

Chapitre 3

Article 3 – La Leu505 de Nox2 du neutrophile est cruciale dans le processus de liaison de la NADPH au cours de l'activation du complexe oxydase

Introduction

Au laboratoire nous avons diagnostiqué un cas de CGD X⁺ caractérisé par une mutation ponctuelle (Leu505Arg) pour laquelle l'activité NADPH oxydase est totalement abolie, l'expression de g91^{phox} restant normale. D'après l'alignement des séquences de Nox2 avec d'autres membres de la famille des FNR, la Leu⁵⁰⁵ est un acide aminé très conservé, localisé dans le site potentiel de fixation de l'adénine du NADPH (Fig. 1A). D'après l'alignement des séquences de Nox2, des sites potentiels de fixation du pyrophosphate, du ribose, de l'adénine et du nicotinamide formant la NADPH, sont présentes sur Nox2 (⁴⁰⁵MLVGAGIGVTPF⁴¹⁶, ⁴⁴²YWLCRD⁴⁴⁷, ⁵⁰⁴GLKQ⁵⁰⁷ et ⁵³⁵FLCGPE⁵⁴⁰) (Fig. 1B). Deux domaines au niveau du pyrophosphate et du nicotinamide sont totalement conservés dans les familles étudiées.

La mutation Leu505Arg est située à la fin d'une boucle formant une hélice alpha d'après un modèle de Taylor et Segal (acides aminés 484-504) (Fig. 8). L'hypothèse de Taylor *et al.* serait que cette boucle permettrait l'accès du NADPH à son site de liaison uniquement lorsqu'elle serait déplacée lors d'une interaction avec les facteurs cytosoliques au cours de l'activation de la NADPH oxydase. La boucle en hélice alpha de la partie C-terminale de Nox2 n'est présente que dans les membres de la famille Nox/Duox mais absente dans les autres ferredoxine réductases qui sont activées uniquement en présence de leur substrat sans mécanisme d'assemblage (Fig. 1B). Ceci permet de penser que cette séquence pourrait jouer un rôle spécifique dans l'activation du complexe oxydase. Des travaux récents de notre laboratoire ont en effet confirmé cette hypothèse (Li et al. 2005). La région ⁴⁸⁴DESQANHFVHHDEEKD⁵⁰⁰ et plus particulièrement les acides aminés Asp⁴⁸⁴, His⁴⁹⁰, et Asp⁵⁰⁰ sont impliqués dans le maintien d'une activité NADPH oxydase, dans le processus d'assemblage du complexe en lien avec le transfert d'électrons de NADPH vers FAD.

Les objectifs de ce travail sont:

- La reproduction du cas de CGD X⁺ dans le modèle cellulaire X-CGD PLB-895 comme décrit dans les chapitres précédents.
- L'étude de l'impact de la mutation Leu505Arg sur le processus d'assemblage du complexe oxydase (Li et al. 2005).
- L'étude du fonctionnement de la NADPH oxydase en système acellulaire simplifié en présence de cytochrome *b*₅₅₈ purifié à partir de membranes des cellules PLB-985 mutantes, de cytosol ou de protéines recombinantes p67^{phox}, p47^{phox} et Rac, de NADPH ou NADH, activé par l'acide arachidonique et le GTPγS. Ceci nous permettra de mesurer le turn-over de l'enzyme, le K_m pour la NADPH et la NADH et

l'impact de concentrations croissantes de p67^{phox} sur l'activité oxydase dans des conditions optimales d'activation.

- Les résultats obtenus seront discutés à la lumière de la modélisation 3D de la queue C-terminale cytosolique de Nox2 (collaboration avec Dr. F. Fieschi, IBS, Grenoble).

Résultats

Après mutagenèse dirigée et transfection de l'ADNc Nox2 WT et muté dans les cellules PLB-985 KO, les clones résistants à la généticine ont été sélectionnés par dilution limite. L'expression de Nox2 WT et mutée a été suivie par 3 méthodes : cytométrie en flux grâce à l'anticorps 7D5, immuno-détection, et spectre différentiel du cytochrome *b*₅₅₈ (comme précédemment décrit).

- Une expression équivalente de Nox2 est retrouvée dans les cellules transfectées par le cDNA de Nox2 WT ou contenant la mutation Leu505Arg et comparable à celle des cellules PLB-WT d'origine (Table 1, Fig. 2).
 - L'activité oxydase reconstituée par transfection de Nox2 WT est comparable à celles des PLB WT d'origine (Table 1). Par contre dans le mutant, bien que le taux de cytochrome *b*₅₅₈ soit identique, l'activité oxydase est totalement abolie.
- **Nous avons donc un modèle cellulaire reproduisant exactement le phénotype des neutrophiles du patient atteint de CGD X⁺.**

La translocation de p47^{phox} vers la membrane du phagosome dans les cellules PLB-985 transfectées par Nox2 WT, activées par des billes de latex préalablement traitées par du PMA et observée par microscopie confocale, se fait correctement (Fig. 4A). Dans le cas de la mutation Leu505Arg, la translocation de p47^{phox} est également visible mais est peut-être moins évidente que dans le cas des cellules transfectées par Nox2 WT. Les résultats de translocation *in vivo* ont été confirmés par ceux obtenus *in vitro* (Fig. 4B). *In vitro*, il semble que la translocation surtout pour p67^{phox}, soit légèrement moins forte que pour les cellules WT. La translocation de Rac est observée dans tous les types de membranes. Ceci suggère que la translocation membranaire de Rac est indépendante de celles de p47^{phox}/p67^{phox}. Ceci avait déjà été décrit pour les neutrophiles d'un patient CGD X⁰, c'est à dire avec absence de cytochrome *b*₅₅₈ (Heyworth et al. 1994).

Une partie de l'activité NADPH oxydase mesurée dans les cellules transfectées par le cDNA Nox2 WT, peut être reconstituée à 50% en système acellulaire *in vitro* à partir des membranes de cellules PLB-985 mutantes (Fig. 3). Ceci confirme donc que l'assemblage du complexe oxydase peut être reproduit partiellement *in vitro*. Il existe donc un transfert électronique partiel du NADPH vers l'oxygène moléculaire pour produire des ions superoxyde. Cette possibilité de transfert électronique est confirmée par la mesure d'une activité INT réductase dans les membranes des cellules mutantes, reflet d'un passage des électrons du NADPH vers le FAD (Fig. 3).

Pour mieux comprendre le défaut d'activation du complexe oxydase chez ce mutant et vu

que la Leu⁵⁰⁵ impliquée est potentiellement localisée dans le site de fixation de l'adénine du NADPH, l'affinité du NADPH pour le cytochrome *b*₅₅₈ muté a été déterminée en système acellulaire simplifié utilisant du cytochrome *b*₅₅₈ purifié à partir des cellules PLB-985 transfectées (1.5×10¹⁰ cellules). La détection des deux sous-unités du cytochrome *b*₅₅₈ avec des anticorps monoclonaux spécifiques, à chaque étape de purification montre un enrichissement significatif en cytochrome *b*₅₅₈ en fin de purification (Fig. 5). L'activité oxydase a été reconstituée avec du cytochrome *b*₅₅₈ purifié (0.2 pmoles) à partir des cellules PLB-985 mutantes et relipidé, du cytosol (300 µg) provenant de PNN, ou des protéines recombinantes p47^{phox} (323 nM), p67^{phox} (300 nM) et Rac (100 nM), en présence des quantités croissantes de NADPH (Fig. 6A et 6B) puis avec des quantités croissantes de p67^{phox} (Fig. 7).

- Le turnover du cytochrome *b*₅₅₈ muté correspond à 55-65% de celui de cytochrome *b*₅₅₈ WT (Table 2). Le K_m pour le NADPH et NADH est à peu près le triple pour le mutant Leu505Arg par rapport au WT dont les valeurs, 40 µM pour le NADPH et 490 µM pour le NADH, sont tout à fait comparables à celles retrouvées dans la littérature. On remarque qu'il y a une activité mesurable en présence de cytochrome *b*₅₅₈ purifié dans le système contenant le cytosol en l'absence de NADPH. Ceci est probablement due à la présence de NADPH dans le cytosol.
- L'influence de quantité croissante de p67^{phox} sur l'activité oxydase reconstituée à partir de cytochrome *b*₅₅₈ WT et mutant purifiés, est mesurée (Fig. 7). Le système a besoin de plus de p67^{phox} pour atteindre son maximum d'efficacité : il faut 900 nM de p67^{phox} pour le mutant alors que pour le WT, 300 nM suffisent. Cependant nous n'arrivons pas à atteindre le turn over maximal par rapport au WT .

Le modèle 3D de la queue C-terminale cytosolique montre que la Leu⁵⁰⁵ est à la surface de gp91^{phox}, à la fin de l'hélice α et dirigée vers l'extérieur de la cavité contenant le site de fixation du NADPH (Fig. 8). Sa localisation suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans le contrôle de l'entrée du NADPH pour se fixer à son site. Elle pourrait également intervenir dans les mouvements de l'hélice α, permettant une fixation correcte de p67^{phox} par exemple. Le modèle de Taylor *et al.* n'est pas en faveur de la participation de la Leu⁵⁰⁵ à la liaison directe de l'adénine du NADPH. En effet l'insertion particulière de la boucle en hélice α dans les membres de la famille des Nox/Duox compromet la participation de la séquence ⁵⁰⁴GLKQ⁵⁰⁷ à la fixation du NADPH, comme il est préconisé dans les FNR (Fig. 1B).

Conclusion

L'impact de la mutation Leu505Arg sur Nox2 à l'origine d'un cas de CGD X⁺ a été étudiée grâce à la modélisation cellulaire utilisant la lignée PLB-985 KO pour Nox2 (X-CGD PLB-985).

1. Le modèle cellulaire reconstitué mime exactement le phénotype du cas de CGD X⁺.
2. Malgré une activité oxydase nulle, la translocation des facteurs cytosoliques semble exister mais n'est peut être pas optimale.
3. Une activité NADPH oxydase et INT réductase pour le mutant ont été reconstituées *in vitro* à 50% par rapport au cytochrome *b*₅₅₈ WT, prouvant qu'un transfert électronique ainsi que l'assemblage de l'enzyme existent avec une moindre efficacité.
4. Le K_m pour NADPH et NADH du cytochrome *b*₅₅₈ muté est augmenté de 3 fois alors que le

- turn-over de l'enzyme est diminué de moitié. La mutation Leu505Arg gêne la fixation du NADPH à son site de fixation mais ne semble pas être directement impliquée dans cette reconnaissance. Dans ce cas le K_m pour NADPH serait beaucoup plus perturbé.
5. Il faut 3 fois plus de $p67^{phox}$ en présence du cytochrome b_{558} muté que dans le cas du cytochrome b_{558} WT (avec une quantité optimale de $p47^{phox}$ et de NADPH), pour obtenir une activité maximale de la NADPH oxydase, mais qui reste inférieure à celle du cytochrome b_{558} WT.
 6. Le modèle 3D de la queue C-terminale cytosolique de Nox2 conforte les résultats précédents. La Leu⁵⁰⁵ possède une position stratégique pour l'accès au site de fixation du NADPH sans que cet acide aminé soit directement impliqué dans sa fixation. Cette mutation met l'accent sur l'importance de la fonction de l'hélice α dans la fixation des facteurs cytosoliques, probablement $p67^{phox}$.

Chapter 3

Leu505 of neutrophil Nox2 is crucial in the NADPH binding process during NADPH oxidase activation

Background

Gp91^{phox} contains 570 amino acid residues, composed of six transmembrane α -helices in the N-terminal hydrophobic region, three extra- and two intra- cytosolic loops, and a C-terminal region (Introduction – 3. Gp91^{phox}, Figure 7). This C-terminus of Nox2 is a cytosolic sequence supporting the NADPH and FAD binding sites. Based on sequence alignments of gp91^{phox} with flavoproteins and reductases (Sumimoto et al. 1992; Segal et al. 1992; Rotrosen et al. 1992), two regions, ³³⁷HPFTLTA³⁴⁴ and ³⁵⁵IRIVGD³⁶⁰, are proposed to be involved in the binding of the isoalloxazin ring and ribityl chain of FAD, and four cytosolic sequences, namely ⁴⁰⁵MLVGAGIGVTPF⁴¹⁶, ⁴⁴²YWLCRD⁴⁴⁷, ⁵⁰⁴GLKQ⁵⁰⁷ and ⁵³⁵FLCGPE⁵⁴⁰ are considered to be the binding sites for the pyrophosphate, ribose, adenine and nicotinamide unit of NADPH, respectively. Sequence alignments demonstrated that these four NADPH-binding regions are highly conserved in Nox/Duox family, especially the motifs G-X-G-X-X-P and CG for binding pyrophosphate and nicotinamide, respectively.

In the predicted three-dimensional structure model of Nox2 another intriguing sequence composed of residues 484-504 localized near the potential adenine of NADPH binding site, has been proposed to form an α -helical loop covering the cleft in which NADPH binds in the inactive state of the enzyme (Taylor et al. 1993). Upon oxidase activation, access of NADPH into the binding site could potentially be regulated by interaction of this loop with oxidase cytosolic components. Mutagenesis study in granulocytic cells demonstrated that the region, encompassing residues 484-500, is essential for the oxidase assembly and for the electron transfer from NADPH to FAD (Li et al. 2005). While this α -helical loop is specifically found in the Nox/Duox family but not in other FNR-reductases except in FRE1 from *Saccharomyces Cerevisiae* (Fig. 1B) (Taylor et al. 1993, Karolyn et al. 1996), suggesting that this loop has a special function in Nox/Duox family. According to the 3D-model of Taylor *et al.*, the potential adenine of NADPH binding site ⁵⁰⁴GLKQ⁵⁰⁷ is buried by the insertion of the C-terminal α -helical loop of Nox2 formed by residues 484-504.

Recently a rare X⁺ CGD mutation (Leu505Arg), resulting from the T1526G mutation in exon 12, has been reported, characterized by a normal level of a nonfunctional cytochrome *b*₅₅₈ in the patient's neutrophils with a totally abolished NADPH oxidase activity (Stasia et al. 2005). This mutation is located in the putative adenine moiety binding site in gp91^{phox} ⁵⁰⁴GLKQ⁵⁰⁷ (Rotrosen et al. 1992; Suh et al. 1999; Geiszt et al. 2000; Vignais 2002). Homologous sequence analysis showed that Leu⁵⁰⁵ is highly conserved in the human Nox/Duox family, except in Nox2 of *Dictyostelium discoideum* and plants in which Leu⁵⁰⁵ is replaced by Phe and Thr, respectively (Fig. 1A). To investigate the defective molecular mechanism of the Leu505Arg on the oxidase activation, this X⁺ CGD mutation case was reproduced in the X-CGD PLB-985 cell line.

The reconstitution and functional study of Leu505Arg X⁺-CGD in the X-CGD PLB-985 cell line

The WT and the Leu505Arg Nox2 transfected X-CGD PLB-985 cells were obtained as previously described in Chapter 1 and 2. The level of recombinant protein expression of WT and mutant Nox2 in transfected PLB-985 cells was similar to that of original WT PLB-985 cells measured by FACS using mAb 7D5 (Fig. 2A). This similar Nox2 expression was confirmed in the 1% Triton soluble extract by immunoblotting using mAb 48 and mAb 449, against Nox2 and p22^{phox}, respectively (Fig. 2B). The expression of p22^{phox} is correlated to that of Nox2, confirming that this two subunits co-stabilize each other in the granulocytic cells (Leusen et al. 1994; Yu et al. 1999). In addition the reduced-minus-oxidized difference spectrum of transfected PLB-985 cells was similar to that of WT PLB-985 cells (Fig. 2C), suggesting that the mutant cytochrome *b*₅₅₈ had no effect on the correct haem incorporation. As expected, no Nox2 was observed in X-CGD and empty vector transfected PLB-985 cells

Even though this mutation has no effect on the expression of Nox2 in PLB-985 cells (which is about 1/7 of neutrophils) (Table 1), it totally abolished the oxidase activity in DMF-differentiated transfected PLB-985 cells (Table 1).

➤ *The Leu505Arg Nox2 transfected X-CGD PLB-985 cells mimic exactly the phenotype of the X⁺CGD patient's neutrophils.*

However, approximately 50% NADPH oxidase activity can be restored in the purified plasma membranes from Leu505Arg mutant cells measured by the cytochrome *c* reduction in a CFS assay. In addition the INT reductase activity which is the reflect of electron transfer from NADPH to FAD, was 50% of that of WT control PLB-985 cells.

➤ *These results suggest that the in vitro oxidase assembly can occur partially to support electron transfer from NADPH to FAD and molecular oxygen.*

Indeed to better understand the impact of Leu505Arg mutation on NADPH oxidase activation and assembly, cytosolic factors translocation to the plasma membranes was measured *in vivo* and *in vitro* as described in the previous article (Chapter 2, Li et al. 2005). *In vivo* p47^{phox} translocation occurred in the Leu505Arg Nox2 transfected PLB-985 cells but seems less visible than in WT Nox2 PLB-985 cells (Fig. 4A). *In vitro* translocation of p47^{phox}, p67^{phox} and Rac to the plasma membrane also occurred in both mutant and WT Nox2 membranes (Fig. 4B), while the efficiency of p67^{phox} translocation appears to be lower in mutated plasma membranes than in WT membranes. No translocation of p47^{phox} and p67^{phox} was observed in empty vector transfected cells (Fig. 4). Whereas Rac-membrane translocation occurred normally, suggesting that Rac translocation is independent on the presence of p47^{phox}, p67^{phox} and cytochrome *b*₅₅₈ (Heyworth et al 1994).

➤ *We can conclude that even if the Leu⁵⁰⁵ is localized near the predicted α -helical loop which is a potential binding site for cytosolic factors, p47^{phox} and p67^{phox} translocation occurs in the Leu505Arg mutant PLB-985 cells, but with a less efficiency than in WT Nox2 transfected PLB-985 cells. However this could not explain the total inhibition of NADPH oxidase activity in intact Leu505Arg mutant PLB-985 cells.*

Determination of the turn over and the K_m for NADPH of the WT and Leu505Arg Nox2 cytochrome *b*₅₅₈

According to sequence alignment study (Fig. 1), Leu⁵⁰⁵ is located in the potential adenine of NADPH binding site. The affinity for NADPH of the Leu505Arg mutant cytochrome *b*₅₅₈ was investigated in a simplified cell-free system using purified cytochrome *b*₅₅₈ and human neutrophil cytosol or recombinant proteins, p47^{phox}, p67^{phox}, and Rac.

The cytochrome *b*₅₅₈ was purified from 1.5×10¹⁰ WT or mutant Nox2 transfected PLB-985 cells. The purified preparation was enriched in cytochrome *b*₅₅₈ (2800-3500 pmol/mg protein) with a purification factor of 47-50 and a yield of 4-7% (Fig. 5A, 5C). Reduced minus oxidized difference spectra of purified cytochrome *b*₅₅₈ from both mutant and WT transfected PLB-985 cells possess the three characteristic peaks at 426 nm, 530 and 558 nm, respectively (Fig. 5B).

The oxidase turnover of the purified mutant Leu505Arg cytochrome *b*₅₅₈ was 112 ± 8 and 64 ± 7 mol O₂⁻ · s⁻¹ · mol⁻¹ haem *b* when cytosol or recombinant proteins p67^{phox}, p47^{phox} and Rac1 were used, respectively (Figure 6, Table 2). The higher activity in presence of neutrophil cytosol could be explained by the new partners of oxidase like MRP8/MRP14 (myeloid-related protein) abundant in cytosol which could improve the oxidase activity (Berthier et al. 2003). The Leu505Arg mutation leads to a loss of 35-45% specific oxidase activity by compared with WT Nox2 in a reconstituted CFS using human neutrophil cytosol or recombinant cytosolic factors.

The K_m for NADPH and NADH of the purified mutant cytochrome *b*₅₅₈ was about 3-fold higher than that of WT (Fig. 6, Table 2). The K_m for NADPH and NADH of the WT cytochrome *b*₅₅₈ is about 45 μM and 490 μM, respectively, in agreement with those obtained by several groups (Abo et al. 1992; Koshkin et al. 1996; Nisimoto et al. 1999). These data suggest that Leu505Arg mutation slightly inhibits the affinity for NADPH and NADH.

- *These data suggest that Leu505Arg mutation can disturb the affinity of the mutant cytochrome *b*₅₅₈ for NADPH and NADH while no proof was done to support that Leu⁵⁰⁵ was the amino acid directly implicated in the binding of such nucleotides. If it was the case, the K_m will be more perturbed.*

Effect of increasing amount of p67^{phox} on NADPH oxidase activity reconstituted in a simplified cell free system assay

According to the slight but reproducible defect on p67^{phox} translocation to the plasma membranes from the mutant transfected PLB-985 cells, the effect of increasing amount of recombinant p67^{phox} on NADPH oxidase activity was performed in a simplified cell-free system assay. Optimal condition of recombinant p47^{phox}, p67^{phox}, Rac and NADPH concentration was determined in the presence of purified WT cytochrome *b*₅₅₈. 900 nM p67^{phox} was needed to reach the optimal NADPH oxidase activity of the Leu505Arg mutated cytochrome *b*₅₅₈, while only 300 nM was sufficient for the WT cytochrome *b*₅₅₈ (Fig. 7). In addition the maximal turnover of NADPH oxidase was 120 mol O₂⁻ · s⁻¹ · mol⁻¹ haem *b* for the WT cytochrome *b*₅₅₈ however this turnover was 90 mol O₂⁻ · s⁻¹ · mol⁻¹ haem *b* for the mutated cytochrome *b*₅₅₈.

- *These data suggest that the Leu505Arg mutation inhibits the binding efficiency of p67^{phox} on the mutant cytochrome *b*₅₅₈. It appears that more p67^{phox} protein is needed to obtain an active conformation of Leu505Arg mutant Nox2.*

Analysis of the Leu505 position in the 3D model of the cytosolic C-terminal region

of gp91^{phox}

According to the 3D model of the C terminal tail of Nox2 (Fig. 8):

- *Leu⁵⁰⁵ is at the ending of the α -helical loop, in a strategic position directed towards the outside of the cleft containing the NADPH binding site, just at the entry of this site. However this position does not support the hypothesis that Leu⁵⁰⁵ belongs to the predicted NADPH binding-site.*
- *The α -helical loop is supposed to bind cytosolic factors leading free access for NADPH to its binding site. Asp⁵⁰⁰ and His⁴⁹⁰ are essential charged amino acids implicated in the correct assembly of oxidase complex and electron transfer from NADPH to FAD (Li et al. 2005). Even if Leu⁵⁰⁵ seems not directly involved in the binding of cytosolic factors, Leu505Arg mutation may disturb the movement of the α -helical loop leading to a less efficient interaction between cytochrome b₅₅₈ and p67^{phox}, which subsequently perturbs NADPH access to its binding sites in Nox2.*