

Chapitre 4

Etude de la biosynthèse du cytochrome b_{558} dans le cas de la CGD X^- (Ser193Phe) reproduit dans les lignées cellulaires PLB-985 et COS-7

Introduction

La forme CGD X^- est un variant rare (5%) caractérisé par une expression diminuée de la protéine Nox2 et par conséquent du cytochrome b_{558} . Cette diminution de synthèse protéique s'accompagne soit d'une activité nulle soit très réduite du complexe oxydase (Roos et al. 1996a). Ce variant de CGD X^- est très intéressant car il permet d'étudier le mécanisme de synthèse du cytochrome b_{558} . Un cas de CGD X^- , décrit récemment (Roesler et al. 1999) (Table 5-Introduction), est dû à une mutation faux-sens Ser193Phe dans la boucle D intra-cytosolique de Nox2, qui est très importante pour l'activation de la NADPH oxydase et le transfert électronique du FAD vers l' O_2 (Chapitre 2) (Li et al. 2005).

Objectifs et méthodologie

L'objectif de ce travail est :

- De valider le modèle cellulaire COS-7 pour l'étude de la maturation de Nox2 mutée en Ser193Phe induisant un cas de CGD X^- . L'idée est que les COS-7 possèdent déjà $p22^{phox}$ (DEA GBM-2002-2003, Delphine Tissot Dupont) alors que les cellules X-CGD PLB-985 en contiennent très peu. Nous voulons donc savoir si la présence de $p22^{phox}$ peut influencer sur la synthèse de la protéine Nox2 mutée. La première étape a donc été de reconstituer un contrôle positif par transfection du cDNA de $gp91^{phox}$ sauvage (WT) dans la lignée COS-7. Les clones résistants à la généticine (1 mg/ml) ont été sélectionnés par dilution limite.
- De reconstituer le cas de CGD X^- dans le modèle X-CGD PLB-985 (Zhen et al. 1993) par mutagénèse dirigée et transfection stable (cf méthodologie dans les chapitres précédents) afin d'obtenir le phénotype exact des neutrophiles du patient.
- De mesurer la quantité d'ARN messager (ARNm) de $gp91^{phox}$ mutée, ainsi que l'expression de la protéine correspondante dans chacune des lignées cellulaires.

Comme dans les cas précédents, le vecteur pEF-PGKneo contenant l'ADN de Ser193Phe-Nox2 a été transfecté dans les cellules X-CGD PLB-985 et COS-7. L'évaluation semi-quantitative de l'ARNm de Nox2 WT et mutée a été réalisée par RT-PCR par comparaison avec l'amplification de l'actine (gène de « ménage »). L'expression de Nox2 WT ou mutée a été suivie par 3 méthodes : FACS, Western blot, et spectrophotométrie différentielle du cytochrome b_{558} . L'activité oxydase a été mesurée par chemiluminescence dans les cellules transfectées.

Résultats et perspectives

- Le taux d'expression de l'ARNm de Nox2 est très diminué dans les cellules transfectées Ser193Phe-Nox2 PLB-985 par rapport aux cellules WT-Nox2 PLB-985 (Fig. 1). Par contre, les taux d'expression de l'ARNm de Nox2 WT ou muté sont comparables dans les cellules

- COS-7 transfectées. Ceci suggère que ces deux lignées cellulaires ne possèdent pas les mêmes systèmes de régulation de synthèse ou de stabilisation de l'ARNm de Nox2.
- Les cellules PLB-985, exprimant la mutation S193F, miment exactement le phénotype des neutrophiles issus du patient, caractérisé par une expression diminuée du cytochrome *b₅₅₈* associée à une activité oxydase abolie (Fig. 2, Table 1) (Roesler et al. 1999). Un résultat similaire est observé dans les cellules COS-7 exprimant ce mutant. Cependant il semble que la quantité de Nox2 WT et mutée, révélée à la membrane plasmique par FACS, sans perméabilisation préalable grâce à l'anticorps 7D5 reconnaissant un épitope externe de Nox2, soit un peu plus élevée dans les cellules PLB-985 que dans les cellules COS-7.
 - Pour les 2 types cellulaires il semble qu'il y ait un défaut de maturation de Nox2 mutée, mais les formes immatures sont différentes. Pour Nox2 WT, la forme majoritaire est gp91^{phox} dans les cellules PLB-985, mais cette forme est moins visible dans les cellules COS-7 (Fig. 3). Pour Nox2 muté, gp65, le précurseur glycosylé de gp91^{phox} est la forme majoritaire dans les cellules PLB-985. Par contre dans les cellules COS-7 transfectées par le cDNA Ser193Phe Nox2, c'est la forme précurseur non glycosylée p58 qui prédomine et qui est en plus grande quantité que dans les COS-7 exprimant Nox2 WT. Il semble que dans les cellules COS-7, indépendamment de l'impact de la mutation Ser193Phe, il y ait un problème de glycosylation de Nox2 et d'adressage à la membrane plasmique (Murillo et al. 2005).
 - Le taux d'expression de p22^{phox} dans les cellules PLB-985 transfectées par l'ADNc de gp91^{phox} mutée est corrélé à celui de gp91^{phox}. Cependant, le taux de protéine p22^{phox} dans les cellules COS-7 WT ou transfectées par l'ADNc de gp91^{phox} WT ou mutée ne varie pas (Fig. 3).
 - L'activité oxydase est abolie dans les cellules COS-7 transfectées par Nox2 WT. Ceci est due à l'absence des facteurs cytosoliques dans ces cellules (Table 1).

Chapitre 4

Etude de la biosynthèse du cytochrome b_{558} dans le cas de la CGD X^- (Ser193Phe) reproduit dans les lignées cellulaires PLB-985 et COS-7

Introduction

La forme CGD X^- est un variant rare (5%) caractérisé par une expression diminuée de la protéine Nox2 et par conséquent du cytochrome b_{558} . Cette diminution de synthèse protéique s'accompagne soit d'une activité nulle soit très réduite du complexe oxydase (Roos et al. 1996a). Ce variant de CGD X^- est très intéressant car il permet d'étudier le mécanisme de synthèse du cytochrome b_{558} . Un cas de CGD X^- , décrit récemment (Roesler et al. 1999) (Table 5-Introduction), est dû à une mutation faux-sens Ser193Phe dans la boucle D intra-cytosolique de Nox2, qui est très importante pour l'activation de la NADPH oxydase et le transfert électronique du FAD vers l' O_2 (Chapitre 2) (Li et al. 2005).

Objectifs et méthodologie

L'objectif de ce travail est :

- De valider le modèle cellulaire COS-7 pour l'étude de la maturation de Nox2 mutée en Ser193Phe induisant un cas de CGD X^- . L'idée est que les COS-7 possèdent déjà $p22^{phox}$ (DEA GBM-2002-2003, Delphine Tissot Dupont) alors que les cellules X-CGD PLB-985 en contiennent très peu. Nous voulons donc savoir si la présence de $p22^{phox}$ peut influencer sur la synthèse de la protéine Nox2 mutée. La première étape a donc été de reconstituer un contrôle positif par transfection du cDNA de $gp91^{phox}$ sauvage (WT) dans la lignée COS-7. Les clones résistants à la généticine (1 mg/ml) ont été sélectionnés par dilution limite.
- De reconstituer le cas de CGD X^- dans le modèle X-CGD PLB-985 (Zhen et al. 1993) par mutagénèse dirigée et transfection stable (cf méthodologie dans les chapitres précédents) afin d'obtenir le phénotype exact des neutrophiles du patient.
- De mesurer la quantité d'ARN messager (ARNm) de $gp91^{phox}$ mutée, ainsi que l'expression de la protéine correspondante dans chacune des lignées cellulaires.

Comme dans les cas précédents, le vecteur pEF-PGKneo contenant l'ADN de Ser193Phe-Nox2 a été transfecté dans les cellules X-CGD PLB-985 et COS-7. L'évaluation semi-quantitative de l'ARNm de Nox2 WT et mutée a été réalisée par RT-PCR par comparaison avec l'amplification de l'actine (gène de « ménage »). L'expression de Nox2 WT ou mutée a été suivie par 3 méthodes : FACS, Western blot, et spectrophotométrie différentielle du cytochrome b_{558} . L'activité oxydase a été mesurée par chemiluminescence dans les cellules transfectées.

Résultats et perspectives

- Le taux d'expression de l'ARNm de Nox2 est très diminué dans les cellules transfectées Ser193Phe-Nox2 PLB-985 par rapport aux cellules WT-Nox2 PLB-985 (Fig. 1). Par contre, les taux d'expression de l'ARNm de Nox2 WT ou muté sont comparables dans les cellules

- COS-7 transfectées. Ceci suggère que ces deux lignées cellulaires ne possèdent pas les mêmes systèmes de régulation de synthèse ou de stabilisation de l'ARNm de Nox2.
- Les cellules PLB-985, exprimant la mutation S193F, miment exactement le phénotype des neutrophiles issus du patient, caractérisé par une expression diminuée du cytochrome *b₅₅₈* associée à une activité oxydase abolie (Fig. 2, Table 1) (Roesler et al. 1999). Un résultat similaire est observé dans les cellules COS-7 exprimant ce mutant. Cependant il semble que la quantité de Nox2 WT et mutée, révélée à la membrane plasmique par FACS, sans perméabilisation préalable grâce à l'anticorps 7D5 reconnaissant un épitope externe de Nox2, soit un peu plus élevée dans les cellules PLB-985 que dans les cellules COS-7.
 - Pour les 2 types cellulaires il semble qu'il y ait un défaut de maturation de Nox2 mutée, mais les formes immatures sont différentes. Pour Nox2 WT, la forme majoritaire est gp91^{phox} dans les cellules PLB-985, mais cette forme est moins visible dans les cellules COS-7 (Fig. 3). Pour Nox2 muté, gp65, le précurseur glycosylé de gp91^{phox} est la forme majoritaire dans les cellules PLB-985. Par contre dans les cellules COS-7 transfectées par le cDNA Ser193Phe Nox2, c'est la forme précurseur non glycosylée p58 qui prédomine et qui est en plus grande quantité que dans les COS-7 exprimant Nox2 WT. Il semble que dans les cellules COS-7, indépendamment de l'impact de la mutation Ser193Phe, il y ait un problème de glycosylation de Nox2 et d'adressage à la membrane plasmique (Murillo et al. 2005).
 - Le taux d'expression de p22^{phox} dans les cellules PLB-985 transfectées par l'ADNc de gp91^{phox} mutée est corrélé à celui de gp91^{phox}. Cependant, le taux de protéine p22^{phox} dans les cellules COS-7 WT ou transfectées par l'ADNc de gp91^{phox} WT ou mutée ne varie pas (Fig. 3).
 - L'activité oxydase est abolie dans les cellules COS-7 transfectées par Nox2 WT. Ceci est due à l'absence des facteurs cytosoliques dans ces cellules (Table 1).

Chapter 4

Study of the cytochrome b_{558} biosynthesis defect in an X^- CGD case

(Ser193Phe Nox2) reproduced in X-CGD PLB-985 and COS-7 cell lines

1. Background

In the majority of cases, cytochrome b_{558} is absent and exhibits no detectable oxidase activity (X^0) (Roos et al. 1996a). A few rare cases of mutations in *CYBB* (5%), resulting in low-level expression of cytochrome b_{558} , have been identified (X^-) (Roos et al. 1996). X^- CGD cases often result from missense mutations (Segal et al. 2000; Heyworth et al. 2001) and more rarely from mutations in the promoter of *CYBB* (Newburger et al. 1994, Weening et al. 2000, Stasia et al. 2003). Missense mutations leading to X^- CGD are almost always localized in functional regions of Nox2 (Table 5, Introduction-5. Chronic granulomatous disease, 5.2 X-CGD). For example His101Tyr and His209Tyr, His338Tyr and Pro339His are localized in haem and FAD binding sites, respectively. Indeed the cases 23, 25 and 26 in Table 5 result from missense mutations leading to the loss of pyrophosphate and nicotinamide of NADPH binding sites, respectively. Thus it appears that FAD and NADPH binding is essential for the stability and the synthesis of cytochrome b_{558} . In addition, some mutations are localized closely from essential domains like the second extra cellular loop where glycosylation of Asn¹³² and Asn¹⁴⁹ takes place (cases 10 and 11).

A C590T substitution in *CYBB* gene resulting to a missense mutation (Ser193Phe) in Nox2 causing an X^- -CGD phenotype, was reported by Roesler *et al.* (Roesler et al. 1999). This X^- -CGD mutation is located in the D-loop of Nox2, which is essential for the NADPH oxidase activation process and electron transfer from FAD to the molecular oxygen (Li et al. 2005). This X^- -CGD case points out a possible second role of the D loop on the stabilization of cytochrome b_{558} expression during its synthesis. It is known that in X^0 -CGD, the absence of gp91^{phox} leads to the absence of p22^{phox} and *vice versa* in case of AR22⁰-CGD (Dinauer et al. 1990; Porter et al. 1994). There is a co-stabilization of the two subunits of cytochrome b_{558} . Porter *et al.* first identified a 65-kDa polypeptide as the precursor of gp91^{phox} in EBV-transformed B-lymphocytes derived from A22⁰-CGD patient, which could be readily digested with β -endoglycosaminidase H or peptide N-glycanase F to yield a protein of 55-58 kDa (Porter et al. 1993). Introduction of p22^{phox} transgene into these cells resulted in the generation of a fully processed cytochrome b_{558} containing both gp91^{phox} and p22^{phox}. Yu *et al.* identified a similar 65-kDa intermediate of gp91^{phox} (referred as gp65) in differentiated PLB-985 cells (Yu et al. 1997). Gp65 is synthesized in the endoplasmic reticulum as a high-mannose precursor (Yu et al. 1998). In addition, haem incorporation in gp65 (the precursor of gp91^{phox}) is a prerequisite for the heterodimer formation (De Leo et al. 2000), while interaction sites between p22^{phox} and gp91^{phox} are unknown.

We postulated that the D loop of Nox2 is :

- A possible binding site for p22^{phox}
- And/or involved in the function of the proximal haem localized in the V transmembrane fragment.

2. Study of the biosynthesis of S193F mutated Nox2-cytochrome *b*₅₅₈.

2.1 Strategy

The first aim of this work was to study the biosynthesis of cytochrome *b*₅₅₈ in two cellular models, the human granulocytic X-CGD PLB-985 cells and the monkey kidney COS-7 fibroblasts. As previously reported (Chapters 1, 2 and 3), X-CGD PLB-985 cells can be differentiated into neutrophils for 6 days with DMF 0.5%. In that state it notably contains traces of p22^{phox} (Li et al., 2005). Preliminary works performed in our laboratory demonstrated the presence of p22^{phox} mRNA and protein in COS-7 cells. While Nox2 protein and its corresponding mRNA were absent (Delphine Tissot-Dupont, DEA “Génie biologique et Médical-Année 2002-2003). The first objective was to study the influence of p22^{phox} on the biosynthesis of S193F mutated cytochrome *b*₅₅₈.

- Mutagenesis approach was used to reproduce this mutation in the cDNA of Nox2 in pBluescript II KS (+), then the mutant Nox2 cDNA was subcloned into mammalian expression vector pEF-PGKneo. After sequence analysis to confirm the mutation incorporation, the construct was transfected to X-CGD PLB-985 cells and COS-7 wild type (WT) by electroporation. Then the clones were selected by limiting dilution in G418, 1.5 mg/ml for transfected PLB-985 cells and 1 mg/ml for COS-7 (Bionda et al. 2004; Li et al. 2005).
- S193F Nox2 mRNA amount was evaluated with a semi-quantitative approach using RT-PCR amplification with a house keeping gene (actin). Total RNA was extracted from the transfected PLB-985 and COS-7 cells by Trizol as described in (Stasia et al. 2002). RT-PCR was performed using the primers of actin and Nox2 to amplify a fragment of 683 bp corresponding to the fragment (exon 6 to exon 10) of the Nox2 cDNA (Stasia et al. 2002).
 Actin: FP (forward primer), 5'-gcatcactggagttgcatca-3',
 RP (reverse primer), 5'-ccacctcatagctgaacaca-3'
 Nox2: FP, 5'-gtgcctcatattaattatcacttcttcaccaaaccatccggagg-3'
 RP, 5'-cctccggatggttttggtgaaggaagtataattaatgaggcac-3'
- S193F Nox2 expression in transfected PLB-985 cells and in COS-7 cells was performed by immunodetection and FACS as previously described (Bionda et al. 2004; Li et al. 2005).
- NADPH oxidase activity was measured in intact cells by chemiluminescence in the presence of luminol (Bionda et al. 2004; Li et al. 2005).

2.2 Results and discussion

► S193F Nox2 mRNA amount in X-CGD PLB-985 and COS-7 cells

The mAb 7D5, which is directed to an extracellular epitope of Nox2 (Yamauchi et al. 2001), was used to select the high Nox2 expression clones. The expression of mutant S193F Nox2 was evaluated in 12-20 clones of transfected PLB-985 and COS-7 cells, three to four independent clones of Nox2 mutant were used for subsequent analysis (data not shown).

As seen in Figure 1, a similar amount of actin mRNA was observed in all the tested cells. Small amount of Nox2 mRNA is seen in the empty vector transfected X-CGD PLB-985 cells, indicating that this mRNA is less stable in this gene-targeted cellular model. Indeed an

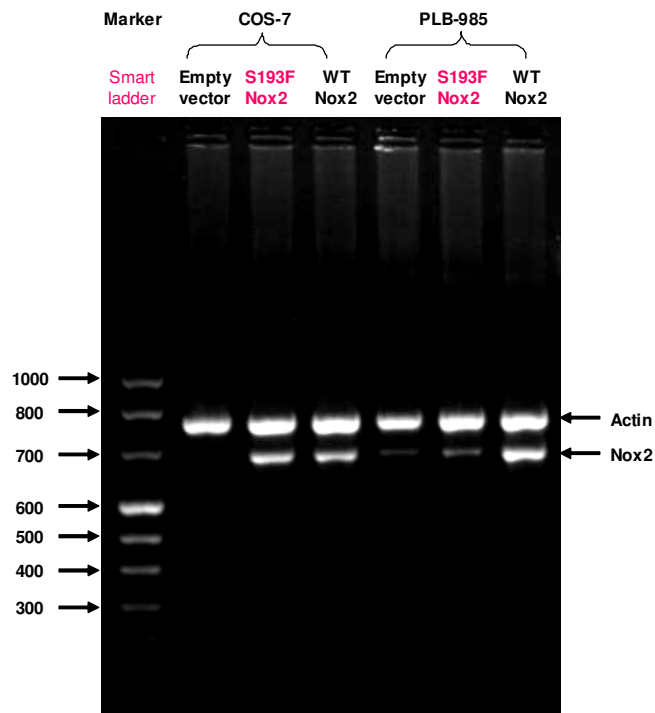


Fig. 1 Detection of Nox2 mRNAs in transfected COS-7 and PLB-985 cells by RT-PCR

hygromycin resistant cassette was inserted in the exon 3 of the *CYBB* gene in this cell line. However the mutant S193F Nox2 mRNA's amount was slightly higher than that of the empty vector transfected X-CGD PLB-985 cells, but highly less than the one of WT Nox2. This suggests that S193F Nox2 mutation inhibits the transcription of mRNA or the stability of this mutated mRNA in the transfected X-CGD PLB-985 cells.

Nox2 mRNA is absent in the empty vector transfected COS-7 cells, consistent with the results obtained by Northern blot (Yu et al. 1997). Meanwhile, the WT and the mutant Nox2 mRNA amount was the same in the transfected COS-7 cell line (Fig. 1). The S193F substitution has no effect on the mRNA synthesis or stability, indicating that granulocytic PLB-985 cells and fibroblastic COS-7 cell line have different mechanisms of Nox2 mRNA synthesis and or stability. The expression of Nox2 mRNA in the two cellular models will be further analyzed by Northern blot.

► **S193F Nox2 amount in X-CGD PLB-985 and COS-7 cells**

Although the S193F Nox2 mRNA amount was as high as WT Nox2 mRNA in transfected COS-7 cells, its protein product is much less than that of WT Nox2 measured by FACS using 7D5 mAb (Fig. 2). A similar result was observed in the mutant Nox2 transfected PLB-985 cells (Fig. 2). However the mutant Nox2 protein expression was higher in transfected X-CGD PLB-985 cells than in transfected COS-7 cells. The same phenomenon was observed for the WT Nox2 amount. No gp91^{phox} was detected in the empty vector transfected COS-7 and

X-CGD PLB-985 cells, consistent with the absent endogenous expression of gp91^{phox} in these cells.

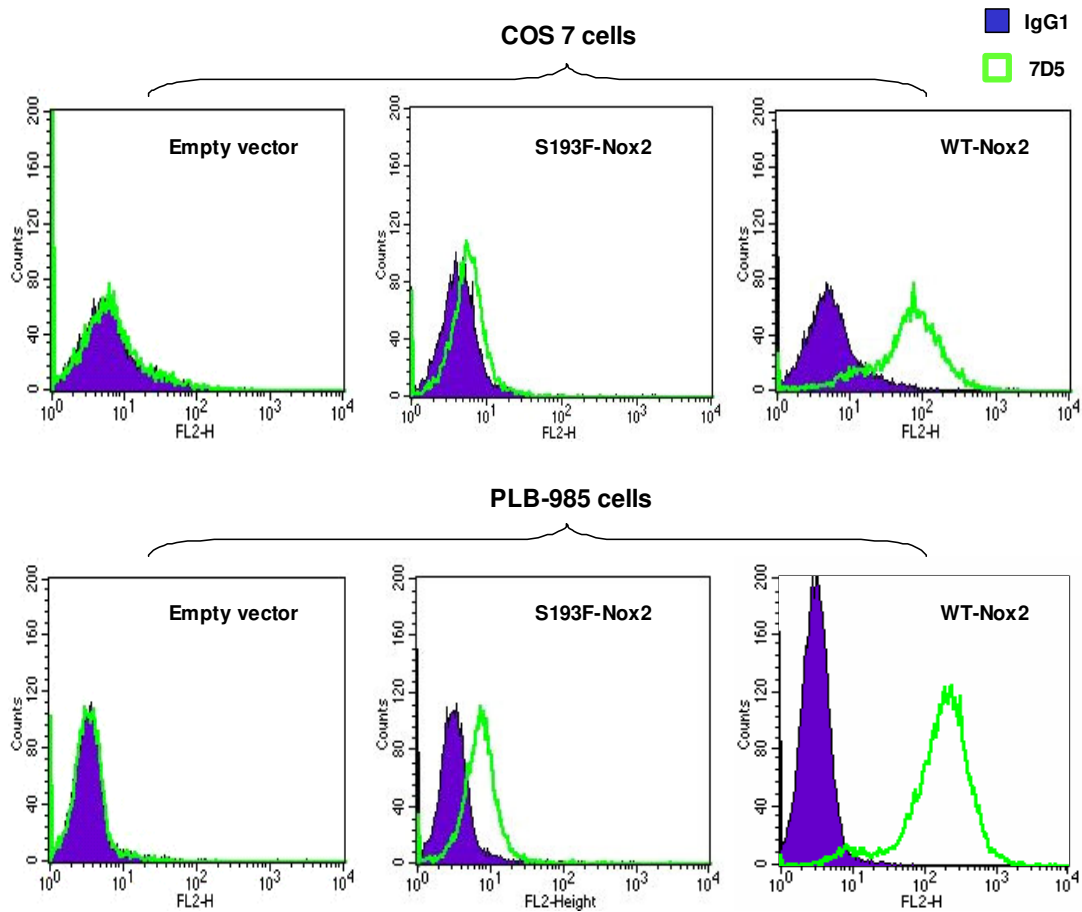


Fig. 2 Expression of WT or mutant Nox2 in transfected COS-7 and PLB-985 cells. 5×10^5 PLB-985 cells or 2×10^5 COS-7 were incubated with mAb 7D5 or Mouse IgG1 isotype mAb.

These results indicate that a very small amount of S193F Nox2 protein was processed and detected at the plasma membranes of the transfected PLB-985 and COS-7 cells. However the cells' population expressing the mutant Nox2 was homogeneous (one peak by FACS analysis).

Then the presence of WT and S193F Nox2 in a 1% Triton X100 soluble extract from transfected X-CGD PLB-985 and COS-7 cells was detected by western blot using monoclonal antibodies specifically directed against the two subunits of cytochrome *b*₅₅₈.

The predominant form of WT gp91^{phox} in transfected COS-7 seems to be its non-glycosylated 58-kDa precursor even in presence of reasonable amount of p22^{phox}. This has also been observed by Yu *et al.* (Yu *et al.* 1998). However, in the S193F-Nox2 transfected cells, the 58-kDa band appears more intense and gp91^{phox} was less than that of WT-Nox2 transfected COS-7 cells (Fig. 3). The p22^{phox} level was not increased after the transfection of WT or mutant Nox2 in these cells. In the mutant Nox2 transfected COS-7 cells, the S193F mutation led to a defect of glycosylation of the p58 precursor. These results are in accordance with a recent work from Henderson's laboratory. Indeed by confocal analysis of EGFP-gp91 localisation in transiently transfected COS-7 cells, they found that only 30% of the population expresses gp91^{phox} at the plasma membrane. The localization of the rest expressed Nox2 protein had not been well defined in this cell line (Murillo *et al.* 2005). This was a cell-line-specific feature

because transfection in CHO or in HeLa cells leads to a localisation of gp91^{phox} only at the plasma membrane. In addition, a previous study (Yu et al. 1998) reported that gp91^{phox} expressed in COS-7 lacks extensive N-linked glycosylation. This could explain that the expressed protein has some difficulty to leave the endoplasmic reticulum to achieve its maturation state and/or have a defective cellular localization.

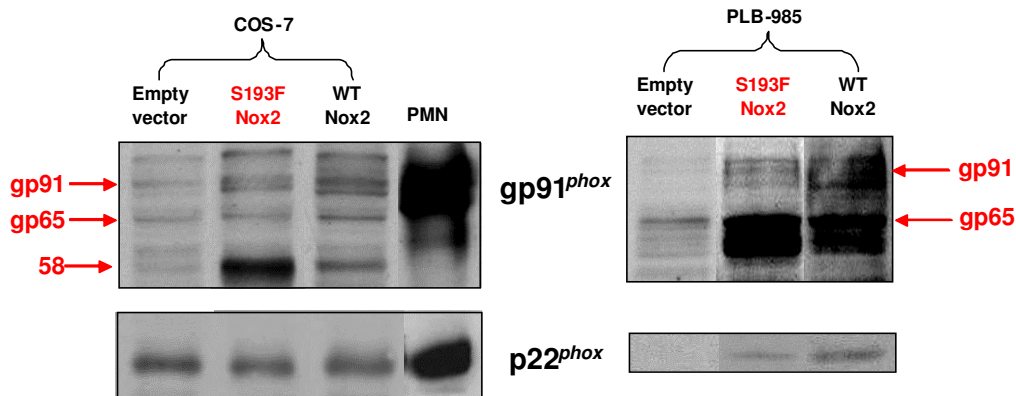


Fig. 3 Expression of WT or mutant gp91^{phox} and p22^{phox} in transfected COS-7 and PLB-985 cells. Immunodetection of gp91^{phox} and p22^{phox} was performed with 50 µg 1% Triton X-100 soluble extracts from transfected cells using mAbs 48 and 449.

In S193F Nox2 transfected PLB-985 cells, the major form of the β sub-unit of cytochrome *b*₅₅₈ is gp65, the high mannose-precursor of gp91^{phox}. The band of gp65 is more intense in the mutant than in the WT Nox2 PLB-985 cells, while gp91^{phox} is more visible in the WT Nox2 than in the mutant Nox2 transfected PLB-985 cells. A notable amount of p22^{phox} was increasing in WT Nox2 transfected PLB-985 cells, in agreement with that the expression of p22^{phox} is dependent on the presence of gp91^{phox} in PLB-985 cells (Biberstine-Kinkade et al. 2001). However, the inhibitory effect of maturation of Nox2 did not result from the low expression of p22^{phox} in transfected PLB-985 cells. Indeed transfection of p22^{phox} cDNA into S193F Nox2 transfected PLB-985 cells could increase the expression of p22^{phox}, but not of gp91^{phox} (data not shown). These data suggest that in granulocytic PLB-985 cells, the S193F mutation may inhibit the glycosylation and/or haem incorporation into the mutated gp65, leading to a defective maturation of cytochrome *b*₅₅₈ or prevent a correct assembly with p22^{phox}.

These data suggest that the S193F mutation has an inhibitory impact on the maturation of gp91^{phox} in transfected COS-7 and PLB-985 cells. Yet the presence of p22^{phox} naturally in COS-7 cells or after transfection in PLB-985 cells, could not influence this maturation.

► Detection of H₂O₂ production in the intact cells

The NADPH oxidase activity was measured in transfected X-CGD PLB-985 cells by chemiluminescence (Table 1) (Li et al. 2005). PLB-985 cells were differentiated into granulocytic cells by 0.5% DMF for 5-7 days and activated with 80 ng/ml PMA.

Table 1. H₂O₂ production in transfected COS-7 and PLB-985 cells.

H₂O₂ generation was measured by chemiluminescence from 5×10⁵ intact transfected COS-7 cells and transfected PLB-985 cells, which were differentiated with 0.5% DMF for 6 days, and

stimulated with 80 ng/ml PMA. Relative luminescence unit (RLU) represents the sum of RLU measured over 60 min (n= 3).

Transfected cells		chemiluminescence	
		H ₂ O ₂ production (RLU)	% of control
COS-7	Empty vector	0.27 ± 0.02	0
	S193F	0.42 ± 0.04	0
	WT-Nox2	0.42 ± 0.01	0
PLB-985	Empty vector	0.26 ± 0.01	0
	S193F	0.12 ± 0.03	0
	WT-Nox2	330.61 ± 15.42	100

H₂O₂ production was totally abolished in the S193F-Nox2 transfected PLB-985 cells, whereas 0.53-1.8% of H₂O₂ production was observed in patient neutrophils measured with dihydrorhodamine 123 (DHR 123) (Roesler et al. 1999). The different H₂O₂ production could be explained by the fact that NADPH oxidase activity is 7 time higher in neutrophils than in PLB-985 cells (Chapter 3). As expected, no NADPH oxidase activity was observed in the transfected COS-7 cells because of the absence of the oxidase cytosolic components in these cells.