

## Chapitre 2

### Article 2 – Rôle crucial de deux régions cytosoliques potentielles de Nox2 – <sup>191</sup>TSSTKTIRRS<sup>200</sup> et <sup>484</sup>DESQANHFVHHDEEKD<sup>500</sup> – sur l'activation du complexe oxydase

#### *Objectifs et méthodologie*

Il s'agit de l'étude du rôle de 2 régions cytosoliques de Nox2 sur le mécanisme d'activation du complexe oxydase. Le modèle structural de Nox2 (gp91<sup>phox</sup>) proposé actuellement est composé d'une partie N-terminale membranaire comportant des boucles intra et extra cytosoliques et une queue C-terminale comportant les sites de fixation potentiels du FAD et de la NADPH (Introduction – Figure 7). D'après certains travaux de la littérature, 4 régions de Nox2 (acides aminés 86-93, 450-457, 491-504, et 559-565) ont été proposées comme interagissant avec les facteurs cytosoliques p67<sup>phox</sup> et/ou p47<sup>phox</sup> (Leusen et al. 1994 ; DeLeo et al. 1995 ; Park et al. 1997). Des résultats contradictoires ont été publiés pour cette région C-terminale qui formerait une boucle en hélice alpha, d'après les résultats d'un modèle proposé par Taylor et Segal (Taylor et al. 1993). Cette région recouvrirait le site de fixation du NADPH oxydase quand l'enzyme est au repos et découvrirait ce site lors de l'activation de l'enzyme, pouvant se lier aux facteurs cytosoliques. Nous avons voulu étudier 2 régions intra cytosoliques de Nox2, une région encore jamais étudiée, la boucle D et la région C-terminale formant une hélice alpha dont le rôle est controversé.

Les analogues de gp91<sup>phox</sup> ou Nox2 découverts récemment dans les cellules non phagocytaires telles que les cellules fibroblastiques, les cellules épithéliales et les chondrocytes, possèdent une activité NADPH oxydase très faible, 100 à 1000 fois moins importantes que celle de Nox2 des phagocytes. Cette faible activité oxydase associée reste incomprise alors que pour certaines de ces Nox, l'homologie de séquence avec Nox 2 est élevée (50 à 60%) (Cheng et al. 2001). Des analogues des facteurs cytosoliques p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> ont été également découverts dans certaines cellules non phagocytaires comme les cellules épithéliales de colon Caco2 (Geiszt et al. 2003; Takeya et al. 2003). Mais rien à ce jour, n'est connu sur le type d'activation de ces nouvelles Nox et sur le type d'interaction avec les analogues des facteurs cytosoliques de p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup>. Il nous a paru intéressant de produire des protéines chimères de Nox2 contenant la boucle D des Nox1, 3 et 4, pour explorer le rôle de cette région cytosolique dans leur activation.

D'après les résultats de l'alignement des séquences des protéines de la famille des Nox et Duox, nous remarquons que les 2 régions étudiées sont chargées (Fig. 1). La boucle D est polybasique et la partie C-terminale est plutôt riche en acides aminés acides. Dans la boucle D, la Lys<sup>195</sup> est conservée dans les Nox2 de nombreuses espèces, mais varie dans la famille Nox humaine. L'Arg<sup>198</sup> est présente dans tous les membres de cette famille et l'Arg<sup>199</sup> est également conservée sauf dans Nox3 et 4. Dans la partie C-terminale de Nox 2 on remarque que les acides

Asp<sup>484</sup> et Asp<sup>500</sup> sont aussi très conservés.

Par mutagenèse dirigée et transfection stable dans les cellules PLB-985 KO pour le gène *CYBB* codant Nox2, nous avons réalisé des mutants de Nox2 dans ces 2 régions soit en annulant la charge de l'acide aminé chargé soit en la réversant soit en changeant plusieurs acides aminés (cas de la boucle D de Nox1, 3, 4) (Fig. 2) (même approche méthodologique que dans l'article 1). L'approche méthodologique est la même que celle exposée dans l'article 1. Cependant, les expériences de microscopie confocale ont été réalisées en collaboration avec D. Grunwald (cis, CEA-Grenoble).

## Résultats

Douze mutants ont été produits pour la boucle D et 7 pour la région C-terminale. Nous avons également réalisé 2 mutants connus pour inhiber l'assemblage du complexe oxydase et l'activité oxydase, un dans la première boucle intra cytosolique B étudiée par l'équipe de Mary Dinauer (Biberstine-Kinkade et al. 1999) et l'autre reproduisant un cas de CGD X<sup>+</sup> décrit par l'équipe de Dirk Roos (Leusen et al. 1994).

L'expression de Nox2 sauvage ou mutée dans les cellules PLB-985 après transfection et sélection des clones positifs, a été suivie par 3 méthodes : cytométrie en flux grâce à l'anticorps 7D5, immuno détection, et spectre différentiel du cytochrome *b*<sub>558</sub>. Dans certains cas les clones (K195E et RR198199QQ) ont été triés afin d'obtenir une population exprimant Nox2 mutée de façon homogène (Fig. 3). Finalement nous avons obtenu 21 mutants ayant une expression équivalente de Nox2. Ceci est crucial pour étudier l'impact des différentes mutations sur l'activité NADPH oxydase.

L'impact des mutations de Nox2 sur l'activité NADPH oxydase a été évaluée par mesure de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules PLB-985 transfectées à J6 de différenciation et activées par le PMA ou par le fMLP (Table 1, Fig. 4A).

- Les acides aminés chargés positivement de la boucle D sont essentiels au maintien d'une activité NADPH oxydase, surtout l'Arg<sup>195</sup>. En effet une abolition ou une réversion de sa charge, entraîne une inhibition totale de l'activité oxydase. De même nous remarquons que les acides aminés chargés négativement de la région C-terminale étudiée ont également un rôle essentiel dans le maintien d'une activité oxydase surtout l'Asp<sup>484</sup> et l'Asp<sup>500</sup>.
- Les protéines Nox2 chimères contenant les boucles D des Nox1, 3 et 4 sont totalement fonctionnelles. Une sur-activation de l'activité oxydase par rapport aux cellules WT est observée dans 2 mutants de la boucle D, le mutant R199Q et le mutant de la boucle D de Nox4. La production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après activation par PMA est plus rapide et ressemble plus à un « burst » par rapport aux cellules PLB WT ou KO transfectées par Nox2 WT (Fig. 4B). Par contre après activation par le fMLP, les cinétiques sont équivalentes bien que le « burst » soit plus élevé dans le « super-mutant ». Nous avons les mêmes cinétiques pour l'autre super-mutant R199Q (résultats non montrés).

Les effets des mutations sur l'activité NADPH oxydase reconstituée *in vitro* à partir de membranes purifiées sont les mêmes que sur l'activité oxydase mesurées dans les cellules intactes (Table 1). Cependant, nous n'avons pas obtenu une « super activité » oxydase *in vitro* avec les membranes des mutants de la boucle D de Nox4 et le mutant R199Q. Ceci est une preuve que le mécanisme d'activation de l'oxydase *in vitro* n'est pas totalement identique à ce qui se passe *in vivo* (différence dans la phosphorylation des protéines).

L'étude de l'impact des mutations qui inhibent l'activité oxydase, sur l'assemblage du complexe oxydase a été réalisée par microscopie confocale en séquentiel (Fig. 5).

- Dans les cellules PLB WT, à J6 de différenciation et activées par des billes de latex enrobées de PMA, il existe une co-localisation de Nox2 et de p47<sup>phox</sup> au niveau de la membrane du phagosome, démontrant qu'il y a donc bien eu translocation de p47<sup>phox</sup>. La déformation du noyau nous permet de nous assurer que les billes sont bien à l'intérieur de la cellule. Dans le cas de la mutation D500G de la CGD X<sup>+</sup>, nous avons observé un défaut de translocation de p47<sup>phox</sup> avec la présence de Nox2. Ceci avait été décrit par des méthodes plus classiques dans les neutrophiles de patient (Leusen et al. 1994), validant notre méthode d'étude de l'assemblage du complexe oxydase *in vivo*.
- La translocation se fait correctement pour les mutants de la boucle D (Fig. 6A). Par contre pour les mutants de la partie C-terminale de Nox2 (Fig. 6B), il n'y a pas de translocation de p47<sup>phox</sup> vers la membrane du phagosome, comme observé dans le mutant RR9192EE de la boucle B décrit par l'équipe de M Dinauer et qui possède effectivement un défaut d'assemblage du complexe oxydase (Zhen et al. 1999).

Les résultats de translocation *in vivo* observés par microscopie confocale ont été confirmés par ceux obtenus *in vitro* (Fig. 7). Il existe une translocation de p47<sup>phox</sup> dans les membranes des mutants de la boucle D alors que dans les mutants de la partie C-terminale il n'y a pas de translocation.

L'activité diaphorase des membranes des mutants de la boucle D (mesure du transfert électronique de la NADPH vers le FAD) est comparable à celles des cellules WT alors que cette activité est abolie dans les mutants de la partie C-terminale de Nox2 (Fig. 8).

### Conclusions générales :

1. Importance des charges positives de la boucle D (Lys<sup>195</sup>, Arg<sup>198</sup>, Arg<sup>199</sup>) et des charges négatives de la région cytosolique C-terminale (Asp<sup>484</sup>, His<sup>490</sup>, Asp<sup>500</sup>) dans le maintien de l'activité NADPH oxydase des phagocytes.
2. Rôle essentiel de la région C-terminale Asp<sup>484</sup>-Asp<sup>500</sup> dans le processus d'assemblage du complexe oxydase et dans le transfert électronique du NADPH vers le FAD.
3. Pas d'implication de la boucle D dans l'assemblage du complexe oxydase, ni dans le transfert électronique du NADPH vers le FAD. Rôle dans le transfert électronique du FAD vers les hèmes ? Rôle dans le maintien de la structure active du cytochrome *b*<sub>558</sub>?
4. La boucle D des Nox1, 3, 4 est capable de jouer un rôle dans l'activation du complexe oxydase.
5. La boucle D de Nox4 et la mutation R199Q semble potentialiser l'activité NADPH oxydase, plus particulièrement après activation par le fMLP (×4-8). Par quel mécanisme ?

## Chapter 2

### Crucial role of two potential cytosolic regions of Nox2 – <sup>191</sup>TSSTKTIRRS<sup>200</sup> and <sup>484</sup>DESQANHFVHHDEEKD<sup>500</sup> – on NADPH oxidase activation

#### Background

The phagocytes NADPH oxidase is a multi-component enzyme that catalyzes the electron transfer from NADPH to molecular oxygen to generate superoxide, a precursor of toxic oxidants that are essential for host defense against microorganisms (Roos et al. 1996a). In resting cells, the components of the oxidase are segregated into cytosolic and membrane compartments. During activation of the respiratory burst, the oxidase cytosolic components translocate to the plasma membrane where the cytochrome *b*<sub>558</sub> functions structurally to coordinate the interactions with its cytosolic partners, resulting in the active, superoxide-generating system (Vignais 2002). The key membrane-associated component of the oxidase is a heterodimer cytochrome *b*<sub>558</sub>, composed of gp91<sup>phox</sup> (Nox2) and p22<sup>phox</sup>. Docking of p47<sup>phox</sup>-p67<sup>phox</sup>-p40<sup>phox</sup> complex to cytochrome *b*<sub>558</sub> is supported by an interaction between the tandem SH3 domains of p47<sup>phox</sup> (figure 12–Introduction) and the proline-rich-region in the C-terminal of p22<sup>phox</sup> (figure 3–Introduction) (Leto et al. 1994; Sumimoto et al. 1994; Sumimoto et al. 1996). Interactions between the PX domain of p47<sup>phox</sup> and membrane-associated phosphoinositides maybe facilitate this translocation (Kanai et al. 2001). Once at the membrane, additional contacts between cytochrome *b*<sub>558</sub> take place, which are believed to either help position p67<sup>phox</sup> correctly or possibly induce a favorable conformational change within cytochrome *b*<sub>558</sub> (Groemping et al. 2005). These interactions have been mapped to the cytosolic regions of gp91<sup>phox</sup>.

Gp91<sup>phox</sup> has been believed to contain all the redox components and is responsible for the direct electron transfer from NADPH via FAD to oxygen (Segal et al. 1992; Rotrosen et al. 1992; Cross et al. 1995; Yu et al. 1998). Gp91<sup>phox</sup> contains a hydrophobic N-terminal domain, composed by 6-transmembrane  $\alpha$ -helices (residues 1-288), which is important for its membrane-anchoring and for interacting with p22<sup>phox</sup>, and a hydrophilic C-terminal region, containing the binding sites for FAD, NADPH and cytosolic components of oxidase. Several cytosolic regions of Nox2 have been identified to be potential binding regions of cytosolic factors or to be indirectly implicated on the oxidase assembly process (figure 3-Introduction - 4.1.2 *Interaction between cytosolic factors and cytochrome b*<sub>558</sub>).

The aim of this work was to investigate the role of two regions of Nox2, the second intracytosolic D loop <sup>191</sup>TSSTKTIRRS<sup>200</sup> and the C-terminal  $\alpha$ -helical loop <sup>484</sup>DESQANHFVHHDEEKD<sup>500</sup>, on oxidase activity and assembly by means of the mutagenesis approach in the X-CGD PLB-985 cell model. The role of the D loop of gp91<sup>phox</sup> (<sup>191</sup>TSSTKTIRRS<sup>200</sup>) located near the haem-binding trans-membrane domain, has never been studied. Taylor *et al.* had predicted a three-dimensional structure of Nox2 using ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase as template and proposed that an  $\alpha$ -helical loop <sup>484</sup>DESQANHFVHHDEEKDVITG<sup>504</sup> covers the cleft in which NADPH binds (Taylor et al. 1993). During

oxidase activation, access of NADPH into the binding site could potentially be regulated by interaction of this loop with cytosolic oxidase factors. However, there were conflicting results for the role of this potential  $\alpha$ -helical loop (Introduction. 6. Cellular models – PLB-985).

The homologous sequence analysis (Fig. 1) of this second intracellular loop of gp91<sup>phox</sup> (D-loop) (Vignais 2002) in the FNR (ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductase) family showed that the D-loop is polybasic, containing Lys<sup>195</sup>, Arg<sup>198</sup> and Arg<sup>199</sup>, which are conserved in the FNR family, suggesting a similar function in this family. The sequence alignment (Fig. 1) of the C-terminal region (residues <sup>484</sup>DESQANHFAVHHDEEKD<sup>500</sup>) of gp91<sup>phox</sup> in the FNR family indicates that this loop contains many charged amino acid residues which are conserved in FNR family, especially Asp<sup>484</sup>, His<sup>490</sup>, Asp<sup>496</sup>, and Asp<sup>500</sup>. We postulated that the conserved, charged amino acid residues within these two gp91<sup>phox</sup> domains might be important for the functional conformation of gp91<sup>phox</sup> and/or for further binding with the oxidase cytosolic components. Recently, large homologues of gp91<sup>phox</sup>, called Nox and Duox, have been identified in various tissues of nonphagocytic cells. Nox proteins have many common structural features as Nox2 (gp91<sup>phox</sup>), including six conserved transmembrane helices in the N-terminal and C-terminal cytoplasmic region containing conserved FAD- and NADPH-binding motifs (Figure 10-Introduction-3.6 Homologues of Nox2). They could generate low amounts of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, suggested to be involved in cell signaling, host defense, hypoxia response, and also as proton transport (Lambeth 2002). A recent study indicates that p51 and p41 (homolog of p67<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup>, respectively) regulate Nox1 to generate O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Banfi et al. 2003; Geiszt et al. 2003; Takeya et al; 2003; Cheng et al. 2004). This suggests that Nox proteins need some cytosolic components to be activated or regulated. Meanwhile, the molecular mechanism of the regulation of Nox2 homologues has not been fully elucidated. To further explore the role of the D-loop in the Nox family, this loop of gp91<sup>phox</sup> was replaced by the same region of its homologues, Nox1, Nox3, and Nox4.

### **General methodology to obtain the mutant gp91<sup>phox</sup> PLB-985 cells and to study the impact of each mutation on NADPH oxidase activity and complex assembly**

**gp91<sup>phox</sup> mutants PLB-985 cells obtention:** Charged amino acids within the two studied intracytosolic regions of Nox2, the D loop and the C terminal  $\alpha$ -helical loop, were replaced by neutral or reverse-charged amino acids by site-directed mutagenesis to alter the local electrostatic charge (Fig. 2). After stable transfection in X-CGD PLB-985 cells, 21 mutants were selected (Bionda et al. 2004): 12 of the D loop, 7 of the C terminal  $\alpha$ -helical loop and 2 gp91<sup>phox</sup> mutants (D500G and RR9192EE), known to perturb cytosolic factors translocation to the plasma membranes (Leusen et al. 1994; Biberstine-Kinkade et al. 1999) to validate the oxidase activity and assembly experiments.

Gp91<sup>phox</sup> expression was assessed by three different methods as previously described (Bionda et al. 2004): flux cytometry (FACS), immunodetection and reduced-minus-oxidized difference spectra of cytochrome *b*<sub>558</sub>. For some mutants, FACS was also used to sort a highly gp91<sup>phox</sup> expressing population. 12–20 different clones for each mutant were selected and to minimize clone-to-clone variation in NADPH oxidase activity, three to four independent clones of each highly expressing gp91<sup>phox</sup> mutant were used for subsequent analysis.

- *The amount of cytochrome *b*<sub>558</sub> was equivalent in all transfected X-CGD PLB-985 cells*

(Table I), demonstrating a correct haem incorporation in recombinant Nox2. High, stable, and similar amounts of recombinant WT or mutant Nox2 proteins were expressed in transfected X-CGD PLB-985 cells. Similar Nox2 expression was observed in all mutants compared to WT Nox2 transfected PLB cells or WT PLB-985 cells (Fig. 3). This was crucial for comparing the impact of each mutation on NADPH oxidase functions in transfected cells.

**NADPH oxidase activity measurement:** NADPH oxidase activity in intact cells and reconstituted in a CFS assay were measured by chemiluminescence using luminol and by SOD sensitive cytochrome *c* reduction respectively, as previously described (Bionda et al. 2004). **Iodonitrotetrazolium (INT) reductase activity** was measured in a CFS assay as the NADPH oxidase activity except that cytochrome *c* was replaced by INT. Oxidase activity in intact cells and purification of plasma membranes from transfected cells were performed after granulocytic differentiation for 6 days with DMF 0.5% to induce the expression of endogenous p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup>.

- After PMA or fMLP stimulation, WT Nox2 transfected cells has a comparable H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production as the original WT PLB-985 cells (Table 1, Fig. 4A). To compare only the effect of mutations on Nox2 of the plasma membranes purified from transfected PLB-985 cells, cytosol from human neutrophils was used as the source of NADPH oxidase cytosolic components.
- The *in vitro* oxidase activity was totally restored in WT Nox2 cDNA transfected PLB-985 as compared to WT PLB-985 cells (Table I).
- The diaphorase activity showed that membranes from WT Nox2 transfected cells supported INT reductase activity to the same extent as was assessed in original WT PLB-985 cells (Fig. 8), whereas this activity was null in the empty vector transfected X-CGD PLB-985 cells.

**NADPH oxidase assembly study:** Confocal microscopy approach was used to investigate the effect of mutations on oxidase complex assembly *in vivo*. This method allowed us to follow p47<sup>phox</sup> translocation to the phagosomal membranes of intact cells after stimulation by PMA treated latex beads. In some experiments Nox2 localization was visualized by 7D5 recognition (monoclonal antibody which recognizes an external epitope of Nox2, generous gift of Dr. Nakamura). The deformation of the TO-PRO 3 iodine-labeled nuclei demonstrated that these latex beads were indeed in the cells (Fig. 5, Fig. 6). For each translocation experiment, NADPH oxidase activity was controlled at the same day.

- The phagocytosis of latex beads occurred in all the studied cells, independently of the oxidase activity. P47<sup>phox</sup> protein was present in cytosol from all the tested PLB-985 cells. A red and a green fluorescence representing Nox2 and p47<sup>phox</sup>, respectively, were surrounding phagosomal membranes around the latex beads only in intact WT PLB-985 cells (Fig. 5). A yellow merged image indicated the co-localization of p47<sup>phox</sup> and Nox2 in phagosomal membranes. In empty vector-transfected cells, p47<sup>phox</sup> was uniformly distributed in the cytosol while no Nox2 expression was visible (Fig. 5).

**In vitro** cytosolic factors translocation to the plasma membranes purified from the mutant PLB-985 cells was classically performed (Bionda et al. 2004). The oxidase activation was

measured after SDS and GTP $\gamma$ S addition in presence of human neutrophils' cytosol. "Re-purified" membranes were obtained after discontinuous sucrose gradient centrifugation. P47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> were detected after Western blot analysis of the "re-purified" membranes.

- *Results obtained by confocal analysis of the p47<sup>phox</sup> translocation to the phagosomal membranes of transfected PLB-985 cells were always confirmed by the classical in vitro translocation method (Fig. 7) (Bionda et al. 2004).*

### Validity of the approach

The RR9192EE Nox2 mutation of Nox2, known to inhibit oxidase activity and cytosolic factors translocation (Biberstine-Kinkade et al. 1999) had a definitive inhibitory effect on NADPH oxidase activity and disturbed the membrane-translocation of p47<sup>phox</sup> *in vivo* and *in vitro* (Table I, Fig. 4A, Fig. 6B, Fig. 7).

PLB-985 cells expressing D500G Nox2 mutant exhibited no oxidase activity which was associated with a defective translocation of p47<sup>phox</sup> *in vivo* and *in vitro* (Table I, Fig. 4A, Fig. 5, Fig. 7). These results demonstrated that D500G gp91<sup>phox</sup> transfected PLB-985 cells mimicked the neutrophils' phenotype of a previously described X<sup>+</sup> CGD case (Leusen et al. 1994).

These data allowed us to validate our methodology.

### Role of the D loop region of Nox2 and of Nox1, Nox3 and Nox4

The oxidase activity was completely abolished in transfected cells expressing **K195A/E**, **R198E**, **R199E**, and **RR198199QQ/AA** mutations of the D loop of Nox2. (Table I). Results obtained in CFS assay, were correlated with those obtained in intact cells, although residual oxidase activity (about 20% of the original WT PLB-985 cells) was observed in some mutants that had no oxidase activity *in vivo*. While in these mutant PLB-985 cells where oxidase activity was totally inhibited, *in vitro* and *in vivo* p47<sup>phox</sup> membrane translocation occurred normally (Fig. 6A, Fig. 7A). In addition INT reductase activity of these mutants was comparable to those of the original WT PLB-985 cells (Fig. 8) suggesting that **K195A/E**, **R198E**, **R199E**, and **RR198199QQ/AA** mutations had no effect on electron transfer from NADPH to FAD.

- *The charged amino acids in the D loop (Lys<sup>195</sup>, Arg<sup>198</sup>, and Arg<sup>199</sup>) of Nox2 are essential to maintain the NADPH oxidase activity in phagocytic cells.*
- *The D-loop is not involved in the oxidase assembly nor in the electron transfer from NADPH to FAD.*
- *Because of its localization nearby the haem-binding trans-membrane domain of Nox2, this loop is possibly involved in the control of electron transfer from FAD to the molecular oxygen through the haem.*

Surprisingly, **R199Q** and **D-loop<sub>Nox1/3/4</sub> Nox2** mutant PLB-985 cells stimulated with PMA had 1.3- to 1.6-fold increase in total H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production compared to the WT PLB-985 cells (Table I, Fig. 4A). The increasing effect was more evident using fMLP stimulation. Indeed in the R199Q and the D-loop<sub>Nox4</sub> mutant cells, total H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in 60 min was about 8 and 5 times higher than that in the WT PLB-985 cells, respectively (Fig. 4A). However, the kinetics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was not the same when WT or transfected PLB-985 cells were activated by PMA or fMLP (Fig. 4B). For the D-loop<sub>Nox4</sub>-Nox2 "super-mutant", the maximum of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (V<sub>max</sub>) was obtained in 4–5 min (T<sub>max</sub>) versus 10–13 min in WT or WT Nox2

transfected PLB-985 cells for PMA activation. Whereas for fMLP activation, the kinetics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production remained unchanged (T<sub>max</sub>≈3-4 min), except that the V<sub>max</sub> of D-loop<sub>Nox4</sub>-Nox2 mutant was about 5 times higher than that in the WT Nox2 transfected cells (Table 2). However, the highly increased NADPH oxidase activity measured in intact R199Q and in the D-loop<sub>Nox4</sub>-Nox2 mutant cells activated with fMLP was not reconstituted *in vitro*.

- *The high production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the D-loop<sub>Nox4</sub> and the R199Q-Nox2 mutant PLB-985 cells activated by PMA or fMLP may be due to a conformational change of the mutated Nox2 in the assembly of the NADPH oxidase complex, promoting a more efficient electron transfer to reduce molecular oxygen.*
- *Furthermore, the D loop of Nox2 homologues is functional for the oxidase activity, suggesting that this domain is indispensable to maintain a correct conformational structure of Nox proteins.*

### **Role of the C-terminal $\alpha$ -helical loop of Nox2**

In the C-terminal of Nox2, changing Asp<sup>484</sup> to a neutral amino acid (D484T) inhibited the NADPH oxidase activity, while replacing it with a positive charge (D484H) had little effect (79% of control). The H490D mutation destroyed most of the NADPH oxidase activity (10% of control) (Table I). While, cells expressing H490A- and D496H-Nox2 exhibited normal oxidase activity. These results suggested that the effect of Asp<sup>484</sup> and His<sup>490</sup> charge changes had different effects on oxidase activity depending on the type of amino acid replacement. Meanwhile, the disappearance of the negative charge supported by Asp<sup>500</sup> in the D500A/R/G mutations had a definitive inhibitory effect on NADPH oxidase activity (Table I). The oxidase activity reconstituted in the CFS assay was correlated to those obtained *in vivo*. In addition D484T and D500G/A/R mutations in the  $\alpha$ -helical loop of the C-terminal of Nox2 resulted in the inhibition of INT reductase activity (Fig. 8).

Interestingly the inhibitory effect of mutants of the  $\alpha$ -helical loop of the C-terminal of Nox2 (D484T, D500A/R) on oxidase activity correlates with the total disruption of p47<sup>phox</sup> membrane-translocation in intact cells (Fig. 6B) and in purified plasma membranes from these mutants-transfected cells (Fig. 7).

- *The charged amino acids in the C-terminal  $\alpha$ -helical loop encompassing residues 484–500 (Asp<sup>484</sup>, His<sup>490</sup>, and Asp<sup>500</sup>) of Nox2 are essential to maintain the NADPH oxidase activity in phagocytic cells.*
- *This region is implicated in the electron transfer from NADPH to FAD and in the oxidase assembly process.*
- *These results confirmed the proposed 3D model of the C-terminal tail of Nox2 (Taylor et al. 1993) showing a crucial role of the  $\alpha$ -helical loop. Indeed the interaction of this domain with cytosolic factors should lead to a conformational change of Nox2 to favor the access of NADPH to its binding sites, starting electron transfer to FAD.*