come dimostrato dai risultati ottenuti per PCR-semiquantitativa (Fig. 43) e alla conseguente diminuita espressione del citocromo *b₅₅₈* nei neutrofili del paziente II-2 (Tabella 12 e Figura 39).

Allo scopo di comprendere il ruolo dell'attività NADPH ossidasica residua nell'attività microbica dei neutrofili CGD X91⁻, abbiamo voluto testare il killing dei neutrofili del paziente II-2 nei confronti di un battere Gram positivo (*S.aureus*), di un battere Gram negativo (*E. coli*) e di un fungo (*C. albicans*). Nella Figura 44 sono riportati i risultati ottenuti in questa serie di esperimenti, paragonati a quelli ottenuti con i neutrofili di un paziente CGD X91⁰. Com'era già stato dimostrato dal nostro gruppo in precedenza (Decleva E. et al, 2006) i neutrofili CGD X91⁰ non sono in grado di uccidere *S. aureus* e *C. albicans*, mentre il killing di *E. coli* è paragonabile a quello dei neutrofili controllo. I dati ottenuti rivelano che l'attività NADPH ossidasica residua (~ 6% del controllo) dei neutrofili del paziente II-2 non è sufficiente a garantirne l'attività microbica in vitro nei confronti di *S. aureus* e *C. albicans*, anche a lunghi tempi di incubazione (90 minuti; dati non mostrati).

I riferimenti in letteratura concernenti la valutazione dell'attività battericida di neutrofili CGD X⁻ sono estremamente rari (Bu-Ghanim et al., 1995; Roos et al., 1992); in questi precedenti lavori, gli autori avevano trovato che i neutrofili CGD X91⁻ presentavano, nei confronti di *S. aureus*, solamente un parziale difetto di killing, che risultava inoltre paragonabile a quello di neutrofili di soggetti CGD X91⁰. La discrepanza di questi risultati con quelli da noi ottenuti può essere spiegata dal fatto che la tecnica utilizzata per valutare l'attività microbica dei neutrofili è inficiata da un errore metodologico che conduce ad una sovrastima del potere microbica e che rende quindi inattendibili i risultati ottenuti (Decleva et al., 2006). Hamers e colleghi avevano evidenziato un difetto di killing di *E. coli* (ceppo ML35) da parte dei neutrofili di un paziente CGD X91⁻; in questo lavoro, l'attività battericida era stata valutata con la metodica della perforazione della parete batterica (Hamers et al., 1984). Come dimostrato da noi e da altri autori in precedenza, il killing di *E. coli* dipende essenzialmente dai meccanismi microbicidi ossigeno-indipendenti (Decleva et al., 2006; Rada et al., 2004); quindi, in questo caso, non siamo in grado di fornire una spiegazione per la differenza con i risultati da noi ottenuti, considerando che la tecnica della perforazione della parete batterica e quella della conta delle unità formanti colonie (CFU) avevano mostrato risultati paragonabili (Hamers et al., 1984). La nostra ipotesi è che il difetto di attività battericida riscontrato con la metodica della perforazione non rifletta i reali cambiamenti del numero di batteri sopravvissuti rilevato dalla tecnica della conta delle CFU, o che la discrepanza osservata sia dovuta al ceppo di *E. coli* utilizzato.

Nel caso clinico da noi riportato, il forte difetto di attività microbica trovato, in vitro, nei confronti di *S. aureus* e *C. albicans* (patogeni frequenti nei pazienti CGD), pur in presenza di una debole ma misurabile produzione di superossido, riflette le condizioni cliniche dei due pazienti, entrambi soggetti a gravi e ripetute infezioni, che, nel caso del paziente III-5, si sono

rivelate mortali. Questo quadro clinico è paragonabile a quello di altri pazienti CGD X91⁻ precedentemente descritti, che presentavano mutazioni a livello del promotore del gene *CYBB* (Newburger et al., 1994; Woodman et al., 1995). Tuttavia, la frequenza e la gravità delle infezioni che affliggono i pazienti CGD X91⁻ è molto variabile; la discrepanza tra le complicazioni infettive e il grado di funzionalità NADPH ossidasica in questi pazienti resta da chiarire. Una possibile spiegazione del miglior decorso clinico dei pazienti CGD X91⁻ risiede nell'elevata percentuale di eosinofili (superiore al 10%) che esprimono una NADPH ossidasi normalmente funzionale (Weening et al., 2000). Tale meccanismo di compensazione da parte degli eosinofili è tuttavia poco noto.

Le madri portatrici della forma classica di CGD X91⁰ sono generalmente protette contro le infezioni gravi, anche in caso di elevata inattivazione del cromosoma X (lyonizzazione), con un'estremamente bassa percentuale di neutrofili in grado di esibire un burst respiratorio normale (inferiore al 15%) (Anderson-Cohen et al., 2003). Sebbene la proporzione di cellule NBT-positive sia simile a quanto riscontrato in alcune varianti di CGD X91⁻, queste madri portatrici sono generalmente asintomatiche. Nel nostro studio, la produzione di metaboliti reattivi dell'ossigeno da parte dei neutrofili dei pazienti II-2 e III-5 era pari al 5-7% rispetto ai neutrofili di controllo. La frequenza e la gravità delle infezioni nei pazienti CGD X91⁻, nelle madri portatrici con elevata lyonizzazione, e nei due casi clinici qui riportati sono estremamente eterogenee, sebbene tutti questi individui presentino livelli paragonabili di burst respiratorio (variabile tra il 5 e il 15% rispetto al normale). Inoltre, le madri portatrici della forma di CGD X⁰, mostrano, in vitro, un'attività microbica corrispondente circa al 50% del normale (cfr. allegato). Le motivazioni della discrepanza tra le complicazioni infettive e la funzionalità ossidasica in questi soggetti non sono note; esiste, forse, una sorta di "livello critico" di attività ossidasica, al di sotto del quale il burst respiratorio non è sufficiente a sostenere un'attività di killing dei microrganismi e al di sopra del quale il decorso clinico dei pazienti sarebbe più favorevole.

In questo contesto, si rivela interessante lo studio di linee cellulari mieloidi transfettate con complessi NOX mutati e che mostrano differenti livelli di burst respiratorio.

In questa tesi ci siamo proposti di riesaminare i meccanismi implicati nell'attività microbica dei neutrofili, alla luce delle nuove ipotesi proposte recentemente (Reeves et al., 2002; Ahliwalia et al., 2004; Segal, 2005) impiegando una metodica corretta di misura del killing microbico recentemente messa a punto (Decleva et al., 2006).

Nel complesso, i risultati da noi ottenuti provano che:

- e. L'attività NADPH ossidasica è indispensabile per il killing di certi microrganismi (quali *S. aureus* e *C. albicans*) ma non per altri (quali *E. coli*) che sono uccisi efficacemente anche in assenza di burst respiratorio.
- f. I flussi di ioni potassio e l'alcalinizzazione del pH intrafagosomale, indotti dall'attivazione del complesso ossidasi, non sono necessari al killing di *S. aureus* e *C. albicans*.
- g. L'attività antimicrobica NADPH ossidasi-dipendente è mediata quasi esclusivamente dalla mieloperossidasi.
- h. Le correnti di ioni K^+ sembrano responsabili dell'attività microbica residua dei neutrofili MPO-deficienti, a lunghi tempi di incubazione; questi flussi di potassio sarebbero tuttavia mediati da canali diversi da quelli individuati dal gruppo di Segal (canali BKCa) la cui presenza non è stata confermata nei neutrofili.

I meccanismi implicati nell'attività microbica dei neutrofili sono stati studiati anche ricorrendo ad un modello sperimentale ampiamente utilizzato in letteratura per le ricerche sul funzionamento del complesso NADPH ossidasi: la linea cellulare PLB-985 differenziabile in *neutrophils-like*.

In questo contesto, i risultati da noi ottenuti suggeriscono che:

- b. La produzione di ROS da parte delle linee cellulari PLB-985 in risposta a stimoli particolati (microrganismi opsonizzati) è sensibilmente più debole rispetto ai neutrofili umani;
- c. Tale burst respiratorio è responsabile di un'attività microbica, nei confronti di microrganismi sensibili ai meccanismi di killing ossigeno-dipendenti (*S. aureus* e *C. albicans*), paragonabile a quella dei PMN a tempi brevi di incubazione; prolungando i tempi di fagocitosi, il potere microbica di queste cellule risulta invece abolito.
- d. Nei confronti di *E. coli*, battere sensibile ai processi di killing ossigeno-indipendenti, l'attività microbica delle cellule PLB-985 risulta ritardata e parzialmente difettosa se paragonata ai neutrofili;
- e. La super-produzione di anioni superossido, evidenziata nelle cellule PLB-985 Dloop_{Nox4}-Nox2 in risposta a stimoli solubili e particolati, non è accompagnata da

un'aumentata capacità microbica di queste cellule nei confronti di *S.aureus*, *C.albicans* ed *E. coli*.

- f. Nelle cellule PLB-985 i processi microbicidi non ossidativi risultano compromessi, a causa della carenza parziale (MPO, elastasi, catepsina G, β -glucuronidasi, CD11b) o totale (lattoferrina, lisozima, MMP-8, MMP-9) degli enzimi e delle proteine granulari coinvolti nell'attività antimicrobica e a causa della loro difettosa esocitosi.
- g. In particolare, i nostri risultati suggeriscono un difetto a livello della biogenesi dei granuli specifici e terziari.

Il ridotto funzionamento del complesso enzimatico NADPH ossidasi è alla base di una rara malattia genetica, la malattia granulomatosa cronica. Parte di questo lavoro di tesi è stata dedicata alla caratterizzazione di un caso atipico di CGD, la forma X91⁻. I risultati ottenuti ci hanno permesso di dimostrare che:

- d. la nuova mutazione da noi descritta nel promotore del gene *CYBB* (inserzione di una T nella posizione da -54T a -57T) é responsabile della ridotta associazione dei fattori di trascrizione *ets* con la regione promotrice, impedisce una normale espressione del gene nei neutrofilo dei pazienti ed é correlata alla ridotta attività ossidasica misurata in tutta la popolazione di granulociti;
- e. l'espressione e l'attività funzionale della NADPH ossidasi appaiono invece normali negli eosinofili, suggerendo che l'espressione di *gp91phox* in queste cellule é regolata da fattori di trascrizione differenti da quelli operanti nei neutrofilo;
- f. l'attività ossidasica residua (5-7% del normale) non é di per sé sufficiente a garantire un'attività di killing nei confronti di *S. aureus* e *C. albicans* e a proteggere il paziente contro le infezioni .

A

Absolom DR: Basic Methods for the study of phagocytosis, in *Methods in enzymology*, vol. 132, 1986.

Aderem A, Ulevitch RJ: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* (2000);406;782-787.

Agner K: Verdoperoxidase. A ferment isolated from leukocytes. *Acta Chem Scand. A* (1941)2 (Suppl. 8); 1-62.

Agner K: Peroxidative oxidation of chloride ions. In *Proceedings of the 4th international congress on biochemistry*, Vienna (1958); 15: 64A.

Agner K: Biological effects of hypochlorous acid formed by MPO- peroxidation in the presence of chloride ions. In *Structure and Function of Oxidation Reduction Enzymes*, vol. 18 (A. Akesson and A. Ehrenberg eds.) New York, NY, Pergamon (1972); 329-33.

Akira S, Takeda K, Kaisho T: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* (2001); 2:675-680.

Ahluwalia J, Tinker A, Clapp LH, Duchon MR, Abramov AY, Pope S, Nobles M, Segal AW : The large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel is essential for innate Immunity. *Nature* (2004) ; 427(6977):853-8.

Ambruso DR, Knall C, Abell AN, Panepinto J, Kurkchubasche A, Roos D et al.: Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000); 97:4654– 4659

Anderson-Cohen M, Holland SM, Kuhns DB, Fleisher TA, Ding L, Brenner S et al.: Severe phenotype of chronic granulomatous disease presenting in a female with a de novo mutation in gp91-phox and a non familial, extremely skewed X chromosome inactivation. *Clin Immunol.* (2003); 109:308-317.

Aratani Y, Koyama H, Nyui S, Suzuki K, Kura F, Maeda N: Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun.* (1999) Apr;67(4):1828-36.

Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Dinauer MC, Maeda N, Koyama H : Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* (2002) Dec;40(6):557-63.

Arnljots K, Sorensen O, Lollike K, Borregaard N: Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia* (1998); 12:1789-1795.

B

Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT : Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest.* (1973) ; 52(3):741-4.

Bainton DF, Farquhar MG: Origin of granules in polymorphonuclear leucocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes. *J Cell Biol* (1966); 28:277-301.

Bainton DF, Ulliyot MG, Farquhar MG: The development of neutrophilic polymorphonuclear leucocytes in human bone marrow. *J Exp Met* (1971); 134:907-934.

Banfi B, Maturana A, Jaconi S, Aurnaudeau S, Laforge T, Sinha B, Ligeti E, Demaurex N, Krause KH: A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NAD(P)H oxidase homolog Nox-1. *Science* (2000); 287:138-142.

Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaurex N, Krause KH: A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen and lymph nodes. *J Biol Chem* (2001); 276:37594-37601.

Banneberg GI, Chiang N, Ariel A, *et al.*: Molecular circuits of resolution : formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol* (2005); 174:4345-4355.

Barese CN, Goebel WS, Dinacour MC: Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Expert Opin Biol Ther.* (2004); 4: 1423-1434.

Bedard K, Krause KH: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* (2007) Jan;87(1):245-313.

Biberstine-Kinkade KJ, Yu L, Dinauer MC. Mutagenesis of an arginine- and lysine-rich domain in the gp91phox subunit of the phagocyte NADPH-oxidase flavocytochrome b558. *J Biol Chem* (1999); 274: 10451-10457.

Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinauer MC: Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91phox. *J Biol Chem* (2001); 276: 31105-31112.

Bionda C, Li XJ, van Bruggen R, Eppink M, Roos D, Morel F, Stasia MJ: Functional analysis of two-amino acid substitutions in gp91phox in a patient with X-linked flavocytochrome b558-positive chronic granulomatous disease by means of transgenic PLB-985 cells. *Hum Genet.* (2004); 115: 418-427.

Bissonnette SA, Glazier CM, Stewart MQ, Brown GE, Ellson CD, Yaffe MB: Phosphatidylinositol 3-phosphate-dependent and -independent functions of p40phox in activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* (2008); 283:2108-2119.

Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA: Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol.* (1983) 97:52-61.

Borregaard N, Tauber AI : Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase b – cytochrome and associated flavoprotein. *J Biol Chem* (1984);242;1295-1298.

Borregaard N, Miller LJ, Springer TA. Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils. *Science.* 1987 Sep 4;237(4819):1204-6.

Borregaard N, Kjeldsen L, Rygaard K, Bastholm I, Nielsen MH, Sengelov H, Bjerrum OW, Johnsen AH: Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *J Clin Invest.* (1992); 90:86-96.

Borregaard N, Kjeldsen L, Sengelov H, Diamond MS, Springer TA, Anderson HC, Kishimoto TK, Bainton DF: Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* (1994); 56:80-87.

Borregaard N, Sehested M, Nielsen BS, Sengelov H, Kjeldsen L: Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophils differentiation. *Blood* (1995); 85:812-817.

Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* (1997) May 15;89(10):3503-21.

Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard MK: Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* (2007); 8: 340-345.

Boulven I, Levasseur S, Marois S, Pare G, Rollet-Labelle E, Naccache PH: Class IA phosphatidylinositide 3-kinase, rather than p110 gamma, regulate formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated chemotaxis and superoxide production in differentiated neutrophil-like PLB-985 cells. *J Immunol.* (2006); 176: 7621-7627.

Boyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. (1968) *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 7.

Brinkmann V, Reichard U, Goosman C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* (2004); 303: 1532-1535.

Brochetta C, Perrotta MG, Jeromin A, Romano M, Vita F, Soranzo MR, Borelli V, Roder J, Zabucchi G: Identification and subcellular localization of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in human neutrophils and HL-60 cells. *Inflammation* (2003); 27:361-372.

Brochetta C, Vita F, Tiwari N, Scanduzzi L, Soranzo MR, Guerin-Marchand C, Zabucchi G, Blank U: Involvement of Munc18 isoforms in the regulation of granule exocytosis in neutrophils. *BBActa* (2008); 1783 :1781–1791.

Brumell JH, Volchuk A, Sengelov H, Borregaard N, Cieutata AM, Bainton DF, Grinstein S. Klip: subcellular distribution of docking/fusion proteins in neutrophils, secretory cells with multiple exocytic compartments. *J Immunol* (1995); 155:5750-5759.

Busetto S, Trevisan E, Declava E, Dri P, Menegazzi R: Chloride Movements in Human Neutrophils during Phagocytosis: characterization and relationship to granule release. *J Immunol* (2007); 179: 4110-4124.

Bu-Ghanim HN, Segal AW, Keep NH, Casimir CM: Molecular analysis in three cases of X91-variant chronic granulomatous disease. *Blood* (1995); 86: 3575-3582.

C

Cassatella MA, Bazzoni F, Flynn RM, Dusi S, Trinchieri G, Rossi F: Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J Biol Chem* (1990); 265:20241-20246.

Cassatella MA, Bazzoni F, Calzetti F, Guasparri I, Rossi F, Trinchieri G: Interferon- γ transcriptionally modulates the expression for the high affinity IgG-Fc Receptor and the p47-kDa cytosolic component of NADPH oxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* (1991) 266; 22079-22082.

Cech P, Stalder H, Widmann JJ, Rohner A, and Miescher PA: Leukocyte myeloperoxidase deficiency and diabetes mellitus associated with *Candida albicans* liver abscess. *Am. J. Med.* (1979) ;66:149–153.

Cech P, Lehrer RI: Phagolysosomal pH of human neutrophils. *Blood* (1984); 63: 88-95.

Chapple DS, Mason DJ, Joannou CL, Odell EW, Gant V, Evans RW: Structure–function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111, *Infect. Immun.* 66 (1998) ; 2434–2440.

Cheng N, He R, Tjan J, Dinaeur MC, Ye RD: A critical role of protein kinase C delta activation loop phosphorylation in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced phosphorylation of p47(phox) and rapid activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *J Immunol* (2007) 179(11): 7720-7728.

Collins SJ: The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* (1987); 70: 1233-1244.

Crivellato E, Candiusso L, Mallardi F, Roibatti D: Recombinant human alpha-2 α interferon promotes an atypical process of mast cells secretion with ultrastructural features suggestive for piecemeal degranulation. *J Anat.* (2002);201:507-512.

Cross AR, Noack D, Rae J, Curnutte JT, Heyworth PG: Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (first update). *Blood Cells Mol Dis.* (2000); 26: 561-565.

D

Dale DC, Liles WC, Llewellyn C, Price TH: Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on neutrophil kinetics and function in normal human volunteers. *Am. J. Hematol.* (1998) 7-15.

Dahlgren, C., Karlsson, A: Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* (1999); 232,3-14.

Davies B, Edwards SW: Inhibition of myeloperoxidase by salicylhydroxamic acid. *Biochem J* (1989) 258(3); 801-806

Decleva E, Menegazzi R, Busetto S, Patriarca P, Dri P : Common methodology is inadequate for studies on the microbicidal activity of neutrophils. *J Leukoc Biol.* (2006);79(1):87-94.

DeCoursey TE, Kim SY, Silver MR, Quandt FN: Ion channel expression in MA-differentiated human THP-1 macrophages. *J Membr Biol* (1996) 152; 141-157.

DeCoursey TE, Cherny VV, Morgan D, Katz BZ, Dinaeur MC: The gp91phox component of NADPH oxidase is not the voltage-gated proton channel in phagocytes, but it helps. *J Biol Chem.* (2001); 276 (39): 36063-36066.

DeCoursey TE, Morgan D, Cherny VV: The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. *Nature* (2003); 422: 531-534.

DeCoursey TE: Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physiol Rev.* (2004); 83: 475-579.

Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GAP, Curnutte JT, Orkin SH: Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox): gene structure, chromosomal location and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest.* (1990); 86: 1729-1737.

De Silva-Santos JE, Santos-Silva MC, Cunha Fde Q, Assreuy J: The role of ATP-sensitive potassium channels in neutrophil migration and plasma exudation. *J Pharmacol Exp Ther* (2002) 300:946-951.

DeLeo FR, Quinn MT: Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol.* (1996); 60: 677-691.

DeLeo FR, Burritt JB, Yu L, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Nauseef WM: Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem.* (2000); 275: 13896-13893.2000

E

El Hassani RA, Benfares N, Caillou B, Talbot M, Sabourin JC, Belotte V, Morand S, Gnidehou S, Agnandji D, Ohayon R, Kaniewski J, Noël-Hudson MS, Bidart JM, Schlumberger M, Virion A, Dupuy C: Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2005);288(5):G933-42.

El Benna J, Faust LRP, Babior BM: The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinase. *J Biol Chem* (1994); 269:23431-23436.

El Benna J, Faust LRP, Johnson JL, Babior BM: Phosphorylation of the respiratory burst subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* (1996); 271:6374-6378.

Elsbach P: The bactericidal/permeability increasing protein (BPI) in antimicrobial host defense. *J Leukoc Biol* (1998); 64:14-18.

Elsbach P, Weiss J and Levy O: Oxygen-independent antimicrobial systems of phagocytes; In: Gallin JI and Snyderman: *inflammation: Basic principle and clinical correlates* pagg. 801-817. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (1999). VI ediz.

Essin K, Salanova B, Kettritz R, Sausbier M, Luft FC, Kraus D, Bohn E, Autenrieth IB, Peschel A, Ruth P, Gollasch M: Large conductance calcium activated potassium channel activity is absent in human and mouse neutrophils and is not required for innate immunity. *Am J Physiol Cell Physiol* (2007) 293:C45-C54.

Ezekowitz RA, Orkin SH, Newberg PE: Recombinant interferon gamma augments phagocyte superoxide production and X-chronic granulomatous disease gene expression in X-linked variant chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* (1987); 4: 1009-1016.

F

Faurschou M, Sorensen OE, Johnen AH, Askaa J, Borregaard N: fensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory proprieties. *Biochem Biophys Acta* (2002); 1591:29-35.

Faurschou M, Borregaard B: Neutrophils granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* (2003); 5:1317-1327.

Fay AJ, Qian X, Jan YN, Jan LY: SK channels mediate NADPH oxidase-independent reactive oxygen species production and apoptosis in granulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006); 103: 17548-17553.

Femling JK, Cherny VV, Morgan D, Rada B, Davis AP, Czirjak G, Enyedi P, England SK, Moreland JG, Ligeti E, Nauseef WM, DeCoursey TE: The antibacterial activity of human neutrophils and eosinophils requires proton channels but not BK channels. *J Gen Physiol* (2006) 27:659-672.

Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A: Lipocalin 2 mediates an innate immune reponse to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* (2004);432:917-921.

Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA, Broaddus VC: Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J Clin Invest* (1995); 96:107-116.

Foote CS, Goyne TE, Lehrer RI: Assessment of chlorination by human neutrophils, *Nature* (1983) 301 (5902); 715-716.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychinsky A: Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* (2007); 176: 231-241.

G

Gallin EK: Calcium- and voltage- activated potassium channels in human macrophages. *Biophys J* (1984) 46; 821-825.

Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML: Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high-conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* (1990) 265: 11083–11090.

Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL: Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000); 97:8010

Geiszt M, Lejstrom K, Witta J, Leto TL: Proteins homologous to p47phox support superoxide production by NADPH oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem* (2003); 278: 20006-20012.

Gerber CE, Bruchelt G, Falk UB, Kimpfler A, Hauschild O, Kuçi S, Bächli T, Niethammer D, Schubert R: Reconstitution of bactericidal activity in chronic granulomatous disease cells by glucose-oxidase-containing liposomes. *Blood* (2001); 98:3097-3105.

Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST: Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* (2006) 110: 103–116.

Gimenez-Gallego G, Navia MA, Reuben JP, Katz GM, Kaczorowski GJ, Garcia ML: Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) 85: 3329–3333.

Grange L, Nguyen C, Lardy B, Derouazi M, Campion Y, Trocme C, Paclet MH, Gaudin P, Morel F: NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antiox Redox Signal* (2006); 8:1485-1496

Gregoire C, Welch H, Astarie-Dequeker C, Maridonneau-Parini I: Expression of azurophil and specific granule proteins during differentiation of NB4 cells in neutrophils. *J Cell Physiol.* (1998); 175: 203-210.

Grinstein S, Furuya W: Assessment of Na^+ - H^+ exchange activity in phagosomal membranes of human neutrophils. *Am J Physiol.* (1988);254(2 Pt 1):C272-85

Grizot S, Grandvaux N, Fieschi F, Faure J, Massenet C, Andrieu JP, Fuchs A, Vignais PV, Timmins PA, Dagher MC, Pebay-Peyroula E: Small angle neutron scattering and gel filtration analyses of neutrophil NADPH oxidase cytosolic factors highlight the role of the C-terminal end of p47phox in the association with p40phox. *Biochemistry* (2001); 40: 3127-3133.

Guyonnet V, Johnson JK, Bangalore N, Travis J, Long PL: In vitro activity of the human neutrophil cathepsin G on *Eimeria tenella* sporozoites. *J Parasitol.* (1991); 77:775-779.

H

Hamers MN, Bot AA, Weening RS, Sips HJ, Roos D: Kinetics and mechanism of the bactericidal action of human neutrophils against *Escherichia Coli*. *Blood* (2000) 64; 635-641.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC: Inside the neutrophils phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* (1998); 92:3007-3017.

Harrison JE, Schultz J: Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *Biol Chem.* (1976); 251: 71-77.

Hartmann J, Sceppek S, Lindau M: Regulation of granule size in human and horse eosinophils by number of fusion events among unit granules. *J Physiol.* (1995); 483:201-209.

Hazan-Eitan Z, Weinstein Y, Hadad N, Konforty A, Levy R: Induction of Fc γ RIIA expression in myeloid PLB cells during differentiation depends on cytosolic phospholipase A2 activity and is regulated via activation of CREB by PGE2. *Blood* (2006); 108: 1758-1766.

Henderson LM, Chappell JB, Jones OT. The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H^+ channel. *Biochem J.* (1987); 246: 325-329.

Heyworth PG, Bohl BP, Bokoch GM, Curnutte JT: Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase component p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *J Biol Chem.* (1994); 269: 30749-30752.

Hide I, Bennett JP, Pizzey A, Boonen G, Bar-Sagi D, Gomperts BD *et al.*: Degranulation of individual mast cells in response to Ca^{2+} and guanine nucleotides: an all-or-non event. *J Cell Biol.* (1993); 123:585-593.

I

Imhof BA, Aurrand-Lions M: Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat. Rev. Immunol.* (2004); 4:432-444.

Iovine NM, Elsbach P, Weiss J: An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 10973–10978.

Ismail G, Boxer IA, Baehner RI: Utilization of liposomes for correction of the metabolic and bactericidal deficiencies in chronic granulomatous disease. *Pediatr Res.* (1979); 13:769-773.

Ito T, Matsui Y, Ago T, Ota K, Sumimoto H: Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. *EMBO J.* (2001); 20:3938-3946.

J

Jankowski A, Grinstein S: A noninvasive fluorimetric procedure for measurement of membrane potential. Quantification of the NADPH oxidase-induced depolarization in activated neutrophils. *J Biol Chem* (1999); 274: 26098-26104.

Jerlich A, Fritz G, Kharrazi H, Hammel M, Tschabuschnig S, Glatter O, Schaur RJ: Comparison of HOCl traps with myeloperoxidase inhibitors in prevention of low density lipoprotein oxidation; *BBActa* (2000) 1481 ; 109-118

Johnson Jr RB, Baehner RL: Improvement of leukocyte bactericidal activity in chronic granulomatous disease. *Blood* (1970); 35: 350-355.

Johnston JJ, Rintels P, Chung J, Sather J, Benz Jr EJ, Berliner N: Lactoferrin gene promoter: structural integrity and nonexpression in HL-60 cells. *Blood* (1992); 79: 2998-3006.

K

Kang EM, Choi U, Theobald N, Linton G, Long Priel DA, Kuhns D, Malech HL : Retrovirus gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease can achieve stable long-term correction of oxidase activity in peripheral blood neutrophils. *Blood*. 2010 Jan 28;115(4):783-91.

Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V: The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Trends in Innate Imm.* (2008); 15:118-146.

Katschinski DM, Robins HI, Schad M, Frede S, Fandrey J: Role of tumor necrosis factor alpha in hyperthermia-induced apoptosis of human leukemia cells. *Cancer Res.* (1999); 59: 3404-3410.

Kenney RT, Malech HL, Epstein ND, Roberts RL, Leto TL: Characterization of the p67-phox gene: genomic organization and restriction fragment length polymorphism analysis for prenatal diagnosis in chronic granulomatous disease. *Blood* (1993); 82: 3739-3744.

Kitahara M, Simonian Y, Eyre Hi: Neutrophil myeloperoxidase: A simple, reproducible technique to determine activity. *J Lab Clin Med*(1979) 93:232-237.

Kjeldsen L, Bjerrum OW, Askaa J, Borregaard N: Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, conforming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochem. J* (1992); 287 (Pt 2) 603-610.

Klebanoff SJ, White RL: Iodination defect in the leukocytes of a patient with chronic granulomatous disease of childhood. *N Eng J Med.* (1969); 280: 460-466.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leucocytes. *Sciences* (1970) 169; 1095-1097

Klebanoff SJ, Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Semin Hematol.* (1975);12(2):117-42.

Klebanoff SJ, Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians* (1999);111(5):383-389

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77:598-625.

Koch C: Effect of sodium azide upon normal and pathological granulocytes function. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B* (1974); 82:136-142.

Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H: Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67phox participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem.* (1999); 274: 25051-25060.

Krause KH, Welsh MJ: Voltage-dependent and Ca^{2+} -activated ion channels in human neutrophils. *J Clin Invest.* (1990) 85:491-498.

Kuribayashi F, Kumatori A, Susuki S, Nkamutra M, Matsumoto T, Tsuji Y: Human peripheral eosinophils have a specific mechanism to express gp-91phox, the large subunit of cytochrome b558. *Biochem Biophys Res Commun.* (1995); 209. 146-152.

Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H: The adaptor protein p40phox as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J.* (2002); 21: 6312-6320.

L

Laemmli, U.K., Favre, M: Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol* (1973); 80, 575-99.

Larrocha C, Fernández de Castro M, Fontan G, Vilorio A, Fernández-Chacón JL, Jiménez C : Hereditary myeloperoxidase deficiency: study of 12 cases. *Scand J Haematol.* (1982) Nov;29(5):389-97.

Lawson K: Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. *Kidney Int.* (2000) 57; 838-845.

Lehrer RI, Cline Mi: Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: The role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection. *J Clin Invest* (1969); 48:1478-1488.

Lehrer RI: Inhibition by sulfonamides of the candidacidal activity of human neutrophils. *J Clin Invest* (1971) 50:2498-2505.

Let TL, Lomax KJ, Volpp BD, Nunoi H, Sechler JMG, Nauseef WM, Clark RA, Gallin JL, Malech HL: Cloning of a 67KDa neutrophil oxidase factors with similarity to a noncatalytic region of p90s-src. *Science* (1990); 248: 727-730.

- Leto** TL, Lomx KJ, Volpp BD, Nunoi H, Secler JMG, Nauseef WM *et al.*: Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a non-catalytic region of p60_{c-src}. *Science* (1990); 248: 727-730.
- Leto** TL, Adams AG, De Mendez I: Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: Binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc Natl Acad Sci* (1994); 91:10650-10654.
- Le Cabec** V, Calafat J, Borregaard N: Sorting of the specific granule protein, NGAL, during granulocytic maturation of HL-60 cells. *Blood* (1997); 89: 2113-2121.
- Li** XJ, Grünwal D, Mathieu J, Morel F, Stasia MJ: Crucial role of two potential cytosolic regions of Nox2, ¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰ and ⁴⁸⁴DESQANHFAVHHDEEKD⁵⁰⁰, on NADPH oxidase activation. *J Biol Chem* (2005); 280: 14962-14973.
- Li** XJ, Fieschi F, Paclet MH, Grunwald D, Champion Y, Gaudin P, Morel F, Stasia MJ: Leu505 of Nox2 is crucial for optimal p67phox-dependent activation of the flavocytochrome b558 during phagocytic NADPH oxidase assembly. *J Leukoc Biol.* (2007); 81: 238-249.
- Liese** JG, Jendrossek V, Jansson A, Petropoulou T, Kloos S, Gahr M. *et al.* : Chronic granulomatous disease in adults. *Lancet* (1996) ; 346 : 220-223.
- Logan** MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R: Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol* (2003); 111:923-932.
- Lollike** K, Lindau M, CalafatJ, Borregaard N: Compound exocytosis of granules in human neutrophils. *J Leukoc Biol.* (2002); 71:973-980.
- Lomax** KJ, Leto TL, Nunoi H, Gallin JI, Malech HL: Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatouse disease. *Science* (1989); 245: 409-412.
- Lopes** LR, Dagher MC, Gutierrez A, Young B, Bouin AP, Fuchs A, Babior BM: Phosphorylated p40phox as a negative regulator of NADPH oxidase. *Biochemistry* (2004); 43: 3723-3730.
- Lu** R, Alioua A, Kumar Y, Eghbali M, Stefani E, Toro L : MaxiK channel partners: physiological impact. *J Physiol* (2006) ; 570: 65–72.

M

Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, Linton GF, Sekhsaria S, Vowells SJ *et al.*: Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997); 94: 12133-12138.

Marciano BE, Welsey R, De Carlo ES, Anderson VL, Barnhart LA, Darnell D, Malech HL, Gallin JI, Holland SM: Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* (2004); 39(5): 692-699.

Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Stelmazynska T: Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators, *J. Leukoc. Biol.* (1995) ; 58 :667-674.

Margolis DM, Melnick DA, Alling DW, Gallin JI : Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of chronic granulomatous disease. *J Infect Dis* 1990;162:723-6.

Matsumoto T, Yokoi K, Mukaida N *et al.*: Pivotal role of interleukin-8 in the acute respiratory distress syndrome and cerebral reperfusion injury. *J Leukoc Biol* (1997); 62:581-587.

Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, Waterhouse CC, Li XJ, Marchal CC, Stull ND, Lewis DB, Steele M, Kellner JD, Yu W, Meroueh SO, Nauseef WM, Dinauer MC: A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood* (2009) 114;3309-3315.

Menegazzi R, Busetto S, Dri P, Cramer R, Patriarca P. Chloride ion efflux regulates adherence, spreading, and respiratory burst of neutrophils stimulated by tumor necrosis factor-alpha (TNF) on biologic surfaces. *J Cell Biol.* (1996) Oct;135(2):511-22.

Menegazzi R, Busetto S, Decleva E, Cramer R, Dri P, Patriarca P: Trigger of chloride ion efflux from human neutrophils as a novel function of leukocyte b2 integrins. Relationship with spreading and activation of the respiratory burst. *J Immunol.* (1999); 162:423-434.

Menegazzi R, Busetto S, Dri P, Cramer R, Patriarca P: Role of intracellular chloride in the reversible activation of neutrophils b2 integrins: a lesson from TNF stimulation. *J Immunol.* (2000); 165:4606-4614.

Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM and Root RK: Preparation of cells and materials for functional assays. In Laboratory manual of neutrophil function (2-8). Edited by RAVEN PRESS (1986).

Meyers JB, Cantiello HF, Schwartz JH, Tauber AI: Phorbol ester-stimulated human neutrophil membrane depolarisation is dependent on Ca²⁺-regulated Cl⁻ efflux. *Am. J. Physiol.* (1990); 79(4):1373-1413.

Morel F, Didier F, Berthier S, Dewald B: Purification of gelatinase secreted by human polynuclear neutrophils. *Ann Biol Clin.* (1991) 49: 468-476

Morel F, Dewald B, Berthier S, Zaoui P, Dianoux AC, Vignais PV, Baggiolini M: Further characterization of the gelatinase-containing particles of human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* (1994) 1201: 373-380.

Moosmann K, Bojanovsky A: Rezidivierende Candidiosis bei Myeloperoxydase Mangel. *Monatsschr Kinderheilkd* (1975); 123:408-409.

Morgan D, Capasso M, Musset B, Cherny VV, Ríos E, Dyer MJ, DeCoursey TE : Voltage-gated proton channels maintain pH in human neutrophils during phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2009);106(42):18022-7

Morgenstern E: The formation of compound granules from different types of secretory organelles in human platelets (dense granules and alpha-granules). A cryofixation/-substitution study using serial section. *Eur J Cell Biol.* (1995); 68:183-190

Murphy R, DeCoursey TE: Charge compensation during phagocyte respiratory burst. *Biochim Biophys Acta.* (2006) Aug;1757(8):996-1011

N

Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M: Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflammation Res.* (2000); 49: 73-79.

Nalidini L: Inserting optimism into gene therapy. *Nat Med.* (2006); 12: 386-389.

Nanda A, Curnutte JT, Grinstein S: Activation of H⁺ conductance in neutrophils requires assembly of components in respiratory burst oxidase but not its redox function. *J Clin Invest* (1994); 93:1770-1775.

Nauseek WM, Metcalf JA, Root RK : Role of myeloperoxidase in the respiratory burst of human neutrophils. *Blood* (1983) Mar;61(3):483-92.

Nauseef WM: How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev.* (2007); 219:88-102.

Neijens HJ, Frenkel J, De Muinck Keizer-Schrama SM, Dzoljic-Danilovic G, Meradji M, van Dongen JJ : Invasive *Aspergillus* infection in chronic granulomatous disease: treatment with itraconazole. *J Pediatr* (1989); 115: 1016–9.

Newberger PE, Ezecowitz RA. Cellular and molecular effects of recombinant interferon gamma in chronic granulomatous diseases. *Hematol Oncol Clin North Am* (1988); 2: 267-276.

Newburger PE, Skalnik DG, Jopkins PJ, Eklund EA, Curnutte JT: Mutations in the promoter region of the gene for gp91phox in X-linked chronic granulomatous disease with decreased expression. *J Clin Invest* (1994); 94: 1205-1211.

Nguyen C, and Katner HP: Myeloperoxidase deficiency manifesting as pustular candida dermatitis. *Clin. Infect. Dis.* (1997); 24:258–260.

O

Odeberg H, Olsson I: Antimicrobial cationic proteins of human granulocytes. *J Clin Invest* (1975); 56:1118-1124.

Odeberg H, Olsson I: Microbicidal mechanisms of human granulocytes: synergistic effects of granulocyte elastase and myeloperoxidase or chymotrypsin-like cationic protein. *Infect Immun* (1976); 14:1276-1283.

Odell E, Segal AW: The bactericidal effects of the respiratory burst and the myeloperoxidase system isolated in neutrophil cytoplasts. *BBActa* (1988) 971 ; 266-274.

Ogawa M: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* (1993); 81:2844-2853

Ooi CE, Weiss J, Elsbach P, Frangione B, Mannion B: A 25-kDa NH₂-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability-increasing protein, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 14891–14894.

Oram JD, Reiter B: Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents, *Biochim. Biophys. Acta* 170 (1968) 351–365.

Ott MG, Schmidt M, Schwarzaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U *et al.*: Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med.* (2006); 12: 401-409.

P

Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH: Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci USA* (1988); 85: 3319-3323.

Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, Richar WJ: Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* (1981) 95:293-301.

Pasantes-Morales H and Fellman JH: Taurine and hypotaurine and membrane lipid peroxidation, in: J. Miquel (Ed.), *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, CRC Press, Boca Raton, FL, (1989), pp. 105-119.

Patriarca P, Cramer R, Tedesco F, Kakinuma K : Studies on the mechanism of metabolic stimulation in polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis. II. Presence of the NADPH₂ oxidizing activity in a myeloperoxidase-deficient subject. *Biochim Biophys Acta.* (1975) Apr 7;385(2):387-93.

Pedruzzi E, Fay M, Elbim C, Gaudray M, Gougerot-Pocidal MA: Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by dégranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Brit J Hematol.* (2002) 117: 719-726.

Perez-Cornejo P, Arreola J, Law FY, Schultz JB, Knauf PA: Volume-sensitive chloride channels do not mediate activation-induced chloride efflux in human neutrophils. *J Immunol.* (2004) Jun 1;172(11):6988-93.

Pessach I, Levy R: The NADPH oxidase diaphorase activity in permeabilized human neutrophils and granulocytic like PLB-985 cells. *Adv Exp Med Biol* (2000) 479: 107-114.

Pivot-Pajot C, Varoquaux F, De Saint Basile G, Bourgoin SG : Munc 13-4 regulates granule secretion in Human Neutrophils. *J Immunol.* (2008); 180: 6786-6797.

Pivot-Pajot C, Chouinard FC, El Azreq MA, Harbour D, Bourgoïn SG: Characterisation of degranulation and phagocytic capacity of a human neutrophilic cellular model, PLB-985 cells. *Immunobiology*. (2010);215(1):38-52.

Platt N, da Silva RP, Gordon S: Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Immunol Lett* (1999); 65:15-19.

Poole B, Ohkuma S: Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol* (1981) 90; 665-669.

Porter CD, Kuribayashi F, Parkar MH, Roos D, Kinnon C: Detection of gp91phox precursors protein in B-cell lines from patients with X-linked chronic granulomatous disease as an indicator for mutations impairing cytochrome b558 biosynthesis. *Biochem J* (1996); 315: 571-575.

Q

Quinn MT, Mullen ML, Jesaitis AJ, Linner JG: Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b₅₅₈. *Blood* (1992); 79: 1563-1573.

R

Rada BK, Geiszt M, Kaldi K, Timar C, Ligeti E: Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. *Blood* (2004) 104; 2947-2953.

Rada BK, Geiszt M, Hably C, Ligeti E: Consequences of the electrogenic function of the phagocytic NADPH oxidase. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2005) 360; 2293-2300

Rada B, Hably C, Meczner A, Timar C, Lakatos G, Enyedi P, Ligeti E: Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Semin Immunopathol.*(2008); 30: 237-253.

Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW : Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* (2002); 416(6878):291-7.

Rizo J, Sudhof TC: Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion, *Nat. Rev. Neurosci* (2002); 3: 641–653

Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, Ahlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Middleton-Price H : Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. 1996 Mar 1;87(5):1663-81. Review.

Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Bustamante J, Kannengiesser C, de Boer M, van Leeuwen K, Köker MY, Wolach B, Roesler J, Malech HL, Holland SM, Gallin JI, Stasia MJ : Hematologically important mutations: The autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (second update). *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Feb 16.

Root RK: Correction of the function of chronic granulomatous disease (CGD) granulocytes (PMN) with extracellular H₂O₂. *Clin Res* (1974); 22: 452A.

Rosen H, Klebanoff SJ : Chemiluminescence and superoxide production by myeloperoxidase-deficient leukocytes. *J Clin Invest*. (1976) Jul;58(1):50-60.

Rothman JE: The protein machinery of vesicle budding and fusion. *Protein Sci*. (1996); 5:185-194.

Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH: Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* (1986) Jul 3-9;322(6074):32-8.

S

Salvesen G, Farley D, Shuman J, Przbyla A, Reilly C, Travis J: Molecular cloning of human cathepsin G: structural similarity to mast cell and cytotoxic T lymphocyte proteinases. *Biochemistry* (1987); 26:2289-2293.

Scepek S, Moqbel R, Lindau M: Compound exocytosis and cumulative degranulation by eosinophils and its role in parasite killing. *Parasitology Today*. (1994); 10:276-280.

Schapiro BL, Newburger PE, Klempner MS, Dinaker MC: Chronic granulomatous disease presenting in a 69-year-old man. *N Engl J Med*. (1991); 325: 1786-1790.

Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C: Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* (2000); 80:717-766

Segal AW, Dorling J, Coade S: Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. Biochemical and morphological studies. *J Cell Biol.* (1980); 85:42-59.

Segal AW, Geisow M, Garcia R, Harper A, Miller R: The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* (1981); 290: 406-409.

Segal AW, West I, Wientjes F, Nugent JH, Chavan AJ, Haley B, Garcia RC, Rosen H, Scrase G: Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J.* (1992) Jun 15;284 (Pt 3):781-8.

Segal AW: How neutrophils kill microbes. *Ann Rev Immunol* (2005) 23; 197-223. Seiger RA. Modern management of chronic granulomatous disease. *Br J Hematol* (2008); 140: 255-266.

Segal BH, Leto TL, Gallin JL, Malech HL, Holland SM: Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine* (2000); 79: 170-300.

Seiger RA, Gungor T, Belohradsky BH, Blanche S, Bordigoni P, Dibartolomeo P, et al. Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and unmodified hematopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985–2000. *Blood* 2002;100:4344–50.

Seiger RA: Modern management of chronic granulomatous disease. *Br J Haematol.* (2008) Feb;140(3):255-66.

Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N: Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha and beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest* (1993); 92:1467-1476.

Shafer WM, Onunka VC: Mechanisms of staphylococcal resistance to non-oxidative antimicrobial action of neutrophils: importance of pH and ionic strength in determining the bactericidal action of Cathepsin G. *J Gen Microbiol* (1989); 135:825-830.

Shafer WM, Pohl J, Onunka VC, Bangalore N, Travis J: Human lysosomal cathepsin G and granzyme B share a functionally conserved broad spectrum antibacterial peptide. *J Biol Chem* (1991); 266:112-126.

Shiose A, Kuroda J, Tsunuya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H: A novel superoxide producing NADPH oxidase in kidney. *J Biol Chem* (2001); 276:1417-1423.

Simchowitz L, De Weer P: Chloride movements in human neutrophils. Diffusion, exchange, and active transport. *J Gen Physiol.* (1986); 88: 167-194.

Simons MP, Leidal KG, Nauseef WM, Griffith TS: TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is expressed throughout myeloid development, resulting in a broad distribution among neutrophil granules. *J Leukoc Biol* (2008); 83: 621-629.

Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N: Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3, *Blood* 97 (2001) 3951–3959.

Stasia MJ, Lardy B, Maturana A, Rousseau P, Martel C, Bordigoni P, Demaurex N, Morel F: Molecular and functional characterization of a new X-linked chronic granulomatous disease variant (X91+) case with a double missense mutation in the cytosolic gp91phox C-terminal tail. *Biochim Biophys Acta* (2002); 1586: 316-330.

Stasia MJ, Bordigoni P, Floret D, Brion JP, Post-Bru C, Michel G, Gatel P, Durant-Vital D, Voelckel MA, Li XJ, Guillot M, Maquet E, Martel C, Morel F: Characterization of six novel mutations in the CYBB gene leading to different sub-types of X-linked chronic granulomatous disease. *Human Genet* (2005); 116:72-82.

Stasia MJ: The X+ chronic granulomatous disease as a fabulous model to study the NADPH oxidase complex activation. *Med Sci Paris* (2007) ; 23:526–532

Stasia MJ, Cathebras P, Lutz M-F, Durieu I: La granulomatose septique chronique – Chronic granulomatous disease..*La revue de médecine interne* (2009);30 :221-232.

Strøbaek D, Christophersen P, Holm NR, Moldt P, Ahring PK, Johansen TE, Olesen SP. Modulation of the Ca²⁺-dependent K⁺ channel, hsk1, by the substituted diphenylurea NS 1608, paxilline and internal Ca²⁺. *Neuropharmacology.* (1996); 35(7):903-14.

Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* (1999); 401:79-82.

Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, Fukumaki Y, Nakamura M, Takeshige K: Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src

homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. *J Biol Chem.* (1996) Sep 6;271(36):22152-8.

Sumimoto H, Miyano K: Takeya R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* (2005); 338:677-686.

T

Taylor RM, Baniulis D, Burritt JB, Gripenotrog JM, Lord CI, Riesselman MH, Maaty WS, Bothner BP, Angel TE, Dratz EA, Linton GF, Malech HL, Jesaitis AJ: Analysis of human phagocyte flavocytochrome b(558) by mass spectrometry. *J Biol Chem.* (2006); 281: 37045-37056.

Troc   C, Gaudin P, Berthier S, Barro C, Zaoui P, Morel F: Human B lymphocytes synthesize the 92-kDa gelatinase, matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem.* (1998); 32:20677-20684.

Tschesche H and Pieper M, In *Handbook of proteolytic enzymes*, Barrett AJ *et al.* eds., Academic Press, San Diego. (1998) pagg. 1162-1167.

Tsunawaki S, Kagara S, Yoshikawa K, Yoshida LS, Kuratsuji T, Namiki H: Involvement of p40phox in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not its amino-terminal, with p67phox. *J Exp Med.* (1996); 184: 893-902.

Tucker KA, Lilly MB, Heck L, Rado TA: Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* (1987); 2: 372-378.

Turton K, Chaddock JA, Acharya KR: Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci.* (2002); 27:552-558.

V

van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, Español T, Fischer A, Kurenko-Deptuch M, Mouy R, Petropoulou T, Roesler J, Seger R, Stasia MJ, Valerius NH, Weening RS, Wolach B, Roos D, Kuijpers TW. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One.* 2009;4(4):e5234.

Van Bruggen R, Anthony E, Fernandez-Borja M, Roos D: Continuous translocation of Rac2 and the NADPH oxidase component p67(phox) during phagocytosis. *J Biol Chem.* (2004); 279:9097-9102.

Varnai P, Demaurex N, Jaconi M, Schlegel W, Lew DP, Krause KH: Highly co-operative Ca^{2+} -activation of intermediate conductance K^+ channels in granulocytes from a human cell line. (1993) *J Physiol* 472:373-390.

Villarroel A, Alvarez O, Oberhauser A, Latorre R: Probing a Ca^{2+} -activated K^+ channel with quaternary ammonium ions. *Pflügers Arch* (1988) ; 413:118–126.

Volpp BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA: Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989); 86: 7195-7199.

W

Weening RS, Leitz GJ, Seger RA: Recombinant human interferon-gamma in patients with chronic granulomatous disease-European follow up study. *Eur J Pediatr* (1995); 154(4): 295-298.

Weening RS, de Boer M, Kuijpers TW, Neefjes ME, Hack M, Ross D: Point mutation in the promoter region of the CYBB gene leading to mild chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol.* (2000); 122: 410-417.

Weiss J, Olsson I: Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability increasing protein of neutrophils. *Blood* (1987); 69:652-659.

Williams DA, Tao W, Yang F, Kim C, Gu Y, Mansfield P, Levine JE, Petryniak B, Derrow CW, Harris C, Jia B, Zheng Y, Ambruso DR, Lowe JB, Atkinson SJ, Dinauer MC, Boxer L: Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood* (2000) ; 96:1646–1654

Wimley WC, Selsted ME, White SH: Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci* (1994); 3:1362-1373.

Woodman RC, Newburger PE, Anklesaria P *et al.*: A new X-linked variant of chronic granulomatous disease characterized by the existence of a normal clone of respiratory burst-competent phagocytic cells. *Blood* (1995); 85: 231-241.

Y

Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison RT : Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment, *Infect. Immun.* 61 (1993) 719–728.

Yang D, Suzuki S, Hao LJ, Fujii Y, Yamauchi A, Yamamoto M, Nakamura M, Kumatori AL: Eosinophil-specific regulation of gp91phox gene expression by transcription factors GATA-1 and GATA-2. *J Biol Chem* (2000) 275; 9425-9429.

Yang D, Chen Q, Schmidt QP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O: LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptorlike 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells, *J. Exp. Med.* (2000); 192 1069–1074.

Yu L, Zhen L, Dinauer MC: Biosynthesis of the phagocyt NADPH oxidase cytochrome b558. *J Biol Chem* (1997); 272: 27288-27294:

Yu L, Zhen L, Dinauer MC: Biosynthesis of the phagocytes NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits. *J Biol Chem.* (1999); 274:4364-4369.

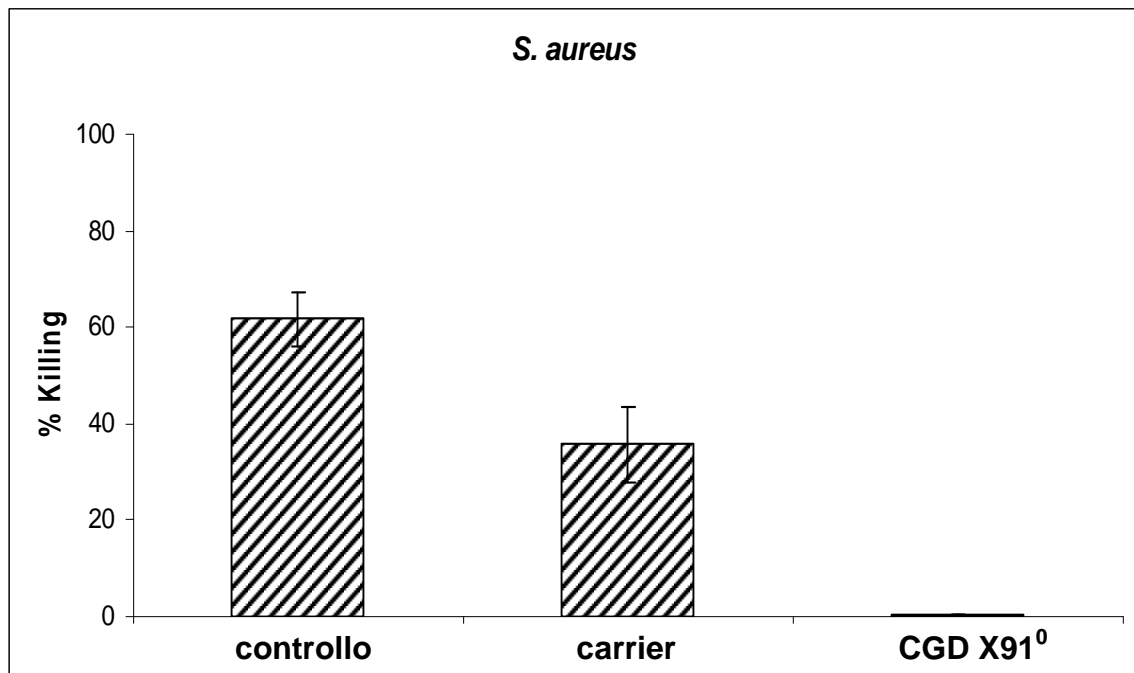
Yu L, Cross AR, Zhen L, Dinauer MC: Functional analysis of NADPHoxidase in granulocytic cells expressing a delta488-497 gp91phox deletion mutation. *Blood* (1999); 94: 2497-2504.

Z

Zhen L King AA, Xiao Y, Chanock SJ, Orkin SH, Dinauer MC : Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1993); 90(21):9832-6.

Zhen L, Yu L, Dinauer MC: Probing the role of the carboxyl terminus of the gp91phox subunit of neutrophil flavocytochrome b558 using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* (1998); 273: 6575-6581.

Allegato: Attività staffilocida di neutrofili di madri portatrici della CGD di tipo X91⁰.



I neutrofili di controllo, di madri portatrici della CGD X91⁰ (carrier) e di pazienti CGD X91⁰ sono incubati con *S.aureus* ad un rapporto batteri:cellule di 5:1, secondo le modalità descritte in Mat. e met., § 3.F. I risultati, espressi come percentuale di killing dopo 45 min di incubazione sono la media \pm DS di 4 esperimenti.

PUBBLICAZIONI

- **Defendi F**, Decleva E, Martel C, Dri P, Stasia MJ : “*A novel point mutation in the CYBB gene promoter leading to a rare X minus chronic granulomatous disease variant – Impact on the microbicidal activity*”. (BBActa, 2009; 1792: 201-210) (Allegato I).
- Carrichon L, **Defendi F**, Picciocchi A, Debeurme F, Jesaitis AJ, Dagher MC, Stasia MJ. : “*Characterization of superoxide overproduction by the D-Loop^{Nox4}-Nox2 cytochrome b₅₅₈ in PLB-985 - Consequences for microbial killing*”. (2010, BBActa, in revisione).
- **Defendi F**, Decleva E, Fasolo A, Menegazzi R, Dri P. : “*Evidence that voltage-gated proton channels do not play an essential role in the respiratory burst and antimicrobial activity of neutrophils*”. (2010, J Leukoc Biol., in revisione).
- **Defendi F**, Decleva E, Menegazzi R, Dri P.: *Essential role of myeloperoxidase in the microbicidal activity of neutrophils*. (in preparazione).

COMUNICAZIONI A CONGRESSI

- Decleva E., **Defendi F.**, Fasolo A., Sebastianutto M., Menegazzi R., Dri P.: “*Voltage-gated proton channels are not essential for the respiratory burst and antimicrobial activity of human neutrophils*”. 44nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Bari, Italia, Marzo 2010.
- Debeurme F., Picciocchi A., Grunwald D., Carrichon L., Beaumel S., **Defendi F.**, Stasia M.J. «*La malattia granulomatosa cronica CGD X⁺ : modello di studio del complesso NADPH ossidasi*”. Club Oxydase 2009, Maggio 2009, Parigi, Francia.
- Debeurme F., Picciocchi A., Carrichon L., Beaumel S., **Defendi F.**, Dagher M.C., Stasia M.J.« *La malattia granulomatosa cronica CGD X⁺ : modello di studio del complesso NADPH ossidasi 2009*”. Giornata della Ricerca Medica 2009, Aprile 2009, Grenoble, Francia.
- Decleva E., **Defendi F.**, Fasolo A., Menegazzi R., Dri P.: “*Do voltage-gated proton channels play a role in the microbicidal activity of neutrophils?*”. XXIX Congresso nazionale della società italiana di patologia, Cosenza (Italia) Settembre 2008.
- **Defendi F.**, Decleva E., Martel C., Dri P., Stasia M.J.: “*A novel point mutation in the CYBB gene promoter leading to a rare X minus chronic granulomatous disease variant – Impact on the microbicidal activity*”. 42nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical

Investigation » Marzo 2008, Ginevra, Svizzera Europ. J. Clin. Invest. 2008, vol 38, suppl. I pag 73) Poster selezionato per l'ESCI Poster Award.

- Carrichon L., **Defendi F.**, Beaumel S., Stasia M.J. “*Study of molecular mechanisms of the superoxide anions over-production by the D-loop_{Nox+Nox2} mutant PLB-985 cells*”. Club Oxydase 2007, Maggio 2007, Grenoble, Francia.
- Carrichon L., **Defendi F.**, Beaumel S., Stasia M.J. “*Funzionamento del complesso enzimatico NADPH ossidasi dei fagociti: ruolo del loop D della subunità Nox2*”. Giornata della Ricerca Medica 2007, Aprile 2007. Grenoble, Francia
- P. Dri, E. Decleva, **F. Defendi**, R. Menegazzi, S. Busetto. “*To kill or not to kill: is the myeloperoxidase the answer?*”. 5th International Conference on Human Peroxidase; Febbraio 2007, Akaroa, Canterbury, New Zeland.
- E. Decleva, **F. Defendi**, R. Menegazzi, S. Busetto, P. Patriarca and P. Dri. «*Essential role of myeloperoxidase in the microbicidal activity of neutrophils*». 40nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation ; Marzo 2006, Prague, République Tchèque : (Europ. J. Clin. Invest. 2006, vol. 36, suppl. I pag. 41).