



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

XXIII CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA  
IN PATOLOGIA SPERIMENTALE E CLINICA

**STUDI SUI MECCANISMI MICROBICIDI DEI NEUTROFILI**  
**Ruolo dei canali protonici voltaggio-dipendenti nella regolazione  
del metabolismo ossidativo**  
**Impiego di farmaci lisosomotropici per la correzione del difetto di  
attività microbica nella malattia granulomatosa cronica**

Settore scientifico disciplinare: MED/04 (Patologia Generale)

DOTTORANDA:

Dott.ssa Alba Fasolo

RELATORE

Prof. Pietro Dri  
Università di Trieste

CORRELATORE

Dott.ssa Eva Decleva  
Università di Trieste

CORRELATORE

Prof. Renzo Menegazzi  
Università di Trieste

ANNO ACCADEMICO 2010/2011



# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	Pag. 6
1. <i>I Leucociti polimorfonucleati neutrofili</i>	7
2. <i>Ruolo dei PMN nel processo infiammatorio acuto</i>	8
3. <i>Meccanismi microbicidi ossigeno-dipendenti</i>	11
3.1 <i>NADPH ossidasi</i>	11
3.1.1 <i>Struttura del complesso NADPH ossidasi</i>	12
3.1.2 <i>Attivazione del complesso NADPH ossidasi</i>	15
3.1.3 <i>Compensazione di carica nell'attività della NADPH ossidasi</i>	16
3.2 <i>I canali protonici voltaggio dipendenti</i>	19
3.3 <i>La Mieloperossidasi</i>	20
4. <i>Meccanismi microbicidi ossigeno-indipendenti</i>	21
5. <i>Ruolo del pH fagosomale nell'attività microbica</i>	25
6. <i>La malattia granulomatosa cronica</i>	28
6.1 <i>Basi fisiopatologiche della CGD</i>	29
6.2 <i>Diagnosi clinica della CGD</i>	31
6.3 <i>Diagnosi biochimica e genetica della CGD</i>	32
6.4 <i>Trattamento e prospettive terapeutiche della CGD</i>	33
7. <i>Correzione del pH intrafagosomale come possibile approccio terapeutico</i>	36
<b>OBIETTIVI</b>	40
<b>MATERIALI E METODI</b>	43
1. <i>Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofili umani da sangue venoso</i>	44
2. <i>Allestimento di citocentrifugati</i>	47
3. <i>Rivestimento dei pozzetti di micro piastre</i>	48
4. <i>Misura dell'adesione cellulare</i>	48
5. <i>Valutazione dell'aggregazione cellulare mediante citometria a flusso</i>	50
6. <i>Valutazione del metabolismo ossidativo</i>	51
6.1 <i>Misura del consumo d'ossigeno</i>	51

6.2	<i>Misura della produzione di anione superossido</i>	52
6.3	<i>Misura della produzione extracellulare e totale di perossido d'idrogeno</i>	53
6.4	<i>Misura della produzione intracellulare di perossido d'idrogeno</i>	54
6.5	<i>Valutazione dell'attività "scavenger" dello ZnCl<sub>2</sub> nei confronti dello ione superossido</i>	56
7.	<b><i>Misurazione del potenziale di membrana</i></b>	57
8.	<b><i>Misurazione del pH intracellulare</i></b>	58
9.	<b><i>Modello animale</i></b>	59
10.	<b><i>Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofili murini da peritoneo</i></b>	59
11.	<b><i>Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofili murini da sangue venoso periferico</i></b>	60
12.	<b><i>Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofili murini da midollo osseo</i></b>	62
13.	<b><i>NBT in sospensione su sangue venoso periferico murino</i></b>	63
14.	<b><i>Preparazione di Candida albicans</i></b>	65
15.	<b><i>Valutazione dell'attività microbica</i></b>	66
16.	<b><i>Analisi statistica</i></b>	68
	<b>RISULTATI - parte I</b>	69
1.	<b><i>Risultati preliminari</i></b>	70
2.	<b><i>Effetto dello ZnCl<sub>2</sub> sul burst respiratorio</i></b>	73
2.1	<i>Effetto dello ZnCl<sub>2</sub> sul burst respiratorio misurato come consumo d'ossigeno</i>	73
2.2	<i>Effetto dello ZnCl<sub>2</sub> sulla produzione extracellulare di anione superossido e perossido d'idrogeno</i>	75
2.3	<i>Effetto dello ZnCl<sub>2</sub> sulla produzione totale di perossido d'idrogeno</i>	78
2.4	<i>L'inibizione dei canali Hv1 aumenta la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulare</i>	81
2.5	<i>La diminuzione del pH extracellulare causa l'aumento della generazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulare</i>	84
2.6	<i>Effetto dello ZnCl<sub>2</sub> sul potenziale di membrana e sull'acidificazione intracellulare di neutrofili stimolati</i>	85

<b>DISCUSSIONE - parte I</b>	88
<b>RISULTATI - parte II</b>	96
1. <i>Scelta del metodo di isolamento dei leucociti polimorfo nucleati neutrofili murini</i>	97
1.1 <i>Isolamento di neutrofili murini da peritoneo</i>	97
1.2 <i>Isolamento di neutrofili murini da sangue venoso periferico</i>	99
1.3 <i>Isolamento di neutrofili murini da midollo osseo</i>	101
2. <i>Caratterizzazione fenotipica di neutrofili CGD e prova di attività microbica</i>	102
3. <i>Effetto di amantadina e cloroquina sull'attività microbica di neutrofili murini gp91phox KO</i>	106
4. <i>Sperimentazione in vivo: controlli preliminari e definizione delle condizioni sperimentali</i>	107
4.1 <i>Valutazione della tossicità della cloroquina</i>	107
4.2 <i>Ottimizzazione dell'entità della carica microbica</i>	108
4.3 <i>Effetto della cloroquina sulla sopravvivenza di topi gp91phox KO all'infezione da C. albicans</i>	110
<b>DISCUSSIONE - parte II</b>	113
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	120

# *INTRODUZIONE*

## ***1. I Leucociti polimorfonucleati neutrofili***

I leucociti polimorfonucleati neutrofili (PMN) e i monociti macrofagi rappresentano il principale meccanismo dell'immunità naturale con il quale l'uomo si difende dai microrganismi patogeni: quali fagociti professionali, sono infatti in grado di fagocitare e distruggere numerosi 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). Essi 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 neutrofili 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 neutrofili maturi, che rappresentano circa il 90% della popolazione di granulociti circolanti, sono suddivisi in un *pool* circolante e in un *pool* marginale, risultante dal confinamento dei PMN nei capillari, soprattutto polmonari e splenici. Questo secondo *pool* può essere rapidamente mobilitato nel corso di una risposta infiammatoria, specialmente se associata ad un evento infettivo.

Al microscopio ottico i neutrofili appaiono come cellule di 12-14  $\mu\text{m}$  di diametro, caratterizzate da un nucleo multilobato, con 2-5 lobi distinti uniti da sottili fili di materiale nucleare costituito da cromatina altamente condensata; il numero di lobi cresce con l'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 dei neutrofili a riposo sono dispersi anche granuli dotati di membrana propria che, in seguito all'attivazione dei PMN da parte di stimoli solubili o fagocitabili, fondono con la membrana plasmatica e/o con il fagosoma, rilasciando il loro contenuto. E' proprio la mobilitazione controllata di questi granuli citoplasmatici che permette la trasformazione dei neutrofili in potenti effettori dell'immunità innata e dell'infiammazione. Infatti, le varie popolazioni granulari costituiscono un'importante riserva non solo di proteine antimicrobiche,

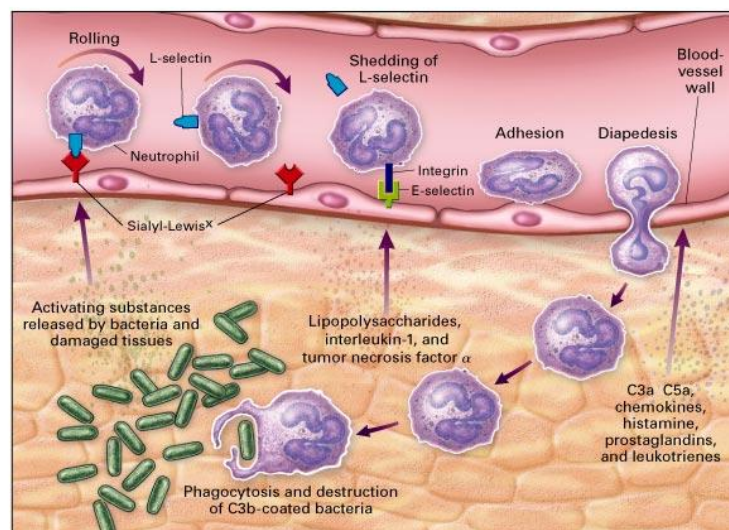
proteasi e altri componenti enzimatici coinvolti nell'uccisione e degradazione dei microrganismi fagocitati, ma anche di un ampio spettro di mediatori solubili dell'infiammazione e di recettori di adesione per l'endotelio e la matrice extracellulare.

Sono state identificate quattro popolazioni di granuli: i **primari**, o azurofili, caratterizzati dalla presenza di mieloperossidasi e defensine; i **secondari**, o specifici, contenenti lattoferrina e attività legante la vitamina B12; i **terziari**, ricchi in gelatinasi; le **vescicole secretorie** contenenti integrine  $\beta_2$  e recettori per i formilpeptidi (Faucus M and Borregaard N, 2003).

## ***2. Ruolo dei PMN nel processo infiammatorio acuto***

Il duplice ruolo dei neutrofili nell'immuno-sorveglianza e nell'eliminazione *in situ* dei microrganismi 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 un aumento locale del flusso ematico favorisce l'arrivo dei leucociti nel sito di flogosi, mentre un rallentamento del flusso sanguigno a livello del microcircolo determina l'accumulo e l'avvicinamento dei PMN all'endotelio: questa prima fase viene definita *marginazione*. Nel contempo, le cellule endoteliali, in risposta a citochine proinfiammatorie, aumentano l'espressione di molecole di membrana, le selettine, che mediano una rapida adesione a bassa affinità tra leucociti e endotelio. 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 delle integrine  $\beta_2$ , recettori che, una volta attivati, mediano l'adesione stabile dei PMN alla superficie endoteliale (Figura 1).

A questo punto, i leucociti fissati all'endotelio devono attraversare la barriera vascolare per raggiungere il tessuto infiammato. Essi migrano quindi lentamente sulla superficie luminale e in corrispondenza delle giunzioni interendoteliali trasmigrano, fuoriescono dal circolo ematico e attraversano endotelio e membrana cellulare, in un processo noto come *diapedesi*. Questo stadio è sostenuto dal coinvolgimento di integrine e citoscheletro che mediano, rispettivamente, l'adesione cellulare all'endotelio e la polarizzazione del corpo cellulare indispensabile al movimento dei leucociti verso il sito d'infiammazione.



**Figura 1: Fasi dell'extravasazione dei neutrofilii.** In prossimità della sede di infiammazione, l'endotelio vascolare secerne sostanze che attivano i leucociti e mobilizza le selettine che stabiliscono interazioni stabili con specifici ligandi presenti sulla superficie degli stessi. Tale interazione permette il *rolling* cellulare lungo l'endotelio e induce l'iperpressione delle integrine: queste, una volta attivate, mediano la fase di adesione all'endotelio e promuovono la trasmigrazione.

Una volta fuoriusciti dal circolo sanguigno, i neutrofilii 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) (Folkesson et al., 1995; Matsumoto et al., 1997).

Il processo che porta all'uccisione, da parte dei PMN, dei microrganismi patogeni presenti nella sede di flogosi (*killing*) può essere suddiviso in più fasi: riconoscimento e adesione alla particella da fagocitare, ingestione, uccisione e digestione. I fagociti esprimono molteplici recettori di superficie che partecipano al riconoscimento e all'internalizzazione dei microrganismi. Alcuni di questi recettori sono implicati nella trasmissione di segnali intracellulari che innescano la fagocitosi (recettori per Fcγ, recettori per il complemento, recettori Toll-Like e Nod-Like (Akira et al., 2001; Aderem et al., 2000), altri sembrano essenzialmente coinvolti nel legame delle particelle o nell'aumento dell'efficacia dell'internalizzazione (recettori *scavenger*, lectine (Platt et al., 1999).

L'adesione tra la cellula bersaglio e i recettori presenti sulla superficie dei PMN dà inizio al processo di ingestione del microrganismo. 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). L'internalizzazione dei microrganismi, che avviene in circa 20 secondi, è accompagnata dalla produzione di molecole di segnale proinfiammatorie e dall'attivazione di meccanismi antimicrobici (Segal AW et al., 1981). I neutrofili sono in grado di uccidere i patogeni fagocitati grazie alla simultanea cooperazione di più processi:

- la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), scatenata dall'attivazione del complesso enzimatico NADPH ossidasi (**meccanismi microbici ossigeno-dipendenti**);
- la degranolazione dei compartimenti citoplasmatici nel fagosoma, con genesi del **fagolisosoma**, che porta al rilascio di proteasi granulari preformate e proteine antibatteriche (**meccanismi microbici ossigeno-indipendenti**).

### 3. Meccanismi microbici ossigeno-dipendenti

#### 3.1 NADPH ossidasi

La fagocitosi dei microrganismi patogeni si accompagna ad un marcato aumento del consumo d'ossigeno (50-100 volte rispetto le cellule *resting*), evento definito *burst respiratorio* (RB), seguito dalla formazione di prodotti di riduzione dello stesso (Reactive Oxygen Species, ROS). La produzione di ROS, essenziale per la difesa dell'organismo dalle infezioni batteriche e fungine, è sostenuta dall'attività della NADPH ossidasi, un complesso enzimatico multimerico presente, oltre che nei neutrofili, anche negli eosinofili e nei monociti/macrofagi. 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'accettore nel fagosoma o nello spazio extracellulare, l'ossigeno molecolare ( $O_2$ ), permettendo così la formazione di anioni superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ):

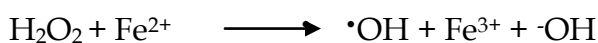


I neutrofili generano grandi quantità di anione superossido che raggiunge nel vacuolo concentrazioni comprese tra 1 e 4 moli/litro (Klebanoff SJ et al., 1969; Reeves EP et al., 2002). La sua concentrazione allo *steady state* è dell'ordine del micromolare (Hampton MB et al., 1998) a causa della spontanea rapida dismutazione del radicale superossido catalizzata dalla superossido dismutasi (SOD) per produrre perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ):



La concentrazione di  $H_2O_2$  nei neutrofili è regolata da enzimi quali la catalasi (presente nei perossisomi) e la glutatione perossidasi (localizzata 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 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) nella reazione di Fenton:



Il perossido di idrogeno può essere inoltre trasformato in acido ipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) nella reazione catalizzata dalla mieloperossidasi (MPO, vedi paragrafo 3.3) :



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. Nel complesso, i radicali liberi  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$  e  $\text{HOCl}$  contribuiscono ad amplificare il danno della parete cellulare (Klebanoff, 1999).

L'anione superossido reagisce inoltre con l'ossido nitrico ( $\text{NO}$ ) per formare il perossinitrito, specie fortemente instabile, che può a sua volta essere metabolizzato e originare altre specie dell'azoto altamente reattive (Reactive Nitrogen Species, RNS). Il ruolo delle RNS nell'attività microbica dei fagociti umani è attualmente poco noto, ma sembra predominante nei roditori (Klebanoff SJ, 2005).

### ***3.1.1 Struttura del complesso NADPH ossidasi***

La NADPH ossidasi è un complesso multimerico dissociato nelle cellule a riposo; è costituito da un centro di ossido-riduzione ancorato alla membrana (il flavocitocromo  $\text{b}_{558}$ ), dai fattori citosolici  $\text{p47phox}$ ,  $\text{p67phox}$ ,  $\text{p40phox}$  e dalle proteine G monomeriche Rac e Rap1A.

### *Il flavocitocromo b<sub>558</sub>*

Il flavocitocromo b<sub>558</sub> 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 citoplasmatico all'ossigeno presente nel vacuolo. Il flavocitocromo b<sub>558</sub> è composto da due subunità: una catena pesante, o catena  $\beta$ , **gp91phox** (dove *gp* sta per glicoproteina, e *phox* per "phagocyte oxidase") ribattezzata **Nox2** nel 1999, e una catena leggera, o catena  $\alpha$ , **p22phox**. Questo citocromo contiene due molecole eme che permettono il trasferimento degli elettroni.

**Nox2** (NADPH ossidasi) è una proteina di 570 amminoacidi codificata dal gene *CYBB*, localizzato sul braccio corto del cromosoma X (Xp21.1) (Royer-Pokora et al., 1986). Nox2 è sintetizzata sotto forma di un precursore del peso di 65 kDa parzialmente glicosilato nel reticolo endoplasmatico. Questo precursore matura successivamente a livello del complesso del Golgi diventando una proteina altamente glicosilata del peso di 91 kDa (Porter et al., 1996; Yu et al., 1997).

La subunità **p22phox** è una proteina di 195 amminoacidi, codificata dal gene *CYBA* situato a livello del braccio lungo del cromosoma 16 (16q24) (Dinauer et al., 1990), fondamentale per la stabilità del citocromo b<sub>558</sub>: l'espressione della subunità  $\beta$  matura (glicosilata) è infatti possibile solo in presenza di p22phox (Yu et al., 1997). Essa rappresenta inoltre il punto d'ancoraggio del fattore citosolico p67phox e della proteina p47phox fosforilata durante l'attivazione del complesso enzimatico (De Leo et al., 1996; Leto et al., 1994; Sumimoto et al., 1996).

### *I fattori citosolici*

La subunità **p47phox** è una proteina fortemente basica di 390 amminoacidi, codificata dal gene *NCF1* (Neutrophil Cytosolic Factor 1), situato a livello del braccio lungo del cromosoma 7 (7q11.23). 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 b<sub>558</sub>.

La proteina **p67phox**, cosituata da 526 amminoacidi, è codificata dal gene NCF2 ed è situato sul braccio lungo del 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. E' stato dimostrato che questa subunità viene fosforilata durante l'attivazione del complesso enzimatico (El Benna et al., 1997; Leto et al., 1990).

Il gene codificante per **p40phox** è localizzato sul cromosoma 22 (22q13.1). Questa proteina di 339 amminoacidi è sicuramente quella il cui ruolo è più dibattuto; è stato dimostrato che essa è 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 dell'ossidasi resta ancora da chiarire: essa permetterebbe di aumentare l'affinità di p47phox per il citocromo b<sub>558</sub> (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.

### *Le proteine G monomeriche*

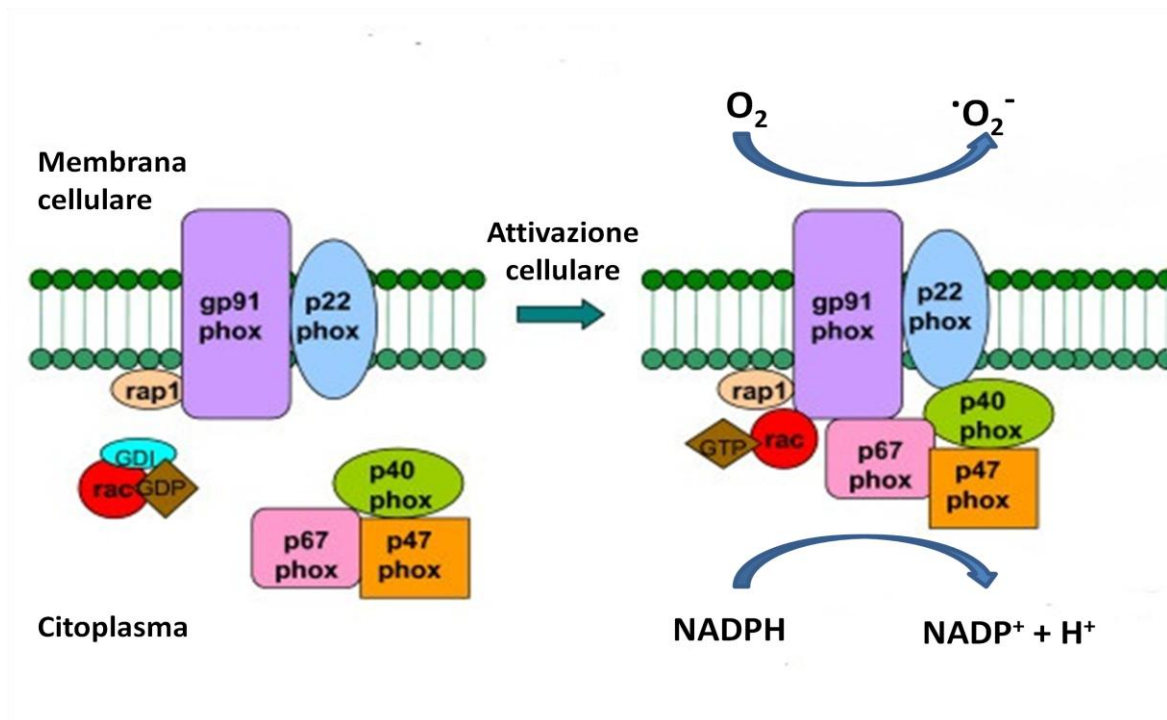
Contrariamente alle altre proteine citosoliche la proteina G monomerica **Rac** può migrare e interagire indipendentemente dagli altri fattori citosolici con la membrana plasmatica. Sono state identificate 3 isoforme: Rac 1, Rac 2 (l'isoforma predominante nei neutrofili) e Rac 3. Queste isoforme presentano un grado di omologia del 92% sui 192 amminoacidi che le costituiscono. Nel citoplasma delle cellule non stimolate, Rac è 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.

L'altra proteina G monomerica appartenente al complesso della NADPH ossidasi è **Rap 1A**, del peso di 22 kDa e associata al citocromo b<sub>558</sub> secondo una stechiometria 1:1. Rap 1A sarebbe localizzata a livello della membrana dei granuli specifici e della membrana plasmatica, insieme al citocromo stesso; in seguito alla stimolazione cellulare, più della metà della riserva di Rap 1A traslocherebbe alla membrana plasmatica (Quinn et al., 1992). Il suo ruolo nell'attivazione del complesso NADPH ossidasi è comunque ancora poco chiaro.

### ***3.1.2 Attivazione del complesso NADPH ossidasi***

L'attivazione del complesso NADPH ossidasi si verifica in seguito ad una serie di interazioni proteina-proteina, come illustrato nel modello riportato in Figura 2. La traslocazione dei fattori citosolici verso il complesso gp91phox/p22phox è condizione necessaria per l'attivazione della NADPH ossidasi. Si pensa che il fattore citosolico p47phox intervenga per "organizzare" la traslocazione degli altri fattori citosolici ed è per questo che tale componente è anche definito "organizer subunit". La fosforilazione di p47phox determina un cambiamento conformazionale che ne favorisce l'interazione con p22phox, la quale è costitutivamente associata a Nox2. La conseguente localizzazione a membrana di p47phox permette il legame della subunità p67phox 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 è attivo ed in grado di generare anioni superossido.



**Figura 2:** Modello di attivazione della NADPH ossidasi leucocitaria e suo assemblaggio

### 3.1.3 *Compensazione di carica nell'attività della NADPH ossidasi*

Dopo l'attivazione, innescata sia da stimoli solubili che fagocitabili, il complesso della NADPH ossidasi associata alla membrana plasmatica convoglia gli elettroni dal NADPH citosolico all'ossigeno molecolare extracellulare e/o intrafagosomale (Sheppard FR at al., 2005). Questo trasferimento di elettroni, che avviene via Nox2 (gp91phox) provoca un flusso netto di cariche negative attraverso la membrana plasmatica ed una variazione del potenziale di membrana che passa da -60 mV nei neutrofili a riposo a 0 mV o fino a +60 mV in seguito, rispettivamente, ad attivazione da parte di PMA o fMLP (Jankowski e Grinstein, 1999). L'attività della NADPH ossidasi è quindi elettrogenica e determina l'accumulo intracellulare di cariche positive che, in assenza di compensazione di carica, potrebbero causare una marcata diminuzione del pH intracellulare ( $pH_i$ ) e una depolarizzazione della membrana fino a valori (circa -190 mV) incompatibili con le funzioni dell'ossidasi stessa (DeCoursey TE at al., 2003; Demaurex N at al., 2005).

Tenendo conto della velocità di produzione di anioni superossido  $O_2^-$  e della capacità elettrica della membrana, è stato calcolato che l'attività enzimatica di Nox2 nei neutrofili dovrebbe arrestarsi nell'arco di 250 millisecondi in assenza di compensazione di carica (DeCoursey et al., 2003). La durata del RB indotto da stimoli solubili o particolati è ovviamente ben più lunga; di conseguenza, un'adeguata compensazione di carica è il fattore critico per preservare la produzione di anioni superossido.

Teoricamente, la compensazione per l'eccesso di cariche positive intracellulari dovuto al flusso extracellulare 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 (Rada et al., 2008).

### ***Compensazione di carica via ioni $H^+$***

L'efflusso di protoni ( $H^+$ ) 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 a quello degli 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 al consumo di protoni in seguito 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). Sembrerebbe 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. E' stato recentemente proposto che la maggiorparte della compensazione di carica necessaria a garantire l'attività della  $NADPH$  ossidasi dipenda proprio da un efflusso di protoni che si verificherebbe grazie all'apertura di canali protonici voltaggio dipendenti ( $Hv1$ ) (DeCoursey et al., 2003). Circa il 5% della cariche in gioco durante il *burst* ossidativo potrebbe invece essere compensato da flussi di  $K^+$  o  $Cl^-$ , come proposto da altri autori.

### *Compensazione di carica via ioni K<sup>+</sup>*

L'efflusso di ioni potassio dal citoplasma dei neutrofili, a parziale compensazione del movimento di cariche negative attraverso Nox2, è ritenuto da alcuni autori (Reeves et al., 2002) l'elemento chiave nei processi di uccisione dei microorganismi internalizzati: il conseguente ingresso di ioni K<sup>+</sup> nel vacuolo di fagocitosi non solo contribuirebbe al fenomeno di compensazione di carica, ma creerebbe anche condizioni di ipertonia tali (200-300 mM) da permettere la slatentizzazione di alcune proteasi antibatteriche granulari (elastasi, catepsina G) altrimenti strettamente legate ad una matrice acida costituita da proteoglicani solfatati (Hackam DJ et al., 1997): queste proteasi, una volta liberate, diventerebbero i principali effettori dell'uccisione dei microorganismi fagocitati. Rada e colleghi hanno invece riscontrato che i movimenti di ioni K<sup>+</sup> si svolgerebbero durante le prime fasi del RB, in cui l'attività ossidasica è ridotta. A mano a mano che la depolarizzazione diviene più accentuata i flussi di tale ione diminuirebbero mentre aumenterebbero i flussi di H<sup>+</sup> in seguito all'attivazione dei canali protonici (Rada et al. 2004). Questi dati sono in accordo con l'osservazione precedentemente riportata secondo cui la conduttanza agli ioni H<sup>+</sup> è predominante quando l'ossidasi funziona a pieno regime.

### *Compensazione di carica via ioni Cl<sup>-</sup>*

Il cloruro (Cl<sup>-</sup>) 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. 3), attraverso dei canali sensibili alla stricnina e attivati dalla glicina; gli autori sostengono inoltre, ma mancano ancora chiare evidenze sperimentali, che in assenza di ioni Cl<sup>-</sup> il RB e il *killing* dei microorganismi siano aboliti (Segal, 2005).

### ***3.2 I canali protonici voltaggio dipendenti***

I canali protonici voltaggio dipendenti (Hv1) sono canali ionici altamente selettivi, presenti sulla membrana di diversi tipi cellulari come, ad esempio, le cellule epiteliali, oociti, leucociti e fagociti. La loro prima individuazione risale a studi elettrofisiologici, effettuati sull'assone gigante del calamaro, coordinati dal gruppo di Thomas e Meech nel 1982 (Thomas and Meech, 1982), mentre la loro prima misurazione su cellule umane risale al 1993, dagli studi del gruppo di DeCoursey (DeCoursey TE and Cherny VV, 1993 e 1994).

Gli Hv1 hanno la caratteristica di permettere il mantenimento della depolarizzazione ottimale tra la faccia interna ed esterna della membrana cellulare espellendo ioni  $H^+$  dalla cellula. Questi canali non necessitano di ATP per il loro funzionamento ma permettono un flusso passivo di  $H^+$ , dall'interno della cellula verso l'esterno, in accordo con il loro gradiente elettrochimico, dando origine ad una variazione di conduttanza attraverso la membrana e a singole e distinte correnti nel canale (Bernheim et al., 1993 ; Cherny et al., 2003). L'apertura e la chiusura di questi canali è strettamente legata allo stato di depolarizzazione cellulare e al pH nel quale le cellule si trovano (Cherny et al., 1995).

Gli Hv1 svolgerebbero un ruolo importante nel controllo del RB prevenendo l'eccessiva acidificazione citosolica e l'aumento della depolarizzazione di membrana a voltaggi inibitori per la NADPH ossidasi stessa (Henderson LM et al., 1987; DeCoursey TE, 2008). Questa conclusione deriva da risultati di studi condotti usando lo  $Zn^{2+}$ , l'inibitore dei canali protonici voltaggio-dipendenti più potente e utilizzato. In questi studi si è visto che lo  $Zn^{2+}$ , il quale si lega ad un sito esterno del canale e innalza il livello di sensibilità al potenziale di membrana percepito dal sensore di voltaggio del canale stesso, aumentando i valori di voltaggio richiesti per l'attivazione degli Hv1 (DeCoursey et al., 2004 e 2007; Frankenhauser et al., 1957; Hille, 2001), inibisce sia la corrente di  $H^+$  che la produzione di superossido e perossido d'idrogeno (Femling JK et al., 2006 ; El Chemaly A et al., 2010; Ramsey IS et al., 2009). Più recentemente è stato dimostrato inoltre che neutrofili ottenuti da topi nei quali gli Hv1 non sono espressi (topi Hv1 *knockout*) producono sostanzialmente

meno superossido e perossido d'idrogeno rispetto a neutrofili ottenuti da topi normali (Okochi Y at al., 2009).

L'evidenza corrente indica quindi che gli Hv1 compensano la maggior parte delle cariche traslocate dalla NADPH ossidasi nei neutrofili. Il massivo efflusso di H<sup>+</sup> all'esterno della cellula o nel fagosoma, limitando la depolarizzazione e prevenendo un eccessivo abbassamento del pH<sub>i</sub>, favorirebbe il mantenimento dell'attività della NADPH ossidasi, minimizzerebbe le variazioni osmotiche e fornirebbe ioni H<sup>+</sup> per la dismutazione del del superossido in perossido d'idrogeno e la successiva formazione di acido ipocloroso (DeCoursey at al., 2006).

### ***3.3 La Mieloperossidasi***

La conversione del perossido d'idrogeno in specie tossiche dotate di maggiore potere antimicrobico è imputabile all'intervento dell'enzima **mieloperossidasi (MPO)**. Si tratta di un'eme-proteina fortemente cationica di circa 150 kDa, ricca in arginina. I gruppi eme che la caratterizzano presentano proprietà spettroscopiche che ne determinano il colore verde, tanto che l'enzima era stato inizialmente denominato verdoperoxidase (Agner, 1941; Klebanoff SJ., 2005). Essa rappresenta circa il 5% delle proteine neutrofiliche totali ed è localizzata a concentrazioni elevate nei granuli azurofili. Qui, costituisce il 25% delle proteine granulari e, una volta rilasciata durante l'attivazione cellulare, raggiunge concentrazioni pari a circa 100 mg/ml (0,65 mM) nel vacuolo di fagocitosi.

Quando, a seguito dell'attivazione dei neutrofili, si verifica la degranulazione e la MPO viene rilasciata all'interno del fagosoma e nello spazio extracellulare, essa catalizza la reazione tra il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e gli ioni cloruro (Cl<sup>-</sup>) con formazione di acido ipocloroso (HOCl), un potente agente battericida (vedi paragrafo 3.1). Oltre al cloruro, questo enzima può catalizzare l'ossidazione H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dipendente di svariati substrati quali fluoruro, bromuro e ioduro. Anche i corrispondenti alogenuri acidi formati sono fortemente reattivi e letali per la maggior parte dei microrganismi. Inoltre, attraverso l'ossidazione della tiroxina e del nitrito, il sistema

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-MPO induce la formazione di radicali tirosinici e intermedi reattivi dell'azoto, specie in grado di attaccare la membrana esterna dei microrganismi.

#### ***4. Meccanismi microbici ossigeno-indipendenti***

Il potenziale battericida e fungicida dei neutrofili dipende, oltre che dai meccanismi ossidativi sostenuti dall'attivazione dell'NADPH ossidasi, anche dall'attività dei peptidi antimicrobici contenuti nei granuli citoplasmatici, che si riversano nel vacuolo di fagocitosi durante la degranulazione.

La diversità funzionale del contenuto granulare consente ai neutrofili di attaccare i patogeni in modi differenti: alcuni costituenti granulari, come le defensine, la BPI (Bacterial Permeability-Increasing protein) e il lisozima, esercitano la loro attività microbica distruggendo la membrana batterica; altri, come la lattoferrina, interferiscono con la via metabolica batterica ferro-dipendente. Quasi tutti questi peptidi antimicrobici svolgono la propria azione in modo ottimale a pH leggermente alcalino (7.5-8.0).

##### ***Peptidi antimicrobici dei granuli azurofili***

Le **α-defensine** sono le principali costituenti dei granuli azurofili; si tratta di piccoli peptidi di circa 3.5 kDa di natura cationica che esercitano un'azione antimicrobica e citotossica nei confronti di un ampio spettro di batteri, funghi, virus incapsulati e protozoi; la loro attività microbica è dovuta alla capacità di polimerizzare e di inserirsi a livello della membrana dei microrganismi formando pori multimerici (Wimley et al., 1994). Inoltre, a concentrazioni dell'ordine del nanomolare, le defensine sembrano avere un'azione chemiotattica per monociti, linfociti T CD4+ e CD8+, amplificando di conseguenza la risposta infiammatoria e agendo da ponte tra l'immunità innata e l'immunità adattativa.

Un altro potente agente antimicrobico contenuto nei granuli azurofili è la **BPI**, 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).

Esso manifesta la sua massima attività battericida a pH leggermente alcalino. 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. Alcuni studi suggeriscono inoltre che l'interazione elettrostatica iniziale delle BPI con i lipidi anionici batterici favorisca l'inserimento delle defensine nella membrana, in un'azione sinergica che potenzia l'effetto permeabilizzante, citotossico, delle defensine stesse. Il dominio C-terminale della BPI favorisce infine l'attacco dei batteri ai neutrofili, mediando la fagocitosi (Ooi et al., 1987; Iovine et al., 1997; Lehrer and Ganz, 1990).

I granuli azurofili contengono anche tre **serprocidine** (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, in particolare nei confronti di batteri Gram positivi (Odeberg and Olssen, 1975). Sono enzimaticamente attive a pH neutro o leggermente alcalino.

Il ruolo preciso della **proteinasi-3** è sconosciuto ma nei neutrofili umani sembra contribuire alla generazione proteolitica di peptidi antimicrobici. Come l'elastasi, sarebbe anch'essa coinvolta nel danno tissutale in numerose forme morbose grazie alla sua capacità di aggredire la membrana basale delle cellule endoteliali. Gli ANCA, anticorpi specifici contro la proteinasi-3, si ritrovano in alcune collagenopatie e nella vasculopatia di Wegner (Campanelli et al., 1990).

La **catepsina G** è una serin-proteasi presente anche a livello dei granuli citoplasmatici di monociti e mastcellule (Salvesen et al., 1987). Vari effetti fisiologici sono stati attribuiti a questa proteasi: attività antimicrobica, degradazione della matrice extracellulare, vasoregolazione, attivazione dell'elastasi, scissione di fattori della coagulazione e del recettore della trombina, ecc. La catepsina G purificata

esercita un'azione citotossica batteriostatica nei confronti di svariati microrganismi (Shafer e Onunka 1989; Shafer et al., 1991; Guyonnet et al., 1991).

L'**elastasi** invece non è dotata di per sè di attività microbica, tuttavia, studi effettuati in passato sulla sua attività nei confronti di *S. aureus* ed *E. coli* in presenza o in assenza del sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-cloruro, hanno dimostrato che, pur priva di attività microbica diretta, l'elastasi umana era in grado di potenziare di 10-100 volte il *killing* MPO-dipendente. La natura cationica di questa proteina granulare, comune anche alla catepsina G, suggerisce che la loro forte interazione elettrostatica con la superficie microbica perturbi l'integrità del microrganismo che risulta di conseguenza più accessibile e vulnerabile ad altri meccanismi antimicrobici (Odeberg e Olsson, 1975 e 1976).

L'**azurocidina** è anch'essa una serin-proteasi antimicrobica isolata dai granuli azurofili, chemiotattica per monociti, fibroblasti e cellule T. Essa possiede inoltre la capacità di aumentare la permeabilità vascolare durante l'extravasazione dei neutrofili. Questa proteina evidenzia un'attività ottimale a condizioni acide (pH 5.5) (Campanelli et al., 1990).

### ***Peptidi antimicrobici dei granuli specifici***

La **lattoferrina** è 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. 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 di questa proteina, detta lattoferricina, viene rilasciata in seguito a digestione da parte della pepsina gastrica. La lattoferrina è presente in vari fluidi biologici, tra cui il latte materno (Oram et al., 1968; Chapple et al., 1998; Yamauchi et al., 1993).

Il **lisozima** (Faurischou et al., 2003) è un peptide cationico antimicrobico di circa 14 kDa contenuto principalmente nei granuli specifici, presente anche nel sangue, plasma, saliva, lacrime, secrezioni aeree e nei granuli di macrofagi e

monociti. Esso catalizza l'idrolisi del peptidoglicano presente nella parete dei batteri Gram positivi e la chitina dei funghi; la sua azione porta quindi ad alterazioni irreversibili della parete microbica (Elsbach et al., 1999).

Contenuta nei granuli specifici è anche la **Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocaline (NGAL)**, proteina appartenente alla famiglia delle lipocaline, definita anche siderocalina per la sua capacità di legare i siderofori, prevenendo in questo modo l'acquisizione sideroforo-mediata di ferro da parte dei microrganismi. Si trova principalmente concentrata nei granuli specifici dei neutrofili, 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, NGAL parteciperebbe alla regolazione della risposta infiammatoria attraverso il legame a mediatori infiammatori di natura lipofila, quali fMLP, PAF (Platelet Activating Factor), leucotriene B4 e LPS (Borregaard e Cowland 1997).

Le **catelicidine** sembrano agire in sinergia con le defensine, determinando un incremento della permeabilizzazione della membrana esterna ed interna dei microrganismi, 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 negativi, 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.

Appartenente al gruppo delle catelicidine, **hCAP-18** è un peptide antimicrobico di 19 kDa presente nei granuli specifici. La regione N-terminale mostra un alto grado di omologia con altre catelicidine, mentre la regione C-terminale forma un' $\alpha$ -elica anfipatica che esercita un'attività antimicrobica contro batteri Gram positivi e Gram negativi e induce la chemiotassi di neutrofili, linfociti T e monociti.

HCAP-18 è 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 positivi grazie alla formazione di un legame stabile con la parete batterica; una volta penetrata nel microorganismo, la PLA2 è in grado di degradare i fosfolipidi di membrana con un meccanismo calcio-dipendente. La sua attività antibatterica è legata a quella di altre proteine microbicide che alterano la permeabilità della membrana esterna, quali la BPI.

#### *Peptidi antimicrobici dei granuli terziari*

**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 essa è situata principalmente nei granuli ricchi in gelatinasi; in seguito all'esocitosi, questa proteina trasloca sulla membrana del fagosoma. 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.

## ***5. Ruolo del pH fagosomale nell'attività microbica***

La membrana del fagosoma neoformato mostra una composizione simile a quella della membrana plasmatica, mentre l'ambiente è inizialmente simile al mezzo extracellulare. Tuttavia, nella successiva maturazione, il fagosoma subisce un drastico cambiamento dovuto al rilascio nel lume fagosomale di una varietà di agenti microbici in seguito alla degranolazione e all'inserimento nella membrana fagosomale delle proteine che contribuiscono all'uccisione e alla digestione dei microorganismi (Jankowski et al., 1999 ; Segal et al., 1981).

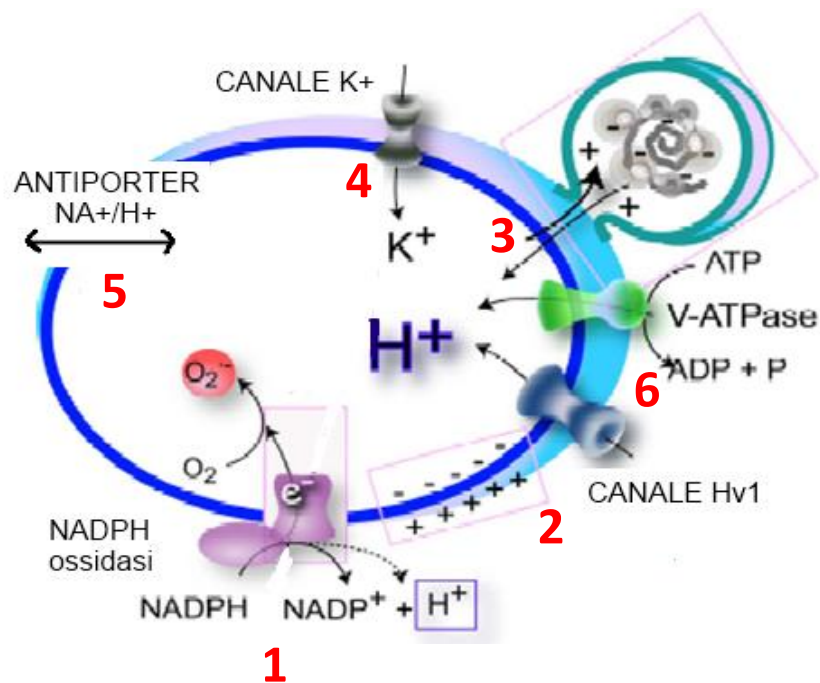
Gli studi effettuati sulle variazioni del pH intrafagosomale dei neutrofilo hanno rivelato un andamento bifasico: infatti, pochi minuti dopo l'inizio della fagocitosi si osserva un rapido aumento del pH vacuolare, che raggiunge un picco di 7.8 - 8.0; nelle due ore successive si osserva una progressiva, lenta acidificazione con una riduzione del pH fino a valori pari a 6.0 - 6.5 (Dri P at al., 2002).

L'iniziale alcalinizzazione dell'ambiente fagosomale favorirebbe l'uccisione dei microrganismi da parte dei meccanismi ossigeno-indipendenti; infatti, come detto in precedenza, gran parte dei peptidi antimicrobici rilasciati nel vacuolo dai granuli primari e secondari (defensine, BPI, proteinasi neutre ecc.) svolgono la loro attività in modo ottimale a pH leggermente alcalino (Shafer WM at al., 1989; Warren L at al., 2003; Roos D at al., 2003). Questo precoce aumento del pH intrafagosomale è riconducibile all'attivazione dell'NADPH ossidasi e al trasporto, mediato dal citocromo  $b_{558}$ , di elettroni dal citoplasma alla superficie interna della membrana vacuolare, che porta alla riduzione dell'ossigeno molecolare ad anione superossido: la successiva dismutazione del superossido a perossido d'idrogeno determina infatti un consumo netto di protoni, con conseguente aumento del pH intrafagosomale. Ciò si verifica nonostante l'influsso, nel fagosoma, di ioni  $H^+$  utili a compensare la separazione di carica: è stato infatti suggerito che i protoni "in entrata" non eguagliano gli elettroni "in uscita" e che, almeno in parte, la compensazione di carica sia sostenuta da un influsso di ioni  $K^+$  nel vacuolo (Reeves et al., 2002). Come già accennato nel paragrafo 3.1.3, l'ingresso nel fagosoma di ioni  $K^+$  determinerebbe un'ipertonìa funzionale alla liberazione dalla matrice granulare di elastasi e catepsina G. Secondo questa prospettiva, ancora dibattuta, il ruolo della NADPH ossidasi si ridurrebbe a quello di promuovere l'influsso di  $K^+$  nel fagolisosoma per solubilizzare le proteasi antibatteriche, vere artefici dell'uccisione microbica (Reeves et al., 2002).

La successiva acidificazione del fagolisosoma sembra dovuta principalmente all'attività di ATP-asi di tipo vacuolare (V-ATPasi) che, idrolizzando ATP, catalizzano il trasporto vettoriale di ioni  $H^+$  nel lume fagosomale (Jankowsky A at al., 1999). Queste pompe protoniche, che sono assenti dalla membrana dei neutrofilo in stato quiescente, verrebbero trasferite sulla membrana fagosomale per fusione con

le vescicole in cui queste pompe protoniche sarebbero localizzate (Rosen and Klebanoff, 1977, Hackam et al., 1997).

Un ulteriore meccanismo di acidificazione fagosomale potrebbe dipendere dall'attività dell'*antiporter*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localizzato a livello della membrana plasmatica delle cellule di quasi tutti i mammiferi. Questo trasportatore di cariche promuove lo scambio di ioni  $\text{Na}^+$  verso l'interno, con ioni  $\text{H}^+$  trasportati all'esterno delle cellule e quindi, durante la fagocitosi, anche all'interno del fagosoma, contribuendo così alla sua acidificazione. Tale trasporto è modulato dal gradiente di concentrazione di questi ioni e non richiede dispendio energetico. L'*antiporter*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  è costitutivamente presente sulla superficie cellulare ed è verosimile che venga incorporato nella membrana fagosomale durante la fagocitosi, contribuendo anch'esso alla riduzione del pH all'interno del fagosoma (DeCoursey and Cherny, 1994) (Figura 3).



**Fig. 3 Omeostasi ionica del fagosoma.** (1) L'attivazione della NADPH ossidasi determina un flusso di  $\text{O}_2^-$  nel fagosoma ed un accumulo di protoni nel citosol. La conseguente depolarizzazione della membrana promuove l'influsso nel fagosoma di ioni  $\text{H}^+$  attraverso i canali Hv1 (2) e di ioni  $\text{K}^+$  (3); l'aumentata forza ionica del lume fagosomale favorirebbe la slatentizzazione delle proteine granulari (4). Dopo la prima fase di alcalinizzazione del pH fagosomale, legata al consumo di  $\text{H}^+$  nella reazione di dismutazione del superossido ad  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5), la successiva acidificazione sarebbe determinata dall'ingresso di ioni  $\text{H}^+$  nel fagosoma grazie all'attività dell'*antiporter*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (6) e della V-ATPasi (7).

Tale acidificazione è una componente fondamentale del processo di degradazione dei microrganismi fagocitati e crea le condizioni favorevoli per l'attivazione di altri meccanismi antimicrobici leucocitari, come il sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e il lisozima, ed è ottimale anche per l'attività delle idrolasi lisosomiali. Il pH fagosomale svolgerebbe quindi un ruolo fondamentale nell'ottimizzazione dei meccanismi di *killing* dei fagociti. Alterazioni nell'andamento del pH fagosomale potrebbero influenzare la capacità dei PMN di uccidere i microrganismi ingeriti, e quindi, la suscettibilità degli individui nei confronti di determinate infezioni. In particolare, disordini nell'alcalinizzazione fagosomale sembrano in parte responsabili del difetto di attività microbica che caratterizza i neutrofili di pazienti affetti da malattia granulomatosa cronica (Dri P et al., 2002).

## ***6. La malattia granulomatosa cronica***

La malattia granulomatosa cronica (Chronic Granulomatous Disease, CGD) è un raro deficit primario dell'immunità innata, di origine genetica, dovuto ad un difetto del metabolismo ossidativo dei polimorfonucleati neutrofili, monociti/macrofagi ed eosinofili (Segal BH et al., 2000). Queste cellule fagocitiche sono incapaci di produrre l'anione superossido e i suoi derivati reattivi dell'ossigeno (perossido d'idrogeno, acido ipocloroso, radicale idrossile) fondamentali per l'uccisione di potenziali patogeni, a causa di svariate anomalie del complesso enzimatico NADPH ossidasi.

L'incidenza della CGD è stata valutata tra 1:1000000 e 1:250000, ma è ragionevole ritenere che si tratti di un dato sottostimato sia per l'esistenza di forme cliniche meno evidenti, o ad esordio tardivo, che per la possibile elevata mortalità neonatale (polmonite da *Aspergillus*) qualora la malattia non venga prontamente diagnosticata. 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). I segni e i sintomi della malattia possono essere differenti e la gravità della condizione clinica variabile; i soggetti affetti da malattia granulomatosa cronica

soffrono di infezioni ricorrenti, spesso gravi e talvolta fatali, cui reagiscono con un'estesa reazione infiammatoria, prevalentemente di tipo purulento, caratterizzata da ripetute infezioni batteriche e fungine e dalla formazione di caratteristici granulomi (Heyworth PG et al., 2003).

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 gastro intestinale, 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 la trasmissione della malattia è legata al cromosoma X; nel restante 25% dei casi la trasmissione è autosomica recessiva e, raramente, autosomica dominante (Segal BH et al., 2000; Seger 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.

## ***6.1 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 gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox e p40phox (Tabella 1).

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 gp91phox del citocromo b<sub>558</sub>. Il 60% dei casi di CGD sono riconducibili 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; Volpp et al. 1989; Leto et al. 1990; Kenney et al. 1993). Recentemente è stato identificato e descritto il primo caso di CGD dovuto a mutazioni autosomiche recessive a carico del gene *NCF4*, codificante per la proteina p40phox (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 quattro 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, inserzioni, o inversioni. 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 conformazione errata) che viene rapidamente eliminata (CGDX<sup>0</sup> o CGDAR<sup>0</sup>). La forma CGDX<sup>0</sup>, la più frequente, si caratterizza per l'assenza delle due subunità del citocromo b<sub>558</sub>, pur essendo colpito solamente il gene *CYBB*. Sembra infatti che esista una stabilizzazione reciproca delle due subunità del citocromo, poichè 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<sup>-</sup>) o da un'espressione normale di gp91phox mutata e afunzionale (CGDX<sup>+</sup>). I casi di CGDX<sup>-</sup> sono riconducibili a mutazioni che causano la perdita della conformazione stabile di gp91phox o, più raramente, a mutazioni a livello del

promotore del gene *CYBB*. Queste mutazioni nella regione codificante del gene *CYBB* sono generalmente alla base dei casi di CGDX<sup>+</sup>.

In ogni caso, anche se queste varianti risultano essere estremamente rare, esse hanno permesso di mettere in evidenza nuovi aspetti relativi alla struttura-funzione delle proteine componenti il complesso NADPH ossidasi (Stasia, 2007).

Proteina alterata	Locus genico	Ereditarietà	Sottotipo*	Frequenza dei casi
gp91phox	Xp21.1	X	X91 <sup>0</sup>	55-60
			X91 <sup>-</sup>	5
			X91 <sup>+</sup>	1-3
p22phox	16p24	AR	A22 <sup>0</sup>	5
			A22 <sup>+</sup>	1
p47phox	7q11.23	AR	A47 <sup>0</sup>	25
p67phox	1q25	AR	A67 <sup>0</sup>	5

**Tabella 1: Diverse forme della CGD.** L'apice indicato nel sottotipo (\*) indica che la proteina viene espressa in quantità normale (+), ridotta (-) o assente (0); **X**: trasmissione X-linked recessiva; **AR**: trasmissione autosomica recessiva.

## 6.2 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 marcescens*, *Burkholderia cepacia*, che provocano infezioni gravi generalizzate.

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.

### ***6.3 Diagnosi biochimica e genetica della CGD***

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

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 (come l'acetato di forbolo-miristato o PMA) in presenza di NBT (Baehner et al., 1968). Quest'ultimo, accettore di elettroni, solubile e di colore giallo, viene ridotto dalle specie reattive dell'ossigeno prodotte dal complesso enzimatico stimolato a formazano, che dà origine ad un precipitato di colore viola all'interno del citoplasma cellulare. 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).

Nella maggior parte dei casi, la mutazione in uno dei quattro geni coinvolti nella CGD provoca l'inespressione 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 della NADPH ossidasi (gp91phox, p22phox, p47phox p40phox o p67phox), attraverso immunoanalisi (via *western blot*) di un estratto dei neutrofilici del paziente affetto da CGD, orienta successivamente la ricerca della mutazione responsabile della CGD nel gene implicato

La ricerca della mutazione viene effettuata inizialmente per trascrizione inversa e amplificazione tramite PCR (Reazione Polimerasica a Catena) dell'intera regione codificante dell'mRNA ottenuto a partire dal gene coinvolto nella malattia, seguita da sequenziamento. Sebbene la mutazione all'origine della CGD possa essere identificata sulla base dell'mRNA del paziente, è necessario poi confermarla tramite identificazione del gene corrispondente. In alcuni rari casi, l'mRNA è 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 approfondimento genetico, la possibilità di una diagnosi prenatale in caso di una gravidanza futura.

## ***6.4 Trattamento e prospettive terapeutiche della CGD***

Attualmente le strategie terapeutiche prevedono la chemioprolifassi antibatterica e antifungina per tutti i pazienti cui è stata diagnosticata la CGD. L'associazione trimetoprim-sulfametossazolo (TMP-SMX) è l'antibiotico profilassi più utilizzata, poichè possiede un buon spettro di attività sui microrganismi che sono più frequentemente causa di infezione nei pazienti CGD. Il TMP-SMX è lipofilo (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.

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, attivo su *Aspergillus* e generalmente ben tollerato.

Un'altra 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 $\gamma$  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 $\gamma$  sembra essere in grado di aumentare l'attività NADPH ossidasi in alcune rare varianti di CGDX91- in cui neutrofili e monociti erano caratterizzati da una debole, ma misurabile, attività microbica. Tuttavia, nei pazienti CGDX91<sup>0</sup> e CGDAR l'aumento della produzione di superossido conseguente al trattamento con IFN $\gamma$  non si è rivelato significativo (Ezekowitz et al., 1987; Newberger et al., 1988). Studi ulteriori hanno peraltro dimostrato l'efficacia e la sicurezza dell'uso di IFN $\gamma$  come farmaco di profilassi (Weening et al., 1995), anche a lungo termine (Marciano et al., 2004). L'uso prolungato di IFN $\gamma$  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 $\gamma$  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 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 microrganismi più frequentemente causa di infezioni nella CGD (Jacobs et al., 1983). 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.

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.

Per ora l'unico trattamento curativo definitivo della CGD è rappresentato dal **trapianto di midollo osseo**; tuttavia la difficoltà di trovare donatori HLA compatibili e i rischi associati con questa procedura limitano 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. 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, tuttavia, nonostante i notevoli passi avanti nello studio di questa malattia, il trapianto di midollo resta un'opzione accettabile soltanto per un ridotto numero di pazienti con un donatore istocompatibile.

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 della 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 trasfezione 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 disegno 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) ed evitare i rischi connessi all'utilizzo di un vettore retrovirale quali la mutagenesi per inserzione (Kume A, Dinauer MC, 2000).

Sebbene il trattamento attuale, che prevede l'utilizzo a scopo profilattico di agenti antimicrobici e IFN $\gamma$ , abbia migliorato in modo rilevante la prognosi dei pazienti CGD, la malattia continua ad essere associata ad una significativa mortalità.

## ***7. Correzione del pH intrafagosomale come possibile approccio terapeutico***

Mentre nei neutrofili normali la fagocitosi si accompagna, come visto, ad una rapida alcalinizzazione del fagosoma seguita da una lenta acidificazione, nei PMN CGD, a causa dell'inattività dell'NADPH ossidasi, si osserva una rapida e sostenuta acidificazione del fagosoma e il pH raggiunge valori pari a 6.5. L'osservazione che l'andamento del pH vacuolare nei neutrofili CGD è alterato rispetto a quelli normali, ha indotto ad ipotizzare che nei CGD siano compromessi anche i sistemi battericidi

ossigeno-indipendenti. Infatti, come detto in precedenza, pare che l'alcalinizzazione del fagosoma, attribuibile all'attività dell'NADPH ossidasi, sia di fondamentale importanza per l'attività delle proteine battericide (Jankowski et al., 2003; Roos et al., 2003; Styrud et al., 1983). L'NADPH ossidasi sembra quindi fondamentale per l'uccisione dei microrganismi non solo in virtù delle specie tossiche dell'ossigeno prodotte, ma anche in quanto modulatore del pH intrafagosomale, attraverso l'attivazione dei meccanismi O<sub>2</sub>-indipendenti. Il difetto di attività microbica nei CGD sembra quindi attribuibile, oltre che alla mancanza dei meccanismi ossigeno-dipendenti, anche alla ridotta o assente attivazione di quelli ossigeno-indipendenti. Ne segue che la possibilità di correggere l'andamento del pH vacuolare nei neutrofili CGD può rivelarsi un'interessante strategia terapeutica per i pazienti affetti da questa malattia (Raghuvaran et al., 1987; Hackam et al., 1997).

Il nostro approccio iniziale è stato quello di testare l'efficacia di una serie di agenti alcalinizzanti nel ripristinare almeno parzialmente le condizioni di pH intrafagosomale fisiologiche di neutrofili privi di attività NADPH ossidasica. Le sostanze scelte per i nostri studi sono due farmaci lisosomotropici con caratteristiche di basi deboli (amantadina e cloroquina) che hanno la capacità di accumularsi nei compartimenti acidi della cellula, aumentandone il pH (Styrud et al., 1983 e 1985; Newman et al., 1994 ; Weber et al., 2000 ; Moreno et al., 2001 ; Khan et al., 2002).

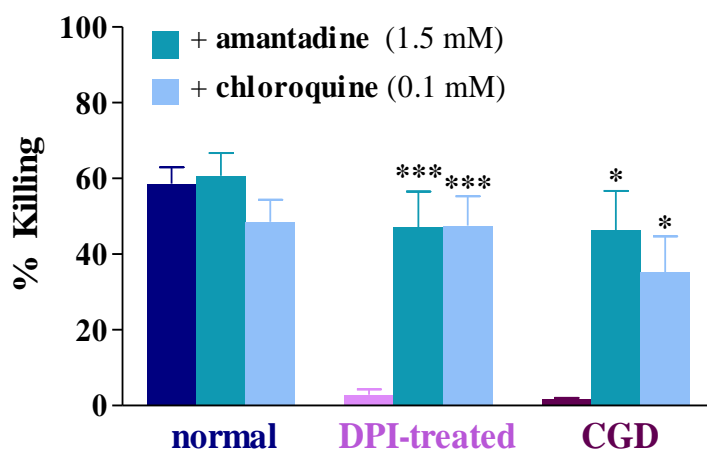
L' **amantadina** è un'ammina tricyclica idrosolubile. Viene comunemente utilizzata come antivirale nella profilassi dell'influenza di tipo A2 e nella terapia del morbo di Parkinson. Dopo l'ingestione di una dose di 200 mg, la concentrazione plasmatica raggiunge il valore massimo di 0.3-0.6 µg/ml. Viene assorbita bene attraverso il canale alimentare e quasi tutto il farmaco assorbito viene escreto immutato nelle urine. L'esatto meccanismo d'azione dell'amantadina rimane ancora da chiarire ma è dimostrato che questa base debole presenta proprietà lisosomotropiche tali da accumularsi nei compartimenti acidi della cellula. Gli effetti indesiderati sono generalmente lievi, spesso transitori e sempre reversibili. Sono stati osservati insonnia, capogiri, letargia, sonnolenza ; nausea, vomito, anoressia e stipsi sono infrequenti (Freireich et al., 1966; Sundelini et al., 2002).

La **cloroquina** è una pentadiammina ampiamente impiegata come antimalarico da oltre 60 anni. Viene assorbita lentamente dopo l'ingestione e si raggiungono concentrazioni terapeutiche nel sangue entro 2-3 ore. Diffonde lentamente nell'organismo e il rene costituisce la via di eliminazione principale; è escreta prevalentemente immodificata. Effetti collaterali sono nausea, vomito, mal di testa, nervosismo, visione annebbiata, ipertensione e prurito. Essendo una piccola molecola con spiccata lipofilia, riesce a passare facilmente le membrane citoplasmatiche e a diffondere nei compartimenti subcellulari, come lisosomi ed endosomi. In particolare, questa sostanza in un ambiente acido come quello lisosomiale viene diprotonata, assumendo così carica netta positiva e alcalinizzando il pH vacuolare (Labro, Babin-Chevaye, 1988, Ducharme, Farinotti 1996).

Questo farmaco lisosomotropico si è dimostrato utile non solo contro il *Plasmodium Falciparum*, ma ha trovato applicazione anche come antiinfiammatorio in patologie autoimmuni come Artrite Reumatoide e Lupus (Carolyn and Malcom, 1984. Diversi recenti studi hanno inoltre comprovato la sua efficacia nelle infezioni da miceti, attraverso meccanismi sia pH-dipendenti sia pH-indipendenti (Raghoebar at al., 1987; Newman at al., 1994; Weber et al., 2000).

Incoraggianti risultati sulla potenziale efficacia terapeutica di amantadina e cloroquina nel trattamento della CGD sono stati ottenuti dal nostro gruppo grazie a studi preliminari condotti *in vitro* su neutrofili isolati dal sangue di pazienti CGD e neutrofili isolati da soggetti normali trattati con il difenileneiodonio (DPI), un composto in grado di reagire con il gruppo eme del citocromo b<sub>558</sub> e determinare l'inibizione irreversibile del complesso enzimatico NADPH ossidasi (Hampton MB at al., 1995; Ellis JA at al., 1988). Questo modello sperimentale simula molto bene la condizione patologica, in quanto neutrofili trattati con DPI evidenziano un andamento del pH intrafagosomale che riproduce quanto osservato nei neutrofili di pazienti CGD: in queste cellule si assiste infatti ad una repentina acidificazione del vacuolo di fagocitosi, non preceduta dalla fase iniziale di alcalinizzazione (Segal et al., 1981; Dri et al, 2002). La figura 4 mostra che sia l'amantadina che la cloroquina sono in grado di innescare l'attività microbica dei neutrofili NADPH ossidasi

deficienti nei confronti di *Candida albicans*, riportandola a valori paragonabili a quelli osservati nei neutrofili di controllo.



**Fig. 4. Ripristino della capacità d'uccisione di *C. albicans* nei neutrofili NADPH-deficienti.** PMN di controllo, PMN trattati con DPI (5  $\mu$ M c.f.) e PMN gp91phox KO (CGD) vengono incubati 30 minuti a 37° C in presenza di amantadina (1.5 mM) e cloroquina 0.1 mM, quindi esposti a *C. albicans* ( $60 \times 10^6$ /ml). Il trattamento con le due basi riporta a valori paragonabili al controllo l'attività microbica di PMN gp91phox KO e PMN normali trattati con DPI.

# *OBIETTIVI*

1. Come abbiamo precedentemente detto, le specie reattive dell'ossigeno, essenziali per l'attività microbica nei confronti dei patogeni batterici e fungini, sono prodotte dai PMN durante il *burst* respiratorio grazie al funzionamento dell'NADPH ossidasi che si assembla a livello della membrana plasmatica. L'attivazione di questo complesso enzimatico provoca un efflusso di elettroni sotto forma di  $O_2^-$  e l'accumulo intracellulare di cariche positive (protoni derivanti dall'NADPH). Ciò determina una depolarizzazione della membrana e un'acidificazione del citosol che, in assenza di compensazione di carica, raggiungerebbero in brevissimo tempo valori tali da provocare lo spegnimento dell'attività dell'ossidasi.

Alcuni autori hanno proposto che l'efflusso di ioni  $H^+$  attraverso i canali protonici voltaggio dipendenti (Hv1) presenti sulla membrana del fagosoma contribuisca in maniera determinante a tale compensazione di carica, prevenendo così l'eccessiva depolarizzazione di membrana. Secondo tale ipotesi, qualora gli Hv1 fossero assenti o inibiti, il funzionamento della NADPH ossidasi risulterebbe gravemente compromesso. Due osservazioni, tuttavia, suggeriscono che l'efflusso di  $H^+$  attraverso gli Hv1 potrebbe non essere la sola via per mantenere il potenziale di membrana entro valori compatibili con le funzioni della NADPH ossidasi:

a) è stato stimato che, in assenza di compensazione di carica, il *burst* respiratorio dovrebbe cessare quando la depolarizzazione aumenta da  $-60$  mV a  $+200$  mV e che ciò avverrebbe in meno di 20 ms negli eosinofili e in meno di 250 ms nei neutrofili (Rada BK et al., 2005). Questo contrasta con quanto riportato in diversi lavori nei quali il *burst* respiratorio indotto da PMA, misurato come consumo di ossigeno o chemiluminescenza luminolo-dipendente, non viene inibito dallo zinco (Hasegawa H et al., 2000 ; Baginski B, 1990);

b) in assenza di compensazione, la depolarizzazione di membrana raggiungerebbe valori tali ( $> +100$  mV) da generare un campo elettrico attraverso la membrana plasmatica in grado di danneggiarla irreversibilmente. In effetti è stato riportato che l'applicazione di voltaggi tra 100 e 1000 mV può causare una rottura a livello della membrana (Crowley JM, 1973 ; Chernomordik LV et al., 1987). Quindi, la compensazione di carica conseguente all'attivazione dei neutrofili potrebbe

essere indispensabile non solo per il mantenimento dell'attività ossidasica, ma anche per prevenire eventuali danni alla membrana. Non è riportata comunque nessuna prova di perdita dell'integrità di membrana in neutrofili isolati da topi Hv1 *knockout* oppure neutrofili incubati con lo  $Zn^{2+}$ , dopo stimolazione con PMA.

In questo lavoro di tesi ci siamo pertanto proposti di indagare quale sia l'effettivo contributo degli Hv1 nel mantenimento dell'attività NADPH ossidasica e quindi del *burst* respiratorio in cellule stimulate con PMA.

2. E' stato dimostrato che il difetto della NADPH ossidasi nei neutrofili di pazienti CGD si associa, oltre che ad una mancata produzione di ROS indispensabili all'uccisione dei microorganismi fagocitati, anche ad una precoce e sostenuta acidificazione del fagosoma, mancando nei PMN CGD la fase di alcalinizzazione del pH intrafagosomale che si osserva subito dopo la fagocitosi nelle cellule normali. Ciò comprometterebbe l'azione di meccanismi rappresentati soprattutto da proteine battericide la cui attività è ottimale a pH neutro o basico.

Studi preliminari *in vitro* ci hanno permesso di dimostrare che, correggendo l'abnorme acidificazione del pH intrafagosomale in cellule prive di attività NADPH ossidasica (neutrofili isolati da pazienti CGD o neutrofili normali trattati con l'inibitore dell'ossidasi difenileneiodonio, DPI) mediante l'utilizzo di amantadina e cloroquina, due farmaci lisosomotropici con caratteristiche di basi deboli, si può ripristinare l'attività microbica di queste cellule nei confronti di *C. albicans*, un patogeno frequentemente isolato da pazienti affetti da CGD.

Nella prospettiva di un potenziale impiego clinico di queste due sostanze, abbiamo deciso di trasferire in un modello animale lo studio sugli effetti potenzianti l'attività microbica di amantadina e cloroquina. Utilizzando come modello della patologia umana una linea di topi CGD, prodotta originariamente dal gruppo di ricerca della Dott.ssa Dinauer mediante silenziamento del gene per la proteina gp91phox, i cosiddetti *gp91phox gene knockout mice* (Pollock et al., 1995), ci siamo quindi proposti di valutare l'effetto di amantadina e cloroquina sull'attività candidacida di neutrofili murini isolati (studi *in vitro*) e, successivamente, sulla resistenza dei topi CGD all'infezione da *C. albicans* (studi *in vivo*).

# *MATERIALI E METODI*

# *1. Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofili umani da sangue venoso*

## **MATERIALI**

- **PBS:** soluzione salina tamponata (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.47 mM, pH 7.4; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA).
- **Soluzione anticoagulante:** Na<sub>4</sub>EDTA (sale tetrasodico dell'acido etilendiammino tetra acetico) 40 mM in PBS.
- **BSA:** Bovine Serum Albumine, Fraction V Solution 35%, Sigma.
- **Tampone HEPES:** NaCl 140 mM, Hepes 5 mM, KCl 5 mM, glucosio 5 mM, pH 7.4.
- **Tampone HEPES/BSA:** tampone HEPES addizionato di BSA 0.2%.
- **Tampone HEPES/ioni:** tampone HEPES contenente CaCl<sub>2</sub> 1 mM e MgCl<sub>2</sub> 1 mM.
- **Soluzione ipotonica:** tampone fosfato 1 mM, pH 7.4.
- **Soluzione ipertonica:** NaCl 1.3% in tampone fosfato 1 mM, pH 7.4.
- **Percoll:** sospensione madre di Percoll (Sigma, densità 1.129g/mL) diluita con PBS 10 volte concentrato (3.07 osmolale) e acqua distillata apirogena così da ottenere una sospensione al 62% (densità 1.087 g/ml) in PBS e una sospensione al 75% (densità 1.103 g/ml) in PBS.

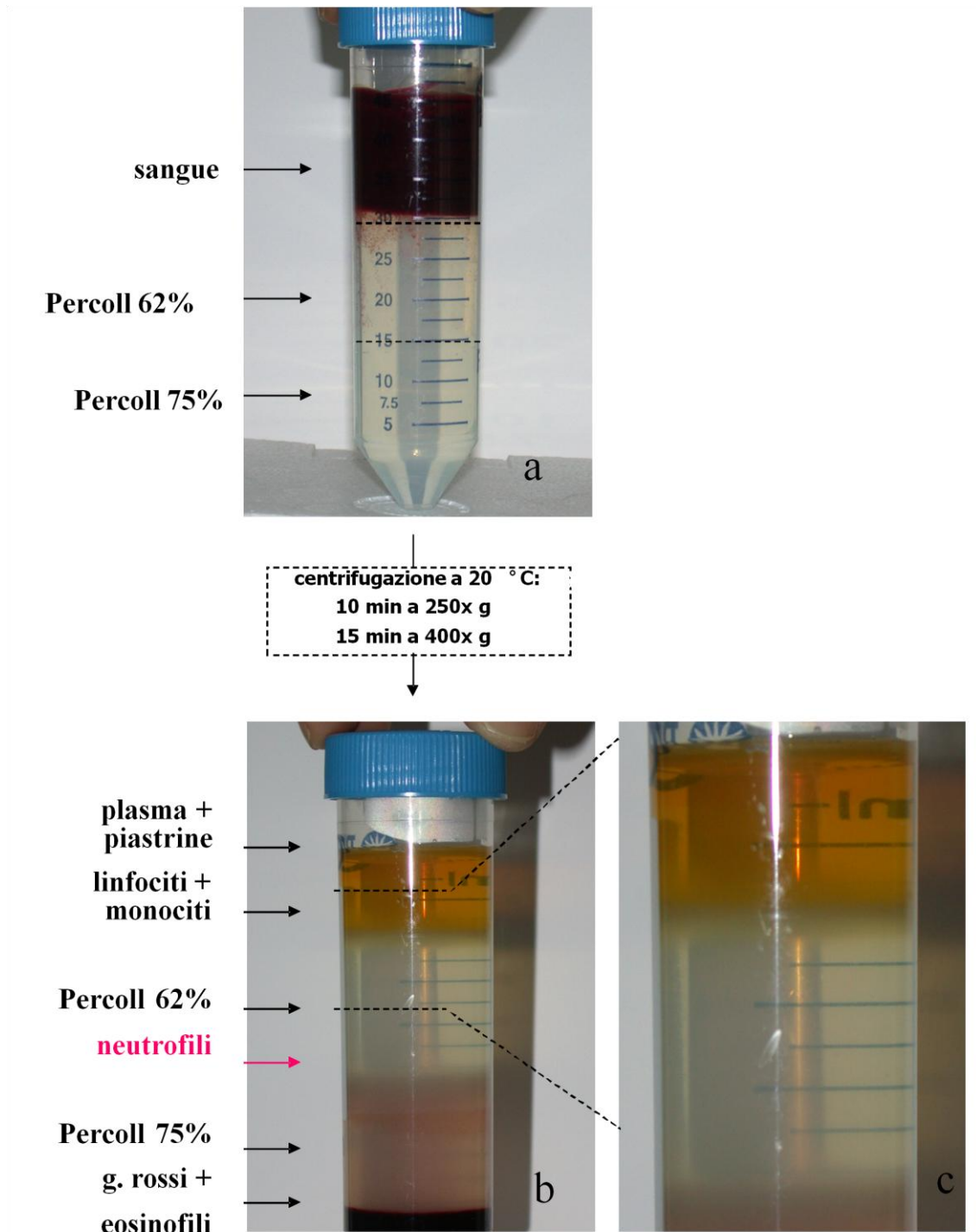
## **METEDO**

I leucociti polimorfonucleati neutrofili (PMN) vengono isolati da sangue umano venoso in base al metodo descritto da Metcalf et al., con opportune modifiche. Il campione di sangue, prelevato da donatori sani, viene raccolto in una provetta contenente EDTA (concentrazione finale 4 mM) per impedirne la coagulazione. Si allestiscono quindi uno o più gradienti discontinui di Percoll, ponendo 15 ml di Percoll al 62% in una provetta e stratificando delicatamente al di sotto di questi 15 ml di Percoll al 75%, con l'ausilio di una siringa provvista di un sottile catetere, evitando il mescolamento delle due sospensioni.

Successivamente 14-15 ml di sangue vengono stratificati sul gradiente appena descritto (Fig. B, pannello a); le provette vengono così centrifugate a 20° C per complessivi 25 minuti, dei quali 10 minuti a 200 x g e, di seguito, 15 minuti a 400 x g. Si ottiene in questo modo la separazione degli elementi figurati del sangue in base a densità e dimensioni: gli eritrociti e la maggior parte dei granulociti eosinofili sedimentano sul fondo della provetta; i PMN si dispongono all'interfaccia tra le due sospensioni di Percoll; i linfomonociti si localizzano tra Percoll 62 % e plasma (Fig. B, pannello b).

Dopo aver eliminato plasma e linfomonociti, la banda contenente i PMN viene accuratamente prelevata con una pasteur di vetro, raccolta in una provetta e sottoposta a lavaggio in HEPES/BSA mediante centrifugazione a 250 x g, per 7 minuti, a 20° C. Per eliminare gli eritrociti eventualmente presenti, il fondello così ottenuto viene sottoposto ad un rapido trattamento di lisi risospingendolo in 3 parti di soluzione ipotonica. Dopo circa 15 secondi di agitazione, l'isotonicità del mezzo viene ripristinata aggiungendo 7 parti di soluzione ipertonica.

Dopo un ulteriore lavaggio a 250 x g per 7 minuti, a 20° C, il *pellet* di cellule viene risospeso e mantenuto in un volume noto di HEPES/BSA fino all'uso. La concentrazione di neutrofilo viene determinata utilizzando un contatore elettronico di particelle (Coulter Counter, modello ZBI, Coulter Electronics, LTD, Luton, BEDS, U.K.), o al microscopio ottico utilizzando un emocitometro (camera Bürker, Precicolor HBG, Germania). La popolazione cellulare così ottenuta, caratterizzata mediante conta differenziale dei citocentrifugati colorati con Dip-Quik (Harleco, Duendingen, Switzerland), è composta per il 94-97% da granulociti neutrofilo, per il 2-5% da eosinofili e per lo 0.5-1% da cellule mononucleate.



**Figura 5. Isolamento di leucociti polimorfonucleati da sangue venoso periferico umano.** (a) Il sangue, reso non coagulabile in presenza di  $\text{Na}_4\text{EDTA}$ , viene stratificato su un gradiente discontinuo di Percoll 62% e 75%. (b) Dopo centrifugazione secondo i tempi e le velocità indicate in Materiali e Metodi, i componenti del sangue si distribuiscono nel seguente modo: il plasma e le piastrine nella parte più alta della provetta, linfociti e monociti tra il plasma ed il Percoll 62%, i neutrofilii nell'interfaccia Percoll 62% e Percoll 75% e la maggior parte dei globuli rossi sul fondo della provetta. Nel pannello (c) è riportato un particolare.

## 2. Allestimento di citocentrifugati

### MATERIALI

- **Vetrini porta-oggetto** 76x26 mm (SuperFrost, Menzel-Glaser)
- **Vetrini copri-oggetto** 20x20 mm (Prestige)
- **Imbutini per citocentrifugazione** (EZ double Cytofunnel)
- **Dip-Quick stain kit**
- **Eukitt**: quick-hardening mounting medium (BioChemika, Fluka)
- **Citocentrifuga** Cytospin 3 (Shandom, Astmoor UK).

### METODO

La sospensione cellulare viene diluita a circa  $2 \times 10^5$  cellule/ml e 250-300  $\mu$ l di questa vengono trasferiti negli imbutini per citocentrifugazione, già posizionati all'interno della citocentrifuga. I campioni vengono così centrifugati a 650 x g per 5 minuti. Al termine della centrifugazione i vetrini vengono tolti dai rispettivi supporti e le cellule presenti negli *spot* così formati vengono fatte aderire saldamente al vetrino immergendo quest'ultimo nella soluzione fissativa a base di metanolo per qualche minuto. Successivamente le cellule fissate vengono immerse in sequenza per qualche minuto in ciascun componente del *Dip-Quick* kit una soluzione acida a base di Eosina e una soluzione basica a base di Tiazina.

Questa metodica permette la colorazione selettiva della diverse componenti cellulari: al microscopio ottico la parte acida-citoplasmatica apparirà rosso/rosa e la componente basica-nucleare sarà invece blu/viola. Effettuata la sequenza di colorazione, il vetrino viene delicatamente lavato con acqua e lasciato asciugare per qualche minuto mantenendolo in posizione verticale, sul suo lato corto. Successivamente si procede all'inclusione del preparato ponendo un paio di gocce di *Eukitt* direttamente sullo *spot* e premendovi delicatamente sopra un vetrino copri-oggetto, badando bene di evitare la formazione di bolle d'aria tra il campione stesso ed il copri-oggetto.

### *3. Rivestimento dei pozzetti di micropiastre*

#### **MATERIALI**

- **Moduli di polistirene** da 96 pozzetti a fondo piatto, 6.4 mm Ø (F16 MaxiSorp Loose Nunc-Immuno Modules, Nunc, Roskilde, Danimarca).
- **Tampone HEPES/BSA**
- **PBS**

#### **METODO**

I pozzetti dei moduli di polistirene utilizzati per gli esperimenti eseguiti in piastra vengono riempiti con 50 µl di tampone HEPES contenete BSA allo 0.2% e mantenuti a 37°C per circa 1 ora. Immediatamente prima dell'inizio delle prove funzionali, i pozzetti vengono lavati con PBS riempiendoli fino all'orlo e poi svuotati vigorosamente; quest'operazione viene ripetuta per 3 volte affinché le proteine in eccesso vengano eliminate.

### *4. Misura dell'adesione cellulare*

#### **MATERIALI**

- **Tampone HEPES/ioni**
- **PBS**
- **Tampone acetato** 20 mM pH 4.2, contenente **CTAB** (cetil trimetilammonio bromuro, Eastman Kodak Co., Rochester N.Y., U.S.A.) 0.1%.
- **TMB** (3,3'; 5,5'-tetrametil benzidina, Serva, Feinbiochemica, GmbH & Co., Heidelberg, Germania) 25 mM in DMSO.
- **AMT** (3-ammino-1,2,4-triazolo, Sigma) 100 mM in acqua distillata.
- **Zinco cloruro, ZnCl<sub>2</sub>** (Sigma) 0,5 M in 29 mM HCl.
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** (Sigma) 0.7 mM in acqua distillata.
- **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 2 N in acqua distillata.

- **Moduli di polistirene** da 96 pozzetti
- **Glutaraldeide** 0.2% in PBS.
- **Microscopio ottico**, Nikon Eclipse E600 equipaggiato di fotocamera digitale Coolpix 995, Nikon Europe BV, Paesi Bassi.

## **METODO**

Per valutare l'effetto dello zinco sull'adesione dei neutrofili a pozzetti rivestiti con BSA, le cellule (75000 per pozzetto in 100  $\mu$ l di tampone HEPES/ioni) vengono incubate per 45 minuti a 37°C in presenza di concentrazioni crescenti di ZnCl<sub>2</sub>. Successivamente, la quantità di PMN adesi al substrato si determina attraverso il dosaggio colorimetrico dell'attività della mieloperossidasi (MPO), enzima assunto come *marker* dei neutrofili (Menegazzi et al., 1996).

Al termine dell'incubazione i pozzetti vengono riempiti con PBS, tappati e centrifugati capovolti per 5 minuti a 200 x g a 20° C, allo scopo di facilitare il distacco dei neutrofili non aderenti. Dopo la centrifugazione, i pozzetti vengono stappati e svuotati mantenendo la piastra sempre capovolta ed infine i residui di liquido vengono aspirati mediante l'utilizzo di una pompa a vuoto. La reazione catalizzata dalla MPO si sviluppa aggiungendo ad ogni pozzetto 75  $\mu$ l di tampone acetato contenente CTAB e addizionato di TMB (c.f. 2 mM) e AMT (c.f. 4 mM).

Il CTAB è un detergente cationico che rompe le membrane cellulari, liberando così dai granuli la MPO che diventa accessibile al substrato. Il TMB è un composto fotosensibile che viene ossidato dalla MPO in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'AMT è un inibitore selettivo della eosinofilo perossidasi che viene inserito nel saggio per evitare eventuali errori dovuti alla contaminazione delle sospensioni di PMN da parte di eosinofili. Infatti, essendo l'attività perossidasi degli eosinofili dieci volte superiore a quella dei PMN, una contaminazione anche bassa delle sospensioni cellulari da parte di eosinofili potrebbe alterare i risultati portando a una sovrastima dell'entità di adesione dei PMN, qualora gli eosinofili avessero una maggiore adesività dei neutrofili.

La piastra viene poi agitata per 5 minuti allo scopo di facilitare l'azione del detergente, dopodiché si aggiungono a ciascun pozzetto 75  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.7 mM per

innescare la reazione di ossidazione del TMB da parte della MPO. Tale reazione viene bloccata dopo alcuni secondi aggiungendo 100  $\mu$ l di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N ad ogni pozzetto. Per determinare la quantità di TMB ossidato la piastra viene letta in un lettore per micropiastre (Power Wave x, Bio-Tek Instruments, INC., U.S.A.) alla lunghezza d'onda di 405 nm. Il calcolo della percentuale di cellule adese si effettua sulla base di una curva di taratura costruita, in ciascun esperimento, misurando l'attività perossidasi di quantità note di PMN.

#### *Valutazione morfologica dell'adesione tramite microscopia a contrasto di fase*

Nei pozzetti rivestiti con BSA vengono aggiunti PMN alla concentrazione di  $0.12 \times 10^6$ /ml in tampone HEPES. Le cellule così aliquotate vengono messe in contatto con varie concentrazioni di zinco in un volume finale di 0.3 ml. Dopo 60 minuti d'incubazione a 37° C, il tampone viene aspirato delicatamente e le cellule vengono fissate aggiungendo una soluzione di glutaraldeide allo 0.2% in PBS. Dopo di che le cellule sono esaminate al microscopio a contrasto di fase.

## ***5. Valutazione dell'aggregazione cellulare mediante citometria a flusso***

### ***MATERIALI***

- PBS
- Tampone HEPES
- ZnCl<sub>2</sub>
- **Citofluorimetro a flusso FACSCalibur™** (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia o Sparcks, MD).

## **METODO**

La citometria a flusso permette di effettuare un'analisi multiparametrica di particelle (generalmente cellule) in sospensione in un mezzo liquido, che viene svolta individualmente per ogni cellula.

I PMN ( $1 \times 10^6$ /ml in tampone HEPES/ioni) vengono incubati con  $ZnCl_2$  1 mM per 45 min a  $37^\circ C$ , in agitazione. Ciascuna popolazione viene poi trasferita in provette da FACS e sottoposta a lettura citometrica. Le popolazioni cellulari vengono quindi analizzate in base ai parametri fisici *forward-scatter* (FSC) e *side-scatter* (SSC) indicativi, rispettivamente, delle dimensioni e della complessità delle particelle analizzate.

## **6. Valutazione del metabolismo ossidativo**

### **6.1 Misura del consumo d'ossigeno**

#### **MATERIALI**

- **Tampone HEPES/ioni**
- **$ZnCl_2$**
- **PMA**, Phorbolo 12-miristato 13-acetato, 1 mg/ml in DMSO (Sigma).
- **SOD, Superoxide Dismutase**, estratta da eritrociti bovini (Sigma), 1 mg/ml in NaCl 0.9%.
- **Azide,  $NaN_3$** , 0.5 M in acqua distillata.
- **Elettrodo ad ossigeno**, Clark-type, Yellow Spring Ins. Co. OH.

#### **METODO**

L'attività della NADPH ossidasi può essere valutata misurando la quantità di ossigeno consumata dall'enzima in seguito ad attivazione dei PMN da parte di un agonista solubile. Il consumo d'ossigeno viene misurato polarograficamente mediante l'utilizzo di un elettrodo ad ossigeno. L'elettrodo in questione è immerso

nel medium d'incubazione, che è contenuto all'interno di una vaschetta di plastica e viene mantenuto in agitazione ad una temperatura costante di 37° C (Dri P et al., 1979). Il mezzo d'incubazione contiene 5 µg/ml di enzima superossido dismutasi (SOD) e NaN<sub>3</sub> 100 µM . Il saggio viene eseguito con 3.5-5x10<sup>6</sup> neutrofili sospesi in 1 ml finale di tampone HEPES/ioni.

Dopo aver iniziato le prime registrazioni ed aver ottenuto una stabile linea di registrazione del consumo d'ossigeno cellulare (3-5 minuti), il *burst* respiratorio è indotto aggiungendo 100 ng/ml di PMA al campione. Nelle prove che lo prevedono, viene aggiunto ZnCl<sub>2</sub> 100-300 µM trenta secondi prima dell'aggiunta dello stimolo.

## ***6.2 Misura della produzione di anione superossido***

### ***MATERIALI***

- **Tampone HEPES/ioni**
- **ZnCl<sub>2</sub>**
- **PMA**
- **Citocromo c di tipo V, estratto da cuore di cavallo (Sigma).**
- **Moduli di polistirene da 96 pozzetti**

### ***METODO***

Un altro metodo utilizzato per valutare l'attività della NADPH ossidasi consiste nel misurare la quantità di anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) prodotto dalle cellule, attraverso il saggio di riduzione del citocromo *c* (Menegazzi et al., 1994).

I pozzetti, rivestiti con BSA, vengono riempiti con 50 µl di citocromo *c* 0.12 mM c.f. e 25 µl di ZnCl<sub>2</sub> 6 volte concentrato, in tampone HEPES/ioni. I moduli così allestiti vengono preriscaldati per 10 minuti a 37° C e ad ogni pozzetto vengono poi aggiunti 50 µl di sospensione cellulare alla concentrazione di 1.5x10<sup>6</sup> PMN/ml in tampone HEPES/ioni.

Dopo circa 30 secondi dall'aggiunta delle cellule, ad ogni pozzetto viene aggiunto il PMA (25 ng/ml c.f.) e la piastra viene incubata a 37° C in uno spettrofotometro termostato (Multiskan MCC/340, Labsystem Oy, Helsinki, Finlandia).

Le letture vengono effettuate alle lunghezze d'onda di 550 nm e 540 nm, che corrispondono rispettivamente al picco di assorbimento del citocromo c ridotto e al punto isobestico degli spettri di assorbimento del citocromo c ridotto e ossidato. La differenza tra i valori di assorbanza registrati alle due lunghezze d'onda risulta quindi proporzionale alla quantità di citocromo c ridotto. Nel nostro sistema di lettura, ad una nanomole di citocromo c ridotto corrisponde una differenza di densità ottica di 0.037 unità; poiché il rapporto stechiometrico della riduzione del citocromo c da parte di O<sub>2</sub><sup>-</sup> è di 1:1, allora la quantità di O<sub>2</sub><sup>-</sup> prodotta da 1x10<sup>6</sup> cellule viene calcolata come segue:

$$\text{nmoli O}_2^-/10^6 \text{ PMN} = \text{D.O.} \times 10^6/0.037 \times n$$

dove **n** è il numero di cellule aggiunte in ogni pozzetto.

### ***6.3 Misura della produzione extracellulare e totale di perossido d'idrogeno***

#### ***MATERIALI***

- **Tampone HEPES/ioni**
- **ZnCl<sub>2</sub>**
- **Amplex Red (Sigma), 10 mM in DMSO.**
- **Horseradish Peroxidase (HRP) (Sigma), 2 mg/ml in DMSO.**
- **SOD**
- **NaN<sub>3</sub>**
- **PMA**
- **Moduli di polistirene da 96 pozzetti**

## **METODO**

La quantità di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodotta dai PMN si può misurare utilizzando il sistema enzimatico HRP-Amplex Red. Durante la riduzione del perossido d'idrogeno ad acqua da parte dell'HRP, il reagente Amplex Red viene ossidato ed il prodotto che ne risulta, la resorufina, è una sostanza molto fluorescente che può essere letta spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 576 nm (Mohanty et al., 1997).

Per misurare la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulare, i pozzetti, precedentemente rivestiti con BSA e riempiti con 20 µl di HEPES/ioni, vengono addizionati di 20 µl ZnCl<sub>2</sub> 7.5 volte concentrato, 20 µl di SOD 37,5 µg/ml e 20 µl di una miscela costituita da Amplex Red e HRP 7.5 volte concentrata (Amplex Red 40 µM c.f., HRP 1 µg/ml c.f.). La piastra così allestita viene riscaldata a 37° C per 5 min. Nel contempo le cellule (0.5x10<sup>6</sup>/ml in tampone HEPES/ioni) vengono preriscaldate in sospensione a 37° C per circa 5 minuti e quindi aggiunte, in un volume di 50 µl, in ciascun pozzetto. Dopo 30 secondi, la produzione di perossido d'idrogeno da parte dei neutrofilici viene stimolata aggiungendo, in ciascuna prova, 20 µl di PMA 187,5 ng/ml (25 ng/ml c.f.).

Per misurare la produzione di perossido d'idrogeno totale, cioè la somma tra l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivante dalla dismutazione extracellulare dell'anione superossido e l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formatasi all'interno della cellula, nella fase di allestimento dei pozzetti viene aggiunto al saggio NaN<sub>3</sub> 100 µM.

In entrambi i casi, dal momento dell'aggiunta del PMA, le letture dei campioni vengono effettuate in un lettore per micropiastre termostato (37°C), alla lunghezza d'onda di 576 nm, ogni 2.5 minuti per 30 minuti totali.

### ***6.4 Misura della produzione intracellulare di perossido d'idrogeno***

Per valutare la produzione intracellulare di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da parte dei PMN stimolati con PMA, abbiamo utilizzato la diidrorodamina-123 (DHR), un composto che diffonde liberamente nei PMN. In seguito all'attivazione metabolica, gli intermedi

reattivi dell'ossigeno prodotti, in particolare il perossido di idrogeno, ossidano la DHR a rodamina-123 (Rho-123), un composto fluorescente nel verde se eccitato a 488 nm, che si accumula nei granuli dei neutrofili. La quantità di Rho-123 che si forma nelle cellule, misurabile in termini di intensità di fluorescenza, è pertanto proporzionale alla quantità di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodotta (Henderson at al., 1993; Rinaldi at al., 2007; Mauch at al., 2007).

## ***MATERIALI***

- **Tampone HEPES/BSA**
- **Tampone HEPES/ioni**
- **Diidrorodamina-123 (DHR)** (Sigma): 30 mM in N,N-dimetilformamide (DMF), conservata a - 20 ° C.
- **NaN<sub>3</sub>**
- **ZnCl<sub>2</sub>**
- **Catalasi**, estratto da fegato bovino, Sigma.
- **PMA**
- **Moduli di polistirene** da 96 pozzetti.
- **Lettore per micropiastre**, spettrofluorimetro Infinite F200, Tecan Austria GmbH, Grödig.

## ***METODO***

I neutrofili, alla concentrazione di 1.5x10<sup>6</sup>/ml, vengono caricati con DHR 2 µM per 30 minuti a temperatura ambiente, in agitazione e al riparo dalla luce. Al termine del caricamento, alla sospensione cellulare vengono aggiunti ioni calcio e magnesio (1 mM c.f.) e NaN<sub>3</sub> (100 µM).

Un volume di 50 µl di sospensione cellulare viene quindi trasferito nei pozzetti precedentemente rivestiti con BSA (capitolo ?11) contenenti DHR 2 µM e catalasi (500 U/ml, c.f.). La piastra viene preriscaldata per circa 5 minuti a 37° C inserendola direttamente nello spettrofluorimetro termostato.

Successivamente, nei pozzetti che lo prevedono, vengono aggiunti lo  $ZnCl_2$ , alle concentrazioni prestabilite, e dopo 30 secondi, il PMA (25 ng/ml c.f.).

La lettura della fluorescenza associata ai pozzetti avviene nel lettore di micropiastre in cui sono state precedentemente fissate la lunghezza d'onda di eccitazione (485 nm) e quella di emissione (535 nm). Per ogni piastra, in automatico, vengono eseguiti 20 cicli di lettura alla temperatura di 37° C.

## 6.5 Valutazione dell'attività "scavenger" dello $ZnCl_2$ nei confronti dello ione superossido

### MATERIALI

- Tampone HEPES/ioni
- $ZnCl_2$
- SOD
- Xantina, Sigma.
- Xantina ossidasi, Sigma.
- Moduli di polistirene da 96 pozzetti

### METODO

L'effetto *scavenger* dello  $ZnCl_2$  viene investigato utilizzando il sistema xantina-xantina ossidasi. La generazione dello ione superossido da parte di questo sistema viene misurato valutando lo stato di riduzione del citocromo c (McCord and Fridovich, 1969). Xantina (0.05 mM c.f.), citocromo c (0.02 mM c.f.) e, dove richiesto,  $ZnCl_2$  vengono addizionati all'interno dei pozzetti di micropiastre da 96 pozzetti. La reazione di ossidazione della xantina viene fatta partire aggiungendo la xantina ossidasi (0.004 U/ml c.f.) e portando così il volume di reazione a 150  $\mu$ l totali di tampone HEPES/ioni. Nelle prove che lo prevedono, la miscela di reazione contiene anche SOD (5  $\mu$ g/ml c.f.). Successivamente la piastra così allestita viene incubata a

37° C direttamente all'interno del lettore di micropiastre termostato, e le letture dei campioni vengono effettuate a 550 e 540 nm di lunghezza d'onda.

## ***7. Misurazione del potenziale di membrana***

### ***MATERIALI***

- **Tampone HEPES/ioni**
- **ZnCl<sub>2</sub>**
- **PMA**
- **di-O-C<sub>5</sub>(3)**, 3-3' dipendentiloxarboconina, Invitrogen Ltd. (Paisley, UK).
- **Spettrofotofluorimetro 650-10S** Perkin Elmer, Norwalk, CT.

### ***METODO***

I cambiamenti del potenziale di membrana dei neutrofili vengono misurati attraverso un metodo basato sulla spettrofotometria a fluorescenza, come descritto in letteratura (Seligmann et al., 1980). Il saggio viene eseguito a 37° C in agitazione, mantenendo il campione direttamente all'interno dello strumento di lettura. La sospensione cellulare di neutrofili opportunamente preparata in tampone HEPES/ioni viene dispensata nelle prove ad una concentrazione di  $0.5 \times 10^6$ /ml ed equilibrata con di-O-C<sub>5</sub>(3) 0.5  $\mu$ M c.f. La fluorescenza del campione viene monitorata in continuo alle lunghezze d'onda di 460 nm (eccitazione) e 510 nm (emissione). Una volta che il livello di fluorescenza del campione contenente i neutrofili *resting* è arrivato a *plateau*, lo stimolo (PMA 10 ng/ml c.f.) viene addizionato alla miscela d'incubazione. Lo zinco viene aggiunto 30 secondi prima dell'aggiunta del PMA nei campioni che lo prevedono.

## 8. Misurazione del pH intracellulare

### MATERIALI

- Tampone HEPES/ioni
- ZnCl<sub>2</sub>
- PMA
- BCECF-AM, 2',7'-bis(2carbossietil)-5,6-carbossi-fluoresceina acetosilmetil estere, Invitrogen Ltd. (Paisley, UK).
- NHA, 5-N,N-esametilene amiloride, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).
- Spettrofotofluorimetro 650-10S, Perkin Elmer

### METODO

Le variazioni di pH intracellulare (pH<sub>i</sub>) vengono valutate attraverso misurazioni di spettrofotometria a fluorescenza come descritto in letteratura (Grinstein et al., 1986). Allo scopo i neutrofili, alla concentrazione di 8x10<sup>6</sup>/ml, vengono caricati per 30 minuti a 37° C con la sonda sensibile al pH 2',7'-bis(2carbossietil)-5,6-carbossi-fluoresceina acetosilmetil estere (BCECF-AM), utilizzata ad una concentrazione finale 4 µM. Al termine dell'incubazione le cellule vengono lavate due volte in HEPES per eliminare eventuali residui di sonda e risospese alla concentrazione di 5x10<sup>6</sup>/ml nello stesso medium. Per evitare che la presenza, a livello della plasmamembrana, dell'*antiporter* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> possa contribuire alle variazioni di pH<sub>i</sub>, alla sospensione cellulare così allestita (volume finale 1 ml), contenente 2.5x10<sup>6</sup> cellule, viene aggiunta un'aliquota di 5-N,N-esametilene amiloride (NHA) 1 µM c.f. Dopo 5 minuti di preincubazione a 37° C in agitazione, viene addizionato PMA alla concentrazione finale di 10 ng/ml. Lo zinco viene aggiunto 30 secondi prima dello stimolo ai campioni che lo prevedono. La variazione di fluorescenza del campione così preparato viene seguita e misurata allo spettrofotometro alle lunghezze d'onda opportune (λ<sub>ex</sub> 488 nm; λ<sub>em</sub> 525 nm).

## ***9. Modello animale***

Per studiare gli effetti potenzianti l'attività microbica di neutrofili umani nei confronti di *C. albicans*, in questo lavoro di tesi abbiamo utilizzato come modello della patologia umana una linea di topi CGD, prodotta originariamente dal gruppo di ricerca della Dott.ssa Dinauer mediante silenziamento del gene per la proteina gp91phox, i cosiddetti *gp91phox gene knockout (KO) mice* (Pollock et al., 1995).

La ditta americana Jackson ha fornito i primi animali adulti (3 - 4 mesi di età) da cui iniziare i nostri studi: 2 maschi e 4 femmine gp91phox KO e 2 maschi e 3 femmine C57Black (controllo *wild type*, WT). Gli animali vengono mantenuti in condizioni sterili all'interno di armadi ad areazione ventilata a pressione negativa. Passati circa 15 giorni dall'arrivo degli animali, tempo necessario affinché si abituino al nuovo ambiente, si è proceduto con l'espansione separata delle due colonie. Il successivo mantenimento e gestione delle colonie è stato eseguito personalmente dal nostro gruppo di ricerca circa ogni due giorni. Mangime, acqua, gabbie e lettieri utilizzate per i successivi cambi sono mantenuti e manipolati in condizioni sterili sotto opportune cappe da laboratorio.

## ***10. Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofili murini da peritoneo***

### ***MATERIALI***

- **PBS**
- **Soluzione anticoagulante** Na<sub>4</sub>•EDTA 40 mM in PBS.
- **Caseina:** soluzione all' 1% in 4 ml di soluzione fisiologica sterile, pH 7.4
- **BSA**
- **Tampone HEPES**
- **Tampone HEPES/BSA**
- **Tampone HEPES/EDTA**

- **Soluzione ipotonica**
- **Soluzione ipertonica**
- **Percoll**

## **METODO**

Il lavaggio peritoneale post-flogosi è una delle tecniche più comunemente utilizzate per ottenere una popolazione di neutrofili murini. Per ottenere ciò, una soluzione di caseina all'1% viene iniettata nel peritoneo (IP) dell'animale al fine di indurre un'inflammatione locale peritoneale e richiamare così in loco la maggior quantità possibile di neutrofili. Dopo circa 3 ore d'incubazione, l'animale trattato viene sacrificato e si procede con il lavaggio del peritoneo mediante PBS freddo. Le cellule raccolte vengono poi lavate in tampone HEPES/BSA tramite centrifugazione per 7 minuti a 250 x g e il fondello ottenuto risospeso nello stesso tampone. La concentrazione di neutrofili viene determinata utilizzando un contatore elettronico di particelle (Coulter Counter, modello ZBI, Coulter Electronics, LTD, Luton, BEDS, U.K.), o al microscopio ottico utilizzando un emocitometro (camera Bürker, Precicolor HBG, Germania).

## ***11. Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofili murini da sangue venoso periferico***

### **MATERIALI**

- **PBS**
- **Soluzione anticoagulante:** Eparina 20/U ml in tampone HEPES
- **BSA**
- **Tampone HEPES**
- **Tampone HEPES/BSA**
- **Soluzione ipotonica**
- **Soluzione ipertonica**
- **Percoll**

- **Ficoll-paque** soluzione, densità 1.77 g/ml a 20° C, Pharmacia, Upsala, Sweden.
- **Dextrano**, 4.5% in soluzione fisiologica al 0.9%, Sigma.

## **METODO**

Al fine di poter disporre di PMN non infiammatori (più simili, quindi, a quelli umani da noi comunemente utilizzati) questi vengono isolati da sangue venoso periferico in base al metodo descritto da Metcalf et al. utilizzato per isolare PMN umani (capitolo 1 di Materiali e Metodi) applicato con opportune modifiche.

Il sangue viene prelevato goccia a goccia da un foro praticato sulla guancia del topo e raccolto in provette pulite contenenti eparina 20 U/ml c.f. e successivamente stratificato su gradiente di densità. Al fine di ottimizzare l'isolamento dei neutrofili, sono state testate quattro diverse combinazioni di gradienti di densità: Ficoll-paque/Dextrano e Dextrano/Ficoll-paque; Percoll 61.5%/dextrano e dextrano/Percoll 61.5%, al fine di ottimizzare l'isolamento dei neutrofili.

Nella prima combinazione, il sangue venoso periferico murino viene stratificato su Ficoll-paque e il tutto centrifugato per 15 minuti a 800 x g, ottenendo un *pellet* a fondo provetta e una diffusione di eritrociti lungo tutto il gradiente, fino alla banda dei linfo/monociti. Una volta isolato, il fondello (~2 ml) ricco di eritrociti e, presumibilmente di neutrofili, viene risospeso in 4 ml di soluzione HEPES/BSA, addizionata di siero e poi miscelato a 1,4 ml di dextrano (polimero del glucosio ad alto peso molecolare e permette la pseudoagglutinazione degli eritrociti per modificazioni della carica elettrica di superficie). Gli eritrociti presenti nella sospensione vengono lasciati così sedimentare per 20 minuti a temperatura ambiente con tappo della provetta aperto. Il soprannatante ottenuto subisce gli stessi passaggi previsti dal protocollo d'isolamento di PMN da sangue venoso periferico umano. Le medesime operazioni vengono ripetute impiegando la combinazione Percoll 61,5%/dextrano.

Per quel che riguarda le altre combinazioni (dextrano/Ficoll-paque e dextrano/Percoll 61,5%), il sangue viene miscelato con dextrano e i globuli rossi lasciati sedimentare a temperatura ambiente per 20 minuti. Un'aliquota del post-dextrano è poi stratificata su Ficoll-paque o su Percoll 61,5% e il tutto viene

centrifugato a 800 x g per 15 minuti. Il *pellet* ottenuto viene quindi trattato con lo stesso protocollo d'isolamento di PMN isolati da sangue venoso periferico umano.

Anche se la purezza delle popolazioni ottenute si aggira fra il 70% e il 90%, la quantità di cellule recuperate mediante i metodi appena descritti è insufficiente per il loro impiego nelle prove funzionali.

## ***12. Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofili murini da midollo osseo***

### ***MATERIALI***

- **PBS**
- **Soluzione anticoagulante** Na<sub>4</sub>•EDTA 40 mM in PBS.
- **BSA**
- **Tampone HEPES**
- **Tampone HEPES/BSA**
- **Tampone HEPES/EDTA**
- **Soluzione ipotonica**
- **Soluzione ipertonica**
- **Percoll**

### ***METODO***

I leucociti polimorfonucleati vengono isolati da midollo osseo di tibie e femori di topi dell'età di circa due-tre mesi sacrificati opportunamente. Gli espianti in questione vengono ripuliti dai brandelli di carne eventualmente rimasta e le epifisi degli stessi recise utilizzando un bisturi.

Il canale midollare viene lavato più volte con tampone HEPES/EDTA 4 mM c.f. mediante l'impiego di una siringa da insulina e il contenuto viene raccolto in una provetta pulita da 15 ml. La sospensione midollare così ottenuta viene vigorosamente agitata, quindi lasciata riposare alcuni minuti al fine di far sedimentare gli eventuali brandelli di carne ed altre impurità; il supernatante ottenuto viene lavato con

tampone HEPES/EDTA mediante centrifugazione a 800 x g per 7 minuti a 20° C e il fondello ottenuto risospeso in tampone HEPES/EDTA. Successivamente il tutto viene stratificato su Percoll 61.5% e centrifugato a 400 x g per 20 minuti a 20° C.

Si ottiene così una separazione della componente cellulare midollare in base alla densità: la conta differenziale sui citocentrifugati allestiti a questo livello dimostra una presenza preponderante di neutrofili maturi (~90%) nel fondello creatosi dopo centrifugazione, mentre all'interfaccia fra Percoll e HEPES/EDTA si raccolgono linfociti, monociti e numerosi neutrofili immaturi.

Eliminato il supernatante, il pellet di PMN viene risospeso in tampone HEPES/BSA e sottoposto a 7 minuti di lavaggio a 250 x g a temperatura ambiente. Per eliminare gli eritrociti eventualmente presenti, il fondello così ottenuto viene sottoposto ad un rapido trattamento di lisi risospingendolo in 3 parti di soluzione ipotonica. Dopo circa 15 secondi l'isotonicità del mezzo viene ripristinata aggiungendo 7 parti di soluzione ipertonica.

Dopo un ulteriore lavaggio a 250 x g per 7 minuti, a 20° C, il *pellet* viene risospeso in un volume prestabilito di HEPES/BSA. La concentrazione di neutrofili viene determinata utilizzando un contatore elettronico di particelle o al microscopio ottico utilizzando un emocitometro (camera Bürker); la sospensione cellulare viene quindi diluita in HEPES/BSA alla concentrazione desiderata.

### ***13. NBT in sospensione su sangue venoso periferico murino***

#### ***MATERIALI***

- PBS
- Tampone HEPES/BSA
- Acqua distillata apirogena (Laboratori Diaco Biomedicali S.p.a.), pH 4.5 - 6.5.
- NBT, Nitroblue di Tetrazolio, polvere (Sigma).
- DPI, Difenilene Iodonio Cloruro, 1mM in DMSO, Sigma.
- PMA

- **Safranina:** soluzione allo 0,4 % in 25% etanolo, (Sigma).

## **METODO**

L'NBT test è un saggio qualitativo che permette di rilevare la produzione di anione superossido da parte dei fagociti opportunamente stimolati (Baehner RL et al., 1968). Questo saggio può essere eseguito sia su sangue intero che sui neutrofili isolati.

Si prelevano, mediante pipetta, circa 25 µl di sangue direttamente da un forellino praticato sulla guancia del topo, bucando la parte interessata con un ago sottile. Per eliminare l'interferenza degli eritrociti, il sangue prelevato viene subito trasferito in una provetta tipo Eppendorf da 1,5 ml contenente 875 µl di acqua apirogena, la quale viene agitata manualmente per 30 secondi affinché i globuli rossi si lisino; si aggiungono quindi 100 µl di PBS 10 volte concentrato per ripristinare l'osmolarità fisiologica. Ciascun campione viene centrifugato per 2 minuti a 400 x g e il supernatante viene aspirato prestando attenzione a non perturbare il piccolo fondello creatosi sul fondo della provetta. Quest'ultimo viene risospeso in 1,5 ml di tampone HEPES/BSA. Nel caso il fondello risultasse ancora rosso per la presenza di globuli rossi, un'ulteriore lavaggio viene effettuato in tampone HEPES/BSA centrifugando quindi il campione a 200 x g per 5 minuti. Il pellet ottenuto viene agitato a secco per qualche secondo quindi risospeso in 230 µl di soluzione NBT 1 mM c.f. o NBT 1 mM c.f./DPI 5 µM c.f., a seconda delle necessità, e incubato a 37° C per 5 minuti a 1000 rpm (Thermomixer). Successivamente, nelle prove che lo prevedono, vengono addizionati 20 µl di PMA 150 ng/ml c.f. e le popolazioni sono incubate a 37° C per ulteriori 20 minuti.

Allestiti i rispettivi citocentrifugati (vedi capitolo 2), i campioni vengono colorati immergendo ciascun vetrino in una soluzione di safranina per circa 10 minuti, quindi osservati al microscopio ottico: i neutrofili normali sono caratterizzati dalla presenza di precipitati blu scuro a livello citoplasmatico: il nitroblu di tetrazolio, infatti, in presenza di superossido, è ridotto a sali di formazano, di color blu scuro-viola; PMN di topi CGD o e in quelli normali trattati con l'inibitore della NADPH ossidasi, DPI, sono negativi al test.

## 14. Preparazione di *Candida albicans*

### MATERIALI

- **Tampone HEPES**
- **Tampone HEPES/ioni**
- *Candida albicans*, isolato ospedaliero da tampone vaginale, gentilmente fornito dalla clinica pediatrica dell'IRCCS "Burlo Garofolo" di Trieste.
- **Sabouraud Dextrose Broth** disidratato: neopeptone 10 g/l, destrosio 20 g/l; pH finale  $5.6 \pm 0.2$  (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**, forniti dall'Ospedale Maggiore di Trieste.
- **Soluzione fisiologica**: NaCl 0.9% in acqua distillata sterile (Laboratori Diaco Biomedicali).

### METODO

Un'aliquota di 50 µl di blastospore di *C. albicans*, conservata a - 80° C, viene scongelata, trasferita in una *flask* contenente 10 ml di terreno Sabouraud liquido sterile e fatta crescere staticamente *over night* (circa 18 ore) a 30° C in una stufa termostata. Allo scopo di eliminare i residui di terreno, la brodocoltura subisce poi un lavaggio in soluzione fisiologica, mediante centrifugazione per 7 minuti a 2000 x g. Il fondello così ottenuto viene risospeso in 1.5 ml di soluzione fisiologica e trasferito in una provetta tipo Eppendorf; segue un'ulteriore lavaggio di 10 secondi a 12000 x g e la risospensione in un volume noto di HEPES/BSA.

La concentrazione delle blastospore viene determinata mediante conta microscopica in camera Bürker. La sospensione, diluita alla concentrazione desiderata in HEPES/ioni, viene quindi opsonizzata mediante incubazione con *pool* di sieri umani al 10% per 30 minuti a 37° C, in agitazione. Al termine dell'opsonizzazione, la sospensione viene mantenuta a temperatura ambiente fino all'utilizzo nei saggi funzionali.

## 15. Valutazione dell'attività microbica

### MATERIALI

- **Tampone HEPES**
- **Tampone HEPES/ioni**
- **Sabouraud Dextrose-Agar:** terreno Sabouraud Dextrose Broth contenente agar (Bacto™ Agar, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) all'1%.
- **Soluzione fisiologica**
- **DPI**
- **Clorochina:** clorochina sale difosfato (Sigma), 10 mM in acqua distillata.
- **Amantadina:** amantadina idrocloruro (Sigma), 10 mM in acqua distillata.
- **Acqua pH 11:** acqua apirogena portata a pH 11 con una soluzione di NaOH 1M.
- **Piastre Petri sterili** del diametro di 8 cm (Sterilin).

### METODO

Prima dell'uso, alla sospensione di neutrofilii in HEPES/BSA vengono aggiunti  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2$  alla concentrazione finale di 1 mM. I PMN, alla concentrazione di  $16 \times 10^6/\text{ml}$ , vengono ripartiti in aliquote di 75  $\mu\text{l}$  in provette di tipo Eppendorf (volume finale di 0.15 ml) e preincubati per circa 30 minuti a 37 °C a 1000 rpm in un agitatore termostato (Thermomixer Comfort, Eppendorf), in presenza o meno di 25  $\mu\text{l}$  di soluzioni stock di clorochina o amantadina diluite per ottenere le concentrazioni finali prestabilite. Trascorsi i primi 20 minuti di incubazione, si procede con l'aggiunta di DPI (c.f. 5  $\mu\text{M}$ ) nelle prove che prevedono l'utilizzo di questo inibitore. Al termine della preincubazione, ad ogni provetta vengono aggiunti 25  $\mu\text{l}$  di una sospensione di blastospore di *C. albicans* opsonizzate a  $48 \times 10^6/\text{ml}$ , in modo che il rapporto candida/PMN sia di 1:1. Contemporaneamente è allestita una prova in cui la sospensione di blastospore è incubata in assenza di neutrofilii: questa subirà i medesimi trattamenti delle prove relative all'analisi dell'attività microbica e servirà per avere una stima dell'andamento della crescita dei microrganismi durante il saggio.

Immediatamente dopo l'aggiunta delle candide, le provette vengono brevemente agitate; da ognuna vengono prelevate due aliquote di 50 µl: un'aliquota viene diluita in una provetta contenente 2.45 ml di acqua a pH 11 e servirà poi per stabilire l'esatto numero di blastospore vive presenti inizialmente in ciascuna prova di fagocitosi ("tempo 0" di fagocitosi). Dopo 5 minuti a temperatura ambiente, questa provetta viene quindi vigorosamente agitata e 50 µl della sospensione diluiti ulteriormente in 3.95 ml di soluzione fisiologica.

L'altra aliquota viene invece dispensata in una provetta vuota, poi incubata per 30 minuti a 37° C in agitazione nel Thermomixer. Allo scadere della mezz'ora, la sospensione viene diluita con 2.45 ml di acqua a pH 11. Il trattamento con acqua a pH 11 determina la lisi dei neutrofili e la liberazione dei microrganismi fagocitati: questo procedimento non ha alcun effetto sulla vitalità di *C. albicans* (Decleva et al. 2006). Dopo 5 min a temperatura ambiente i campioni diluiti in acqua pH 11 vengono vigorosamente agitati e la sospensione ulteriormente diluita in soluzione fisiologica in modo che la concentrazione delle candide sia di  $2 \times 10^3$ /ml. Tutti i campioni così diluiti vengono poi conservati a temperatura ambiente fino al momento della semina nelle piastre Petri. Tale operazione viene effettuata diluendo 100 µl di ciascuna sospensione in circa 10 µl di terreno Sabouraud mantenuto liquido alla temperatura di 42° C e versando poi la miscela all'interno della Petri. Per favorire una omogenea distribuzione dei microrganismi, le piastre vengono agitate manualmente per qualche secondo; ciascuna semina viene condotta in duplicato. Le piastre così preparate vengono mantenute a 30° C per circa 48 ore, al termine delle quali si procede con la conta delle colonie cresciute su ciascuna piastra, confrontando le UFC (Unità Formanti Colonia) delle varie condizioni sperimentali con i rispettivi tempi zero di fagocitosi. L'attività microbica viene espressa in termini di percentuale di sopravvivenza delle candide e viene valutata in base alla formula:

$$(n^\circ \text{ di colonie al tempo } t' / n^\circ \text{ di colonie al tempo } 0) \times 100$$

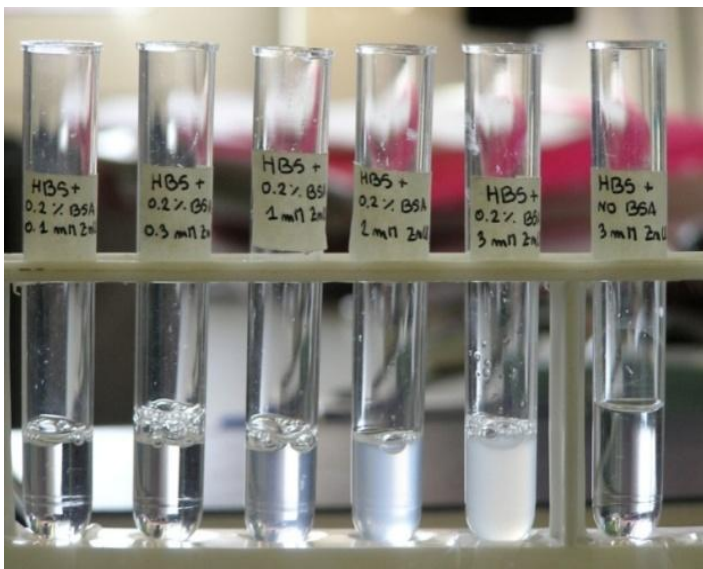
## ***16. Analisi statistica***

La significatività statistica dei dati ottenuti viene valutata mediante l'utilizzo del test *t di Student* e calcolata attraverso il programma GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Il valore probabilistico  $p < 0.05$  viene considerato significativo.

# *RISULTATI - parte I*

## 1. Risultati preliminari

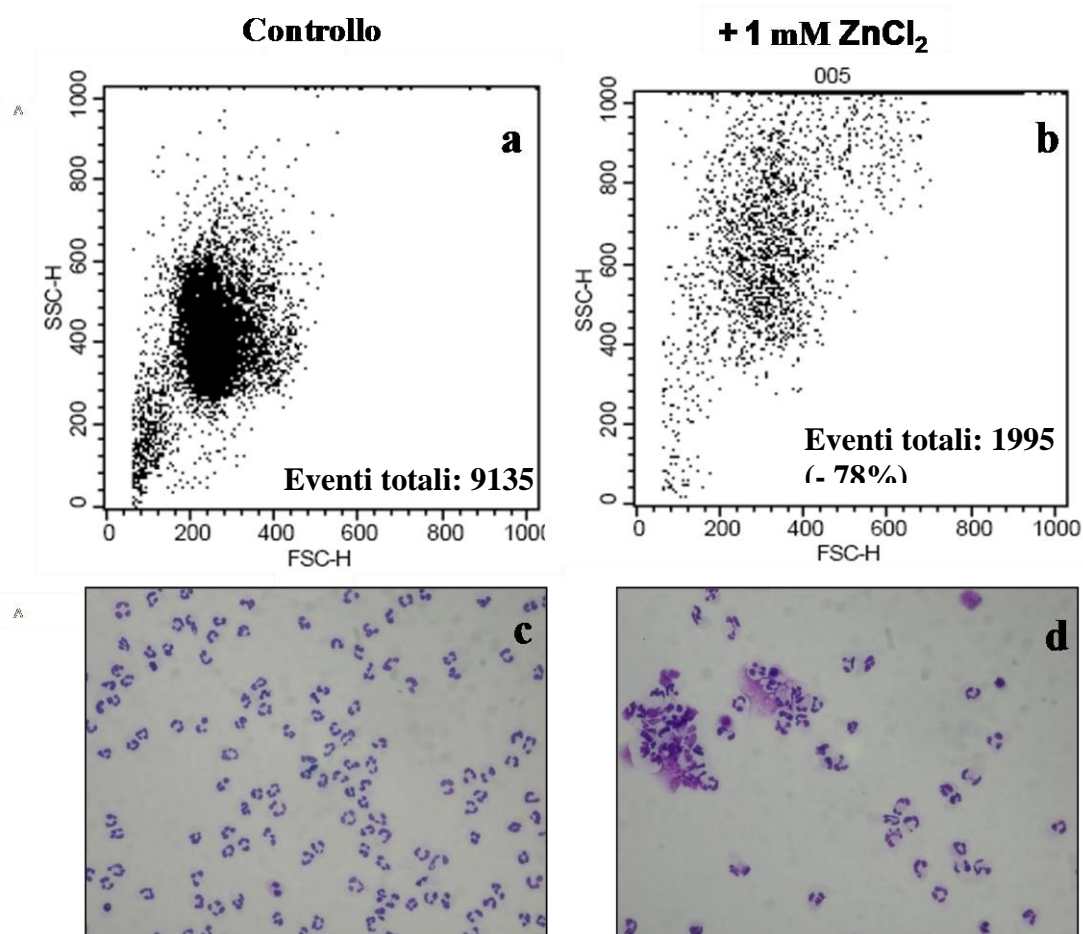
Durante la messa a punto dei saggi per testare l'effetto dello  $ZnCl_2$  sul *burst* respiratorio abbiamo notato che, in presenza di  $ZnCl_2$  1mM, nel mezzo da noi abitualmente utilizzato per risospendere ed incubare le cellule (HEPES/BSA), si formava un flocculato che diventava più evidente all'aumentare della concentrazione dello  $Zn^{2+}$  e dipendeva dalla presenza di BSA (Figura 6). Questa evidenza, confermata da dati di letteratura che dimostrano come lo zinco sia in grado di provocare la precipitazione di diverse proteine (Giroux at al., 1972; Zaworski at al., 1988; Yang TH at al., 2000), rappresentava un problema: per ottenere un livello di depolarizzazione tale da inibire il *burst* sembrano infatti necessarie concentrazioni di zinco nell'ordine del millimolare (DeCoursey at al., 2003). Per evitare la formazione di complessi  $Zn^{2+}$ /proteina abbiamo quindi deciso di omettere l'aggiunta di BSA al mezzo di incubazione in tutti gli esperimenti con lo  $ZnCl_2$ .



**Figura 6. Lo zinco provoca la precipitazione di BSA nel medium.** I campioni, contenenti HEPES con o senza BSA 0.2% e concentrazioni crescenti di  $ZnCl_2$  (0.1, 0.3, 1, 2 e 3 mM), sono stati portati a 37° C per 10 minuti. In presenza di zinco, nelle provette si forma un flocculato che, a partire da 0.3 mM  $ZnCl_2$ , diventa sempre più evidente. Nel campione privo di BSA e in presenza di  $ZnCl_2$  0.3 mM la soluzione è perfettamente limpida.

Inizialmente abbiamo cercato di valutare l'effetto dello zinco sul metabolismo ossidativo dei neutrofili in sospensione, utilizzando la citofluorimetria a flusso; ci siamo però subito accorti che lo  $ZnCl_2$  provoca aggregazione cellulare già alla concentrazione di 1 mM (figura 7). Infatti, in presenza di zinco si osserva una

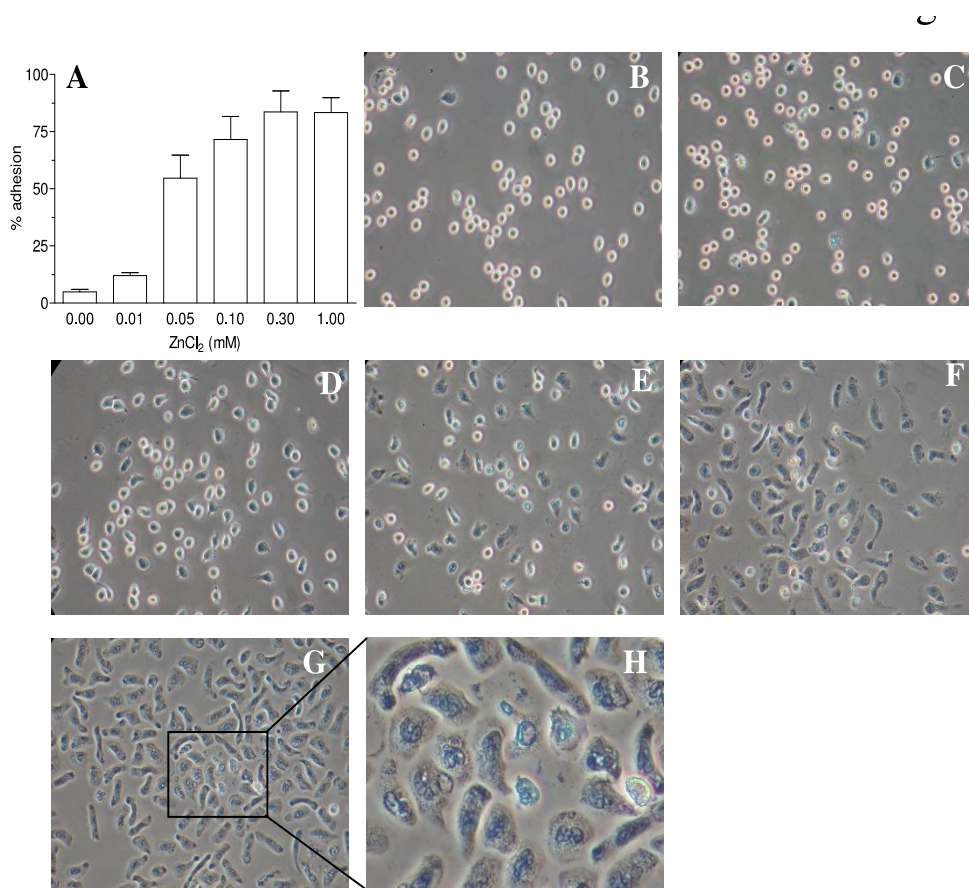
marcata diminuzione della densità degli eventi totali (- 78% rispetto al controllo) accompagnata da un sensibile aumento del numero di eventi con elevata complessità e dimensioni; questi ultimi, come ci hanno confermato le successive osservazioni al microscopio ottico (figura 7 d), rappresentano gli aggregati cellulari che si formano per effetto dello zinco ma quasi del tutto assenti nelle popolazioni di controllo.



**Figura 7. Lo zinco causa aggregazione dei neutrofilo in sospensione.** (a) e (b): analisi citofluorimetrica di sospensioni di neutrofilo ( $4 \times 10^6$ /ml in tampone HEPES/ioni) incubate per 30 minuti a  $37^\circ \text{C}$  in assenza (a) e in presenza (b) di  $\text{ZnCl}_2$  1 mM. La presenza dello zinco causa aggregazione cellulare e una conseguente diminuzione del 78% degli eventi rispetto al controllo. (c) e (d): immagini al microscopio ottico dei citocentrifugati ottenuti dalle medesime popolazioni cellulari.

Abbandonato questo modello in sospensione, nel passaggio al modello di valutazione del *burst* in adesione, abbiamo creduto opportuno verificare subito

l'effetto dello zinco sull'adesione cellulare: il fatto che questo catione sia in grado di indurre l'aggregazione dei neutrofili in sospensione è infatti segno della capacità dello zinco di promuovere, in qualche modo, le interazioni adesive delle cellule. La figura 8 A mostra che lo zinco, in effetti, stimola l'adesione dei neutrofili al substrato in maniera dose-dipendente, con una risposta massima alla concentrazione di 0.1 - 0.3 mM. Le osservazioni da noi effettuate al microscopio a contrasto di fase confermano questi dati evidenziando come, a partire dalla concentrazione di 0.3 mM, i neutrofili trattati con lo zinco si appiattiscano sulla superficie fino ad un marcato *spreading* a 1 mM  $ZnCl_2$  (Figura 8 E, F, G).



**Figura 8. Effetto dello zinco sull'adesione dei neutrofili.** (A) Adesione di neutrofili ( $0.75 \times 10^6$ /ml in tampone HEPES) su pozzetti rivestiti di BSA valutata come descritto in Materiali e Metodi. Media di quattro esperimenti. Le barrette indicano la deviazione standard. (B-H) Immagini al contrasto di fase di campioni cellulari ( $0.12 \times 10^6$ /ml) fissati in glutaraldeide (0.2% v/v in PBS) di neutrofili di controllo (B) e neutrofili trattati con varie concentrazioni di  $Zn^{2+}$  (C-G) su superfici rivestite di BSA. (b-g)  $\times 400$ , (h)  $\times 1000$ . C, 0.01 mM; D, 0.05 mM; E, 0.1 mM; F, 0.3 mM; G 1 mM  $ZnCl_2$ .

Alla luce di queste osservazioni e per cercare di rendere minimi gli effetti collaterali dello zinco, negli esperimenti successivi abbiamo deciso di utilizzare questo catione a concentrazioni non superiori a 0.3 mM, ma comunque al di sopra di quelle richieste per inibire i canali protonici voltaggio-dipendenti, che sono sensibili a concentrazioni di zinco nell'ordine del micromolare e manifestano, negli eosinofili, una significativa inibizione dell'attività già a 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (DeCoursey, Cherny, 1993; Ramsey et al., 2006).

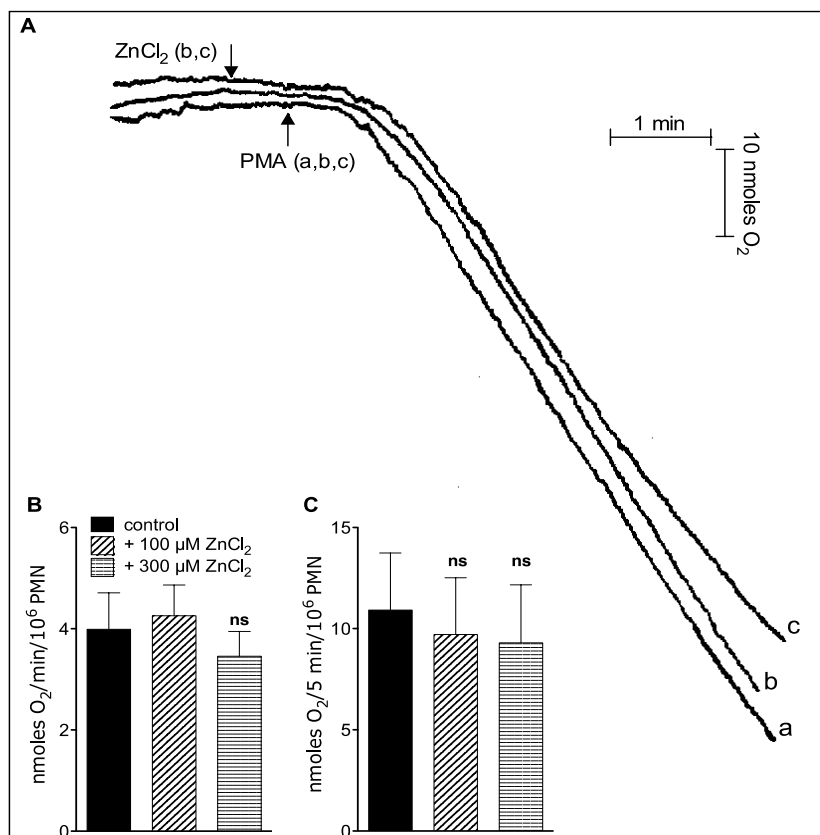
## ***2. Effetto dello $\text{ZnCl}_2$ sul burst respiratorio***

### ***2.1 Effetto dello $\text{ZnCl}_2$ sul burst respiratorio misurato come consumo d'ossigeno***

Il consumo d'ossigeno è considerato da molti la misura più attendibile dell'attività della NADPH ossidasi. Il saggio è stato ottimizzato allo scopo di misurare tutto l'ossigeno utilizzato dall'enzima per la produzione di superossido ed evitare che il consumo reale venga sottovalutato a causa della ri-immissione, nel mezzo extracellulare, di una quota di ossigeno molecolare derivante dall' $\text{O}_2^-$  sfuggito alla riduzione a  $\text{H}_2\text{O}_2$  o dalla degradazione del perossido d'idrogeno da parte degli enzimi intracellulari. Come descritto in letteratura (Dri et al., 1979), ciò è stato ottenuto includendo nel mezzo d'incubazione dei neutrofili sia l'enzima superossido dismutasi (SOD), che permette la rapidissima conversione di tutto l' $\text{O}_2^-$  extracellulare in perossido d'idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), sia la sodio azide ( $\text{NaN}_3$ ), per prevenire la degradazione intracellulare dell' $\text{H}_2\text{O}_2$  via catalasi e mieloperossidasi (MPO).

In figura 9 sono riportati i dati del consumo d'ossigeno misurato con l'elettrodo di Clark (vedi capitolo 6 di Materiali e Metodi) di PMN di controllo. La figura mostra che lo zinco non inibisce in modo apprezzabile il consumo d'ossigeno di neutrofili stimolati con PMA. I dati riassunti nei pannelli B e C della figura 9 confermano che lo  $\text{Zn}^{2+}$  non influisce sul consumo d' $\text{O}_2$  misurato come  $V_{\text{max}}$  o come

*uptake* cumulativo dopo 5 minuti di incubazione, quando più del 40% dell'O<sub>2</sub> disponibile del campione è ormai stato consumato.



**Figura 9. Lo zinco non inibisce il consumo d'ossigeno di neutrofilii stimolati con PMA.** Il consumo d'O<sub>2</sub> è misurato utilizzando l'elettrodo ad ossigeno di Clark a 37° C, in agitazione continua. La sospensione cellulare (3-5x10<sup>6</sup>/ml PMN), in un volume finale di 1 ml, viene equilibrata in tampone HEPES contenente SOD (5 μg/ml) e NaN<sub>3</sub> (100 μM). Una volta registrata la linea base del consumo di O<sub>2</sub>, il *burst* respiratorio viene stimolato aggiungendo PMA 100 ng/ml **A**. Tracce del consumo d'ossigeno registrate con l'elettrodo: **(a)** PMN di controllo, **(b)** + 0.1 mM Zn<sup>2+</sup> e **(c)** + 0.3 mM Zn<sup>2+</sup>. I dati in **B** (V<sub>max</sub>, nmoli O<sub>2</sub> consumati/min) e **C** (nmoli O<sub>2</sub> consumati/in 5 min) riassumono i risultati ottenuti in 5 esperimenti eseguiti in duplicato (media ± s.d.). *ns*: non significativo.

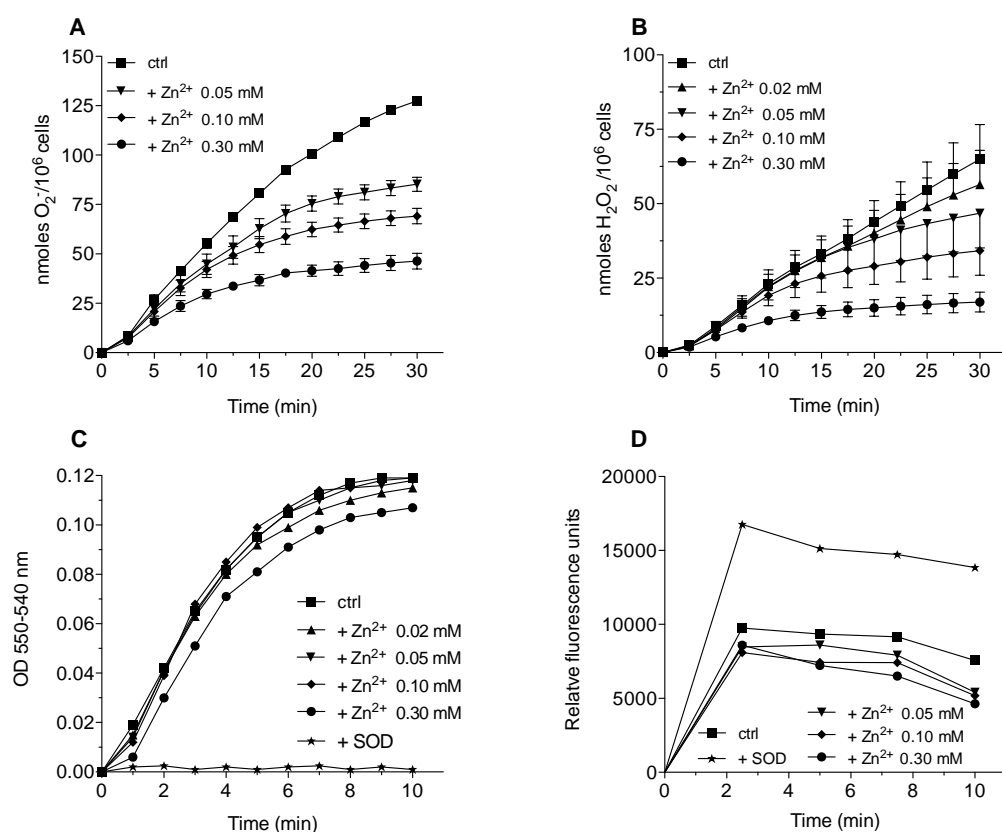
## 2.2 Effetto dello $ZnCl_2$ sulla produzione extracellulare di anione superossido e perossido d'idrogeno

In alternativa al consumo d'ossigeno, un altro approccio ampiamente utilizzato per valutare l'attività della NADPH ossidasi consiste nel misurare la produzione extracellulare di ROS. Abbiamo quindi valutato l'effetto dello zinco sulla produzione di  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  utilizzando, rispettivamente, il saggio di riduzione del citocromo c e il saggio di ossidazione dell'Amplex Red (vedi paragrafi 6.2 e 6.3 di Materiali e Metodi). La Figura 10 A mostra che la produzione di  $O_2^-$  indotta da PMA nei neutrofili in adesione è inibita dallo  $ZnCl_2$  in maniera dose-dipendente: dopo 30 minuti d'incubazione infatti, l'inibizione da 0.05 mM e 0.3 mM  $Zn^{2+}$  era, rispettivamente, del 33% e del 64% circa.

Poiché questi risultati contrastavano nettamente con quelli ottenuti dagli esperimenti di consumo d'ossigeno, pur essendo in linea con quanto riportato in letteratura, abbiamo voluto verificare che l'effetto inibitorio dello  $Zn^{2+}$  non fosse dovuto ad un'interferenza nella riduzione del citocromo c: il catione potrebbe esercitare infatti un effetto "scavenger" sul superossido oppure possedere un'attività "SOD-like" che, facilitando in qualche modo la dismutazione dell'  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , sortirebbe lo stesso risultato. Con opportuni esperimenti di controllo abbiamo escluso però entrambe le possibilità. Utilizzando il sistema enzimatico della xantina/xantina ossidasi per la produzione di  $O_2^-$  (vedi paragrafo 6.5 di Materiali e Metodi) abbiamo dimostrato infatti che lo  $Zn^{2+}$  non ha alcun effetto sulla riduzione del citocromo c fino alla concentrazione di 0.1 mM, mentre a 0.3 mM l'effetto inibitorio è assolutamente modesto (circa 17% d'inibizione a 8 minuti d'incubazione) (figura 10 C) ed insufficiente a giustificare la forte inibizione che si osserva con i neutrofili. Inoltre, la quantità d' $H_2O_2$  generata dallo stesso sistema enzimatico era aumentata dalla presenza della SOD ma non dallo  $Zn^{2+}$  (figura 10 D), escludendo perciò la possibilità di una certa attività "SOD like" di questo catione.

Il saggio dell'Amplex Red è stato eseguito in presenza di SOD, enzima che permette di aumentare la velocità di dismutazione spontanea del superossido facendola passare da  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  (a pH 7.4) a  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  (McCord et al., 1977).

Questo accorgimento è stato adottato per esser certi della completa conversione del superossido prodotto extracellularmente in  $H_2O_2$ : è infatti possibile che, a pH fisiologico e in assenza di SOD, non tutto il superossido dismuti a perossido d'idrogeno; questa ipotesi è sostenuta dall'evidenza che la quantità di  $H_2O_2$  prodotta da neutrofilo attivato da PMA in presenza di SOD è maggiore rispetto a quella prodotta in sua assenza (Rinaldi et al., 2007). Come si nota osservando la figura 10 B, lo zinco inibisce il metabolismo ossidativo indotto da PMA anche quando misurato come produzione d' $H_2O_2$ . Tale inibizione evidenzia una dose-risposta simile a quella osservata nella misura della produzione di anione superossido con il saggio del citocromo c.

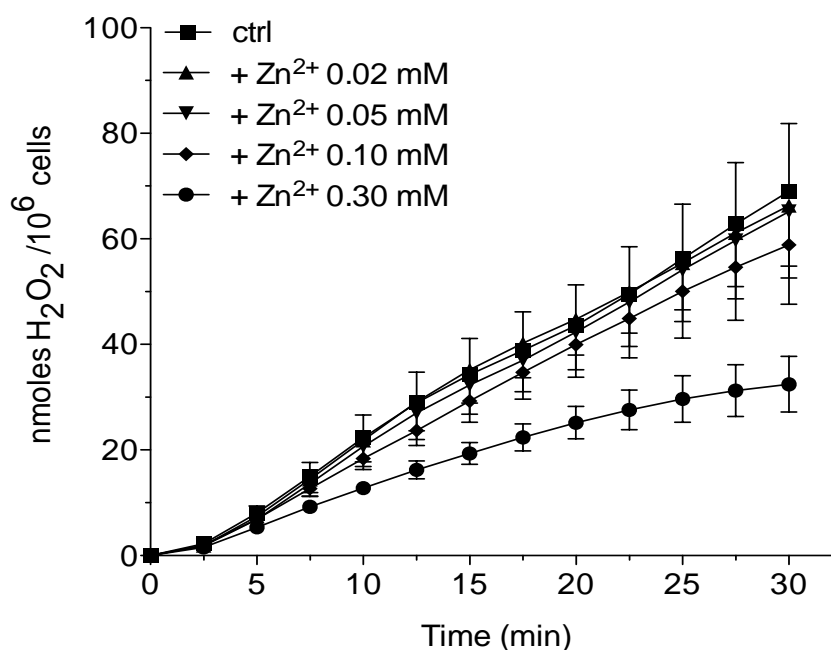


**Figura 10. Inibizione della produzione extracellulare di  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  da parte di  $ZnCl_2$ .** (A) Andamento temporale della produzione di  $O_2^-$  misurata attraverso la riduzione del citocromo c. I PMN (75000/pozzetto, in piastra da 96 pozzetti) vengono incubati a  $37^\circ C$  in presenza di PMA (25 ng/ml c.f.) con l'aggiunta o meno di diverse concentrazioni di  $ZnCl_2$ . (B) Andamento temporale della produzione di  $H_2O_2$  misurato attraverso il saggio dell'Amplex Red, in presenza SOD (5  $\mu g/ml$ ) nel tampone utilizzato. 25000 PMN/pozzetto sono incubati a  $37^\circ C$  in presenza di PMA o PMA e varie concentrazioni di  $ZnCl_2$ . (A-B) Medie di 3-5 esperimenti eseguiti in duplicato. (C) Andamento temporale della produzione di  $O_2^-$  ottenuto attraverso il saggio della xantina-xantina ossidasi misurato come riduzione del citocromo c. (D) Andamento temporale della produzione di  $H_2O_2$  ottenuto attraverso il saggio della xantina-xantina ossidasi misurato come ossidazione della DHR in presenza di HRP. Dati ottenuti da un esperimento eseguito in duplicato, rappresentativo di tre con risultati simili.

### 2.3 Effetto dello $ZnCl_2$ sulla produzione totale di perossido d'idrogeno

I risultati che avevamo ottenuto circa gli effetti dello  $ZnCl_2$  sul *burst* respiratorio erano molto discrepanti: a seconda che si misurasse il consumo di ossigeno o la produzione di ROS extracellulari, sembrava che lo zinco non esercitasse alcun effetto o che, invece, inibisse la risposta ossidativa in maniera significativa e dose-dipendente. Abbiamo allora ipotizzato che, in presenza di zinco, una quota dell'ossigeno consumato dall'NADPH ossidasi venga utilizzata per produrre ROS all'interno delle cellule invece che all'esterno, ROS che così "sfuggirebbero" alla quantizzazione nei sistemi del citocromo c e dell'Amplex Red. In definitiva, nei neutrofili incubati con lo zinco l'attività della NADPH ossidasi rimarrebbe quantitativamente inalterata rispetto al controllo (vedi dati relativi al consumo di ossigeno) ma cambierebbe, in parte, la sede di rilascio dei ROS generati: non solo l'ambiente extracellulare, cioè, ma anche il citoplasma.

Per verificare questa ipotesi abbiamo modificato il saggio dell'Amplex Red in modo tale da renderlo adatto a rilevare non solo la produzione di  $H_2O_2$  extracellulare, ma anche quella eventualmente formata nella cellula e che normalmente sfuggirebbe alla rilevazione perché degradata dagli enzimi intracellulari prima che possa diffondere all'esterno. Abbiamo quindi incluso  $NaN_3$  nel mezzo d'incubazione per prevenire la degradazione di  $H_2O_2$  intracellulare e poter misurare la produzione totale di  $H_2O_2$ , cioè la somma di quella prodotta nel mezzo extracellulare e quella prodotta all'interno delle cellule. In effetti, osservando la figura 11 si nota che nelle medesime condizioni sperimentali in cui, misurando solo la  $H_2O_2$  extracellulare, lo  $Zn^{2+}$  sembra esercitare una forte inibizione del *burst* (figura 10 B), concentrazioni del catione comprese tra 0.02 - 0.1 mM non hanno alcun effetto sulla produzione totale di  $H_2O_2$  indotta da PMA; l'inibizione da  $Zn^{2+}$  0.3 mM invece, è ancora evidente ma meno marcata di quella misurata come  $H_2O_2$  extracellulare (figura 10 B).



**Figura 11. Effetto dello ZnCl<sub>2</sub> sulla produzione totale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Andamento temporale della produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ottenuto utilizzando il saggio dell'Amplex Red come descritto in Materiali e Metodi. SOD (5 µg/ml) e NaN<sub>3</sub> (0.1 mM) sono contenuti nel tampone d'incubazione. Le cellule vengono incubate a 37° C con PMA (25 ng/ml c.f.) in presenza o meno di diverse concentrazioni di zinco, in una piastra da 96 pozzetti. Dati ottenuti dalla media di 4-6 esperimenti in duplicato. Le barre indicano ± s.e.m.

Comparando i dati riportati nelle figure 10 B e 11 si nota che i neutrofili di controllo producono una quantità di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulare (64.9 ± 11.7 s.e.m nmoli/10<sup>6</sup> cellule/30 minuti) simile a quella totale (69.0 ± 12.8 s.e.m nmoli/10<sup>6</sup> cellule/30 minuti), indicando che, in queste cellule, la maggior parte della H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodotta è di origine extracellulare. Invece, nei neutrofili trattati con lo zinco, all'aumentare della concentrazione del catione la quota di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulare diminuisce, pur restando costante la produzione totale, suggerendo che la quota "mancante" di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sia di origine intracellulare.

In accordo con i dati di letteratura, in assenza di compensazione di carica, la NADPH ossidasi porta ad un rapido incremento dell'acidità intracellulare ed alla depolarizzazione della membrana e ciò potrebbe portare ad un progressivo spegnimento dell'ossidasi. I dati di letteratura indicano che il flusso di H<sup>+</sup> attraverso i

canali Hv1, attivato dall'acidificazione citosolica e dalla depolarizzazione, fornisca la maggior parte della compensazione di carica necessaria. La loro inibizione (in presenza dello zinco) o la loro assenza (vedi topi *knockout*) è stata vista essere accompagnata da una sostanziale diminuzione della produzione di  $O_2^-$  (misurata come riduzione del citocromo c piuttosto che attraverso saggi di chemiluminescenza per la misura del superossido) e della produzione di perossido d'idrogeno, misurata utilizzando il saggio dell'Amplex Red. Questi saggi misurano solo la produzione di radicali dell'ossigeno (ROS) prodotti esternamente alla cellula. Infatti, la produzione intracellulare di ROS non viene misurata utilizzando questi metodi di misura.

Abbiamo ipotizzato che, in assenza della compensazione di carica data dai canali protonici voltaggio-dipendenti, quando il potenziale transmembrana raggiunge alti valori di positività, l' $O_2^-$  generato dal flavocitocromo b della NADPH ossidasi inserito a membrana, potrebbe venire rilasciato all'interno della cellula contribuendo in tal modo ad attenuare la depolarizzazione. In questo modo l' $O_2^-$  contribuirebbe a neutralizzare l'eccesso di acidità intracellulare mantenendo il potenziale di membrana all'interno dei limiti compatibili con la funzionalità dell'ossidasi stessa. Questa ipotesi da noi formulata potrebbe spiegare perché lo zinco vada ad inibire il *burst* respiratorio cellulare quando misurato come produzione di ROS extracellulari, (figura 10 A, B), e sia senza effetto quando il *burst* è misurato come consumo d' $O_2$  o come produzione totale di perossido di idrogeno (figure 9 e 11).

Se la nostra ipotesi fosse corretta, ci aspetteremmo che la generazione intracellulare di  $H_2O_2$  sia maggiore in presenza di zinco in quanto la sua presenza causerebbe un rilascio di  $O_2^-$  verso l'interno della cellula, che andrebbe a compensare l'eccessiva depolarizzazione di membrana. Una prima stima dell' $H_2O_2$  intracellulare prodotta dai neutrofili in presenza di zinco è stata fatta applicando un semplice calcolo ai dati ottenuti nel saggio dell'Amplex Red in assenza ed in presenza di  $NaN_3$ : sottraendo l' $H_2O_2$  extracellulare (misurata in presenza di SOD) a quella totale (misurata in presenza di SOD e  $NaN_3$ ) abbiamo ottenuto i dati riassunti nella tabella 2, che evidenzia come, rispetto ai neutrofili di controllo, nelle cellule trattate con lo zinco la percentuale di  $H_2O_2$  prodotta a livello intracellulare, rispetto a quella

generata come H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> totale, aumenta proporzionalmente con l'aumentare della concentrazione di ZnCl<sub>2</sub>.

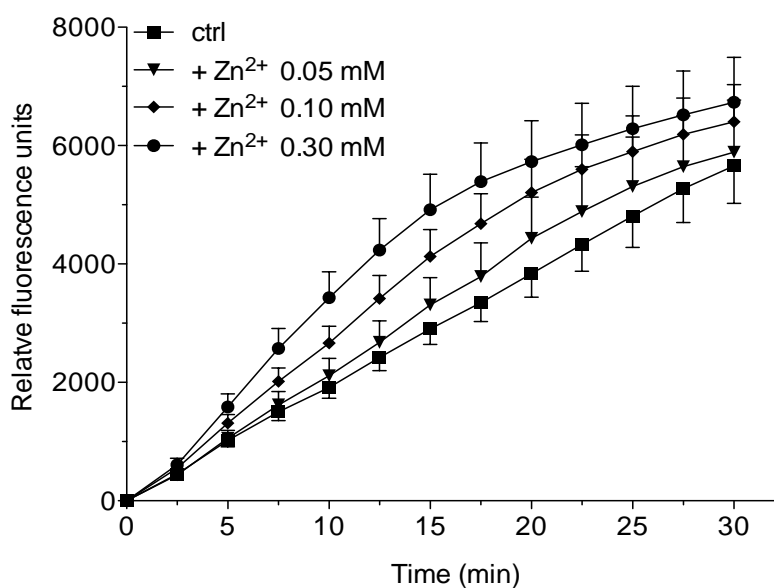
ZnCl <sub>2</sub> (mM)	Intracellular H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>a</sup> (nmoles/10 <sup>6</sup> cells)
-	4.3 ± 2.5 (6.0) <sup>b</sup>
0.02	9.8 ± 2.8** (14.8)
0.05	18.4 ± 4.9** (28.2)
0.1	24.7 ± 4.0** (42.0)

**Tabella 2. Lo ZnCl<sub>2</sub> aumenta la generazione intracellulare di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** <sup>a</sup> La produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata ottenuta mediante il saggio dell'Amplex Red. Sono stati analizzati due paralleli *sets* di campioni per ogni condizione, uno contenente SOD (5 µg/ml) e l'altro SOD + NaN<sub>3</sub> (0.1 mM). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulare è stata calcolata sottraendo quella misurata in presenza di SOD (extracellulare) da quella misurata in presenza di SOD + NaN<sub>3</sub> (totale, intra + extracellulare) dopo 30 minuti d'incubazione a 37° C con PMA 25 ng/ml c.f. <sup>b</sup> In parentesi i dati espressi come percentuale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> totale. Dati ottenuti dalla media ± s.e.m. di 5 esperimenti eseguiti in duplicato. \*\* p < 0.01.

## 2.4 *L'inibizione dei canali Hv1 aumenta la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulare*

A conferma dei dati ottenuti con il saggio di ossidazione dell'Amplex Red, la produzione intracellulare di ROS è stata misurata mediante il saggio di ossidazione della diidrorodamina (DHR). La diidrorodamina (DHR) è una molecola non fluorescente in grado di oltrepassare le membrane cellulari che, dopo ossidazione da parte dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, viene convertita in rodamina 123 (Rh123), un catione lipofilo fluorescente che si accumula nei granuli dei neutrofili e la cui fluorescenza non è alterata dal pH (Emaus et al., 1986). L'accumulo intracellulare della Rh123 non implica necessariamente che l'ossidazione della DHR sia stata causata dalla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodotta intracellularmente. Il perossido d'idrogeno prodotto all'esterno della cellula

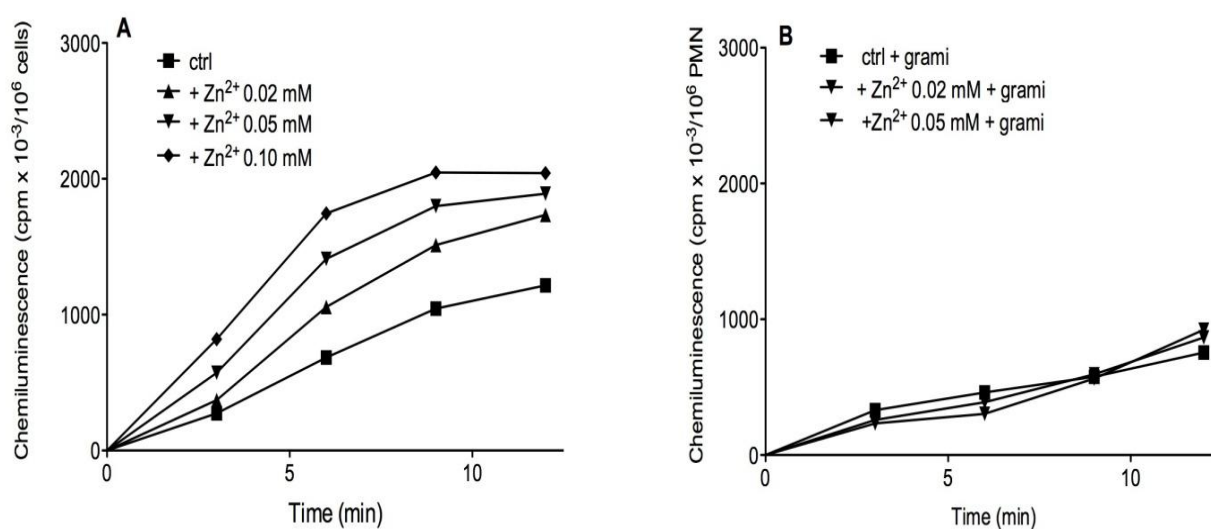
potrebbe infatti diffondere all'interno del neutrofilo attraversando la membrana plasmatica. Per escludere questa possibilità ed effettuare quindi una valutazione attendibile della produzione intracellulare di  $H_2O_2$ , i campioni testati sono stati incubati con DHR e PMA in presenza di catalasi (Henderson et al., 1993; Rinaldi et al., 2007; Mauch et al., 2007): in questo modo l' $H_2O_2$  prodotta extracellularmente sarebbe stata esclusa dal sistema di rilevazione. La figura 12 evidenzia come, in presenza di zinco, la produzione di perossido d'idrogeno intracellulare indotta da PMA aumenta in maniera dose dipendente.



**Figura 12. Aumento della produzione intracellulare di  $H_2O_2$  da parte dello  $ZnCl_2$ .** Cinetica della produzione intracellulare di  $H_2O_2$  è misurato utilizzando il saggio della DHR in presenza di catalasi (500 U/ml c.f.). Il PMA è stato usato alla concentrazione finale di 25 ng/ml. Dati di 4 esperimenti in duplicato. Le barre indicano  $\pm$  s.e.m. La significatività calcolata con il test *t* di Student considerando l'area sottesa dalla curva rispettiva (AUCs). ▼,  $p < 0.03$ ; ◆●,  $p < 0.003$ .

I risultati ottenuti mediante il saggio della DHR sono stati successivamente suffragati da esperimenti di chemiluminescenza luminolo-dipendente (Fäldt et al., 1999). La figura 13 A conferma che, anche quando l' $H_2O_2$  viene misurata con un'altra metodica, lo zinco induce un aumento dose-dipendente della produzione di  $H_2O_2$

intracellulare in risposta al PMA. Per dimostrare che questo aumento dipende proprio dall'inibizione dei canali Hv1 da parte dello zinco e non è legato a qualche effetto secondario, abbiamo esposto i neutrofili alla gramicidina, una molecola che causa la formazione di pori trans membrana permeabili a protoni e altri cationi monovalenti: in questo modo, nonostante il blocco degli Hv1 da parte dello zinco, l'efflusso di H<sup>+</sup> secondario all'attività della NADPH ossidasi sarebbe garantito dalla conduttanza artificiale ai protoni generata dalla gramicidina. Come evidenziato nella figura 13 B, la gramicidina reversibilizza l'aumento della chemiluminescenza indotta dallo zinco, dimostrando la relazione causale tra l'aumento della produzione intracellulare di ROS e l'inibizione degli Hv1.

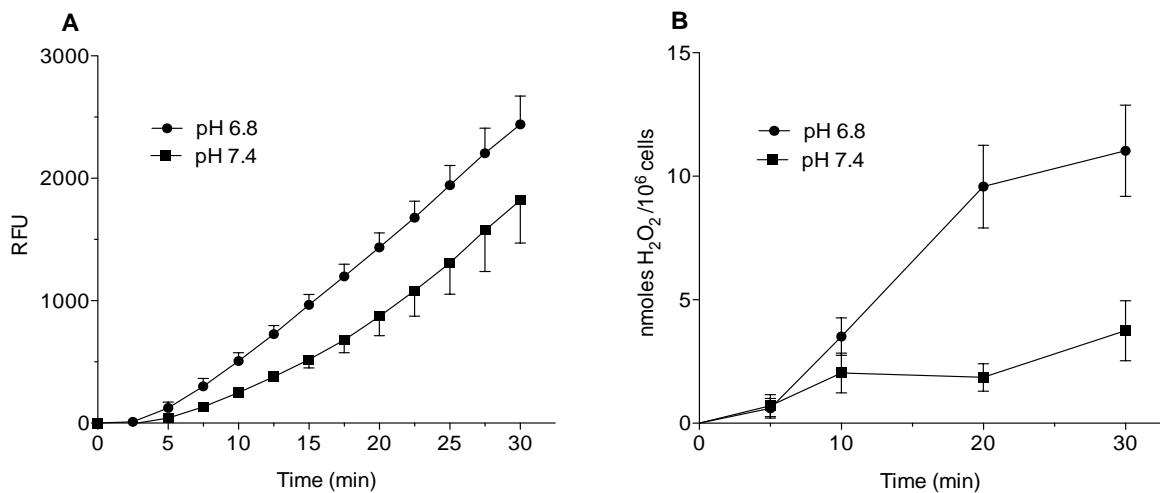


**Figura 13. Reversibilizzazione dell'aumento intracellulare di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causato dallo zinco.** (A) Cinetica della produzione intracellulare di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è misurato utilizzando un saggio di chemiluminescenza luminolo-amplificata in presenza di catalasi (500 U/ml) e SOD (5 µg/ml) in piastre da 96 pozzetti. La sospensione cellulare (1,75 ml finale) contiene 75000 PMN e 75 ml di luminolo. (B) La gramicidina usata a 1 µg/ml e lo zinco vengono aggiunti alla sospensione cellulare 30 secondi prima dell'inizio della reazione. La concentrazione di PMA è di 25 ng/ml. Le letture sono state effettuate a temperatura ambiente utilizzando un contatore (MicroBeta Trilux liquid scintillation counter, Wallac, Turku, Finland). Dati ottenuti da uno di tre esperimenti qualitativamente simili.

## *2.5 La diminuzione del pH extracellulare causa l'aumento della generazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulare*

Dati di letteratura confermano che l'apertura dei canali protonici Hv1 è sensibile al pH (DeCoursey, 2010). E' stato dimostrato, ad esempio, che il potenziale di reversione per le correnti H<sup>+</sup> di neutrofilo attivati da fMLP passa da - 52 mV, con un rapporto pH<sub>o</sub>/pH<sub>i</sub> (pH<sub>o</sub> = pH extracellulare; pH<sub>i</sub> = pH intracellulare) di 8.4/7.4, a + 36 mV, con un rapporto pH<sub>o</sub>/pH<sub>i</sub> di 6.8/7.4 (Schumann et al., 1995). Ciò significa che a pH<sub>o</sub> acido l'efflusso netto di protoni avviene a valori più alti di depolarizzazione di membrana.

Se l'ipotesi di un movimento di O<sub>2</sub><sup>-</sup> lungo il gradiente elettrico da noi sostenuta è corretta, allora c'è ragione di pensare che possa esistere un aumento di produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulare quando il pH<sub>o</sub> è acido. Ciò è stato verificato sia eseguendo esperimenti di ossidazione della DHR per misurare la produzione intracellulare di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nei quali abbiamo dimostrato che la fluorescenza della DHR è più alta a pH<sub>o</sub> acido (Figura 14 A), sia utilizzando il saggio dell'Amplex Red, con il quale abbiamo dimostrato che a pH<sub>o</sub> 6.8 la quota di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulare, calcolata come differenza tra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> totale e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulare, è maggiore che a pH 7.4 (Figura 14 B).

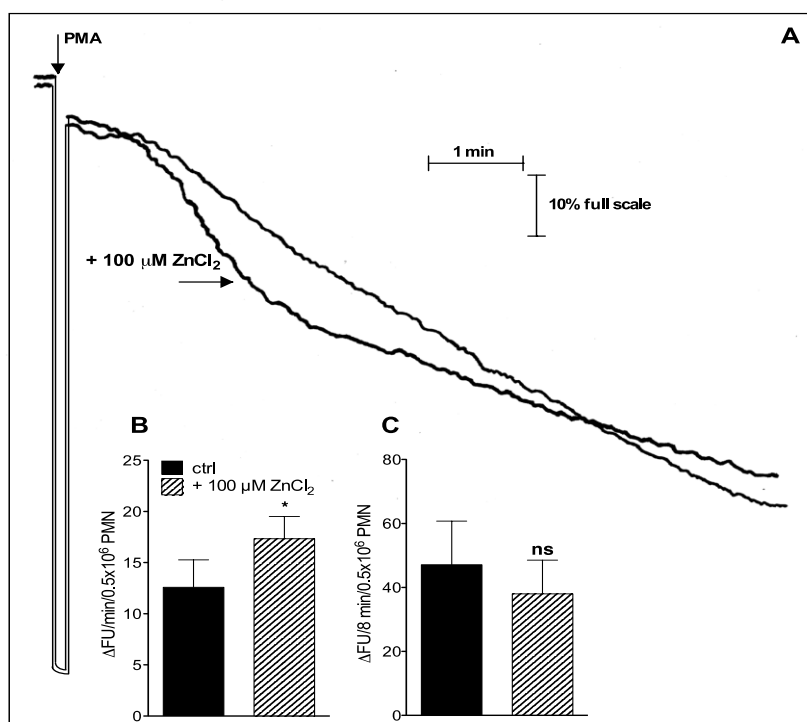


**Figura 14. La diminuzione del pH extracellulare aumenta la generazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulare.** La produzione intracellulare di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata ottenuta attraverso il saggio della DHR (A) e dell'Amplex Red (B) come descritto in Materiali e Metodi. Il pH dei tamponi utilizzati (contenenti 10 mM HEPES) sono stati aggiustati a pH 6.8 e 7.4 utilizzando HCl. (A) Il saggio della DHR è stato eseguito in presenza di catalasi (500 U/ml) e PMA 25 ng/ml c.f. Dati ottenuti da una media  $\pm$  s.e.m. di tre esperimenti eseguiti in duplicato. La significatività dei dati è stata calcolata con il test *t di Student* sulla AUCs con  $p < 0.05$ . (B) Mediante il saggio dell'Amplex Red due paralleli *sets* di campioni per ciascun pH<sub>0</sub> sono stati analizzati: uno contenente SOD (5  $\mu$ g/ml) e l'altro SOD + NaN<sub>3</sub> (0.1 mM). La generazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulare è stata calcolata, ai tempi d'incubazione indicati, sottraendo la quantità di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> misurata in presenza di SOD (extracellulare) da quella misurata in presenza di SOD e NaN<sub>3</sub> (intracellulare + extracellulare). PMA 25 ng/ml c.f.. Dati ottenuti da otto esperimenti in duplicato la cui significatività ( $p < 0.01$ ) è stata ottenuta attraverso il test *t di Student* sulla AUCs.

## 2.6 Effetto dello ZnCl<sub>2</sub> sul potenziale di membrana e sull'acidificazione intracellulare di neutrofili stimolati

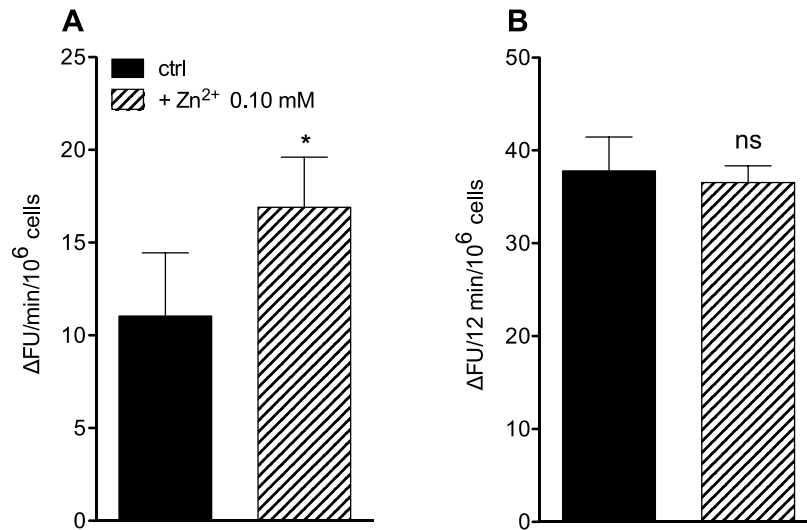
L'effetto dello zinco sui cambiamenti del potenziale di membrana indotti da PMA sono riportati nella Figura 15. Come ci si aspettava, lo zinco 0.1 mM induce un significativo aumento della velocità di depolarizzazione ( $+45,2\% \pm 21.8$ ; media  $\pm$  s.d.;  $n=5$ ,  $p<0.01$ ) (Figura 15 B). Tuttavia, l'entità della depolarizzazione non risultava

influenzata, semmai si è notata una leggera inibizione anche se non significativa ( $82.7\% \pm 17.1$  del controllo; media  $\pm$  s.d.;  $n=5$ , *ns*) (Figura 15 B).



**Figura 15. Effetto dello  $\text{ZnCl}_2$  sul potenziale di membrana di PMN attivati.** (A) Tracce di cambiamento di fluorescenza di di-O-C<sub>5</sub>(3) di PMN attivati. Lo stimolo (PMA 10 ng/ml) viene aggiunto alla sospensione cellulare quando è raggiunto un livello stabile di fluorescenza del composto di-O-C<sub>5</sub>(3). (B) La variazione di fluorescenza ( $\Delta\text{FU}$ ) viene espressa come  $V_{\text{max}}$ . (C)  $\Delta\text{FU}$  dopo 8 minuti dall'aggiunta del PMA. I dati in (B) e (C) sono ottenuti dalla media  $\pm$  s.d. di 8 esperimenti eseguiti in duplicato. \*  $p < 0.02$ ; *ns*: non significativo.

Risultati simili sono stati ottenuti misurando l'acidificazione citosolica. La Figura 16, infatti, mostra che l'inibizione dei canali protonici Hv1 è accompagnata da un significativo aumento della velocità di acidificazione (Figura 16 A) ma non ha effetto sull'entità della risposta (Figura 16 B) confermando quindi che lo zinco incide sulla velocità ma non sull'ampiezza dell'accumulo di cariche positive intracellulari.



**Figura 16. Effetto dello  $ZnCl_2$  sull'acidificazione citosolica di PMN attivati.** PMN ( $8 \times 10^6$ /ml in tampone HEPES) sono caricati per 30 minuti a  $37^\circ C$  con la sonda BCECF-AM ( $4 \mu M$  c.f.), lavati due volte e risospesi alla concentrazione di  $2.5 \times 10^6$ /ml (c.f.) in tampone HEPES contenente NHA ( $1 \mu M$  c.f.). Lo zinco viene aggiunto al campione 30 secondi prima dell'aggiunta dello stimolo (PMA  $10 \text{ ng/ml}$  c.f.), quindi viene registrata la variazione di fluorescenza. **(A)**  $\Delta FU$  è espressa come  $V_{max}$ . **(B)**  $\Delta FU$  dopo 12 minuti di stimolazione. I dati riportati in **(A)** e **(B)** sono ottenuti dalla media  $\pm$  s.d. di tre esperimenti eseguiti in duplicato. \*  $< 0.02$ ; ns: non significativo.

# *DISCUSSIONE – parte I*

L'attivazione della NADPH ossidasi è accompagnata dal trasporto di elettroni attraverso la membrana plasmatica. Questo processo è elettrogenico e richiede che l'eccesso di cariche positive che si accumulano nella cellula venga neutralizzato per prevenire l'eccessiva depolarizzazione di membrana e l'acidificazione del citosol. Studi fluorimetrici e di elettrofisiologia del potenziale di membrana hanno inequivocabilmente dimostrato che i neutrofilo umani esprimono i canali protonici voltaggio dipendenti (Hv1) ed è stato proposto che la maggior parte della compensazione di carica è mediata da un flusso di protoni ( $H^+$ ) (Henderson at al., 1987; Nada at al., 1979; DeCoursey, 2008). La produzione di animali transgenici nei quali è stato silenziato il gene per Hv1, hanno definitivamente provato che questi sono i soli canali protonici presenti nei neutrofilo (Ramsey at al., 2009). E' stato proposto che il flusso di protoni attraverso questi canali sia necessario per mantenere l'attività della NADPH ossidasi (DeCoursey at al., 2003).

Le conclusioni riguardanti il ruolo cruciale dei canali protonici nella modulazione del *burst* respiratorio (RB) nei PMN umani sono basate quasi esclusivamente sui risultati ottenuti utilizzando lo  $Zn^{2+}$ , il più potente inibitore di questi canali (Ramsey at al., 2006; DeCoursey at al., 2003). Comunque dev'essere prestata attenzione nell'utilizzo dello  $Zn^{2+}$  nei tamponi fisiologici. Per esempio, nella scelta dell'agente tamponante, poiché molti di questi legano il catione riducendo così la concentrazione di  $Zn^{2+}$  libero. Con il fosfato, il tampone comunemente più usato, si formano dei complessi insolubili (la costante di solubilità di  $ZnPO_4$  è  $9 \times 10^{-33}$ ). Per queste ragioni è stato utilizzato l'HEPES come tampone poiché è dimostrato che lega scarsamente lo zinco (Collier, 1979). Inoltre lo  $Zn^{2+}$  causa precipitazione di svariate proteine (Giroux at al., 1972; Zaworoski at al., 1988; Yang at al., 2000): abbiamo osservato infatti che lo zinco forma un precipitato con la BSA contenuta nei nostri medium di sospensione cellulare e la quantità dei precipitati aumenta con l'aumentare della concentrazione dello ione (Figura 6). Perciò tutti gli esperimenti sono stati condotti in mezzi privi della componente proteica. Questo suggerisce che i dati di biologia cellulare ottenuti utilizzando lo  $Zn^{2+}$  in tamponi contenenti proteine devono essere interpretati con molta cautela.

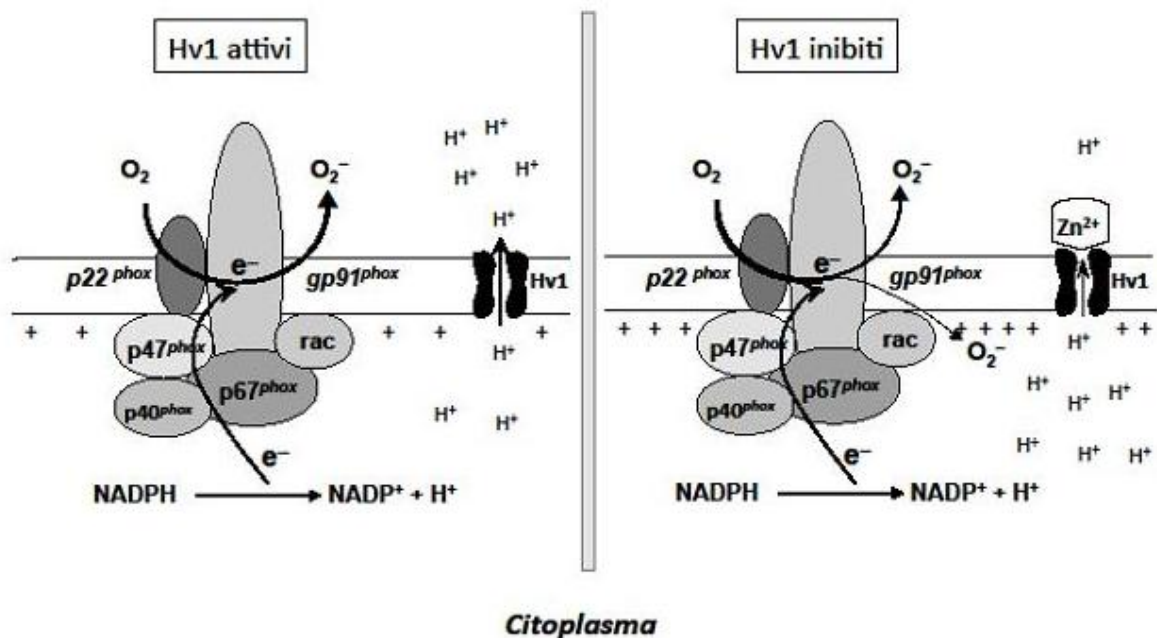
Abbiamo osservato inoltre che l'incubazione dei neutrofili con lo  $Zn^{2+}$  causa una diminuzione del numero delle cellule in sospensione e che questo è dovuto all'adesione (Figura 8) e in parte all'aggregazione cellulare (Figura 7). Lo zinco dimostra così di essere un agente in grado di stimolare l'adesione cellulare dei neutrofil, adesione che risulta associata con lo *spreading* cellulare (Figura 8). Lo studio del/i meccanismo/i alla base dell'induzione dell'adesione da parte dello  $Zn^{2+}$  va oltre allo scopo del presente lavoro, comunque quest'attività è probabilmente legata all'aumento affinità delle  $\beta_2$  integrine per il substrato (San Sebastian et al., 2006) dovuto al legame dello  $Zn^{2+}$  con il sito di coordinazione (Metal-Ion-Dependent Adhesion Site, MIDAS) delle integrine, come è stato per esempio notato con il  $Mn^{2+}$ . In linea con queste osservazioni, si è notato che lo  $Zn^{2+}$  stimola, in maniera  $\beta_2$ -integrina-dipendente, l'adesione di monociti umani della linea U937 (Chavakis et al., 1999).

Negli esperimenti da noi condotti, nei quali viene misurato il RB come consumo d' $O_2$ , abbiamo notato che lo  $Zn^{2+}$ , anche alla concentrazione di 0.3 mM, non inibisce la risposta indotta da PMA, misurata sia come  $V_{max}$  che come consumo totale dopo 5 minuti d'incubazione (Figura 9). Altri autori hanno osservato un effetto inibitorio dello  $Zn^{2+}$  sul RB misurato come consumo di  $O_2$  (Stankova et al., 1976; Chvapil et al., 1977; Yatsuyanagi et al., 1988). E' da notare che questi studi sono stati eseguiti utilizzando stimoli fagocitabili e, negli stessi studi ( Chvapil et al. 1977, Yatsuyanagi et al., 1988) e in nostre osservazioni (dati non mostrati) appare chiaramente che lo  $Zn^{2+}$  è un forte inibitore della fagocitosi. Quindi, la conclusione logica è che l'inibizione del consumo d' $O_2$  osservata in questi studi è secondaria all'inibizione della fagocitosi. I nostri risultati sul consumo d' $O_2$  sono in conflitto con quelli ottenuti misurando l'attività della NADPH ossidasi come produzione di anione superossido ( $O_2^-$ ) (riduzione del citocromo c, chemiluminescenza lucigenina-dipendente e come luminescenza L-012-dipendente) oppure come Amplex Red (produzione di  $H_2O_2$ ) (Femling et al., 2006, Ramsey et al., 2009; Okochy et al., 2009). Infatti, utilizzando questi saggi, è stato dimostrato che lo zinco inibisce il RB di neutrofili umani e murini (DeCoursey et al., 2003; Femling et al., 2006; Ramsey et al., 2009; Okochy et al., 2009; Baginski et al., 1990) e che neutrofili derivanti da topi

Hv1 deficienti, presentano una ridotta produzione di  $O_2^-$  (citocromo c) e  $H_2O_2$  (Amplex Red).

Il consumo di  $O_2$  eseguito in presenza di SOD e  $NaN_3$  (Figura 9), riflette la misura dell' $O_2$  totale ridotto ad  $H_2O_2$  dalla NADPH ossidasi (Dri at al., 1979); la misura della produzione di  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , come visto nei lavori precedenti (Baginski at al., 1990; DeCoursey at al., 2003; Femling at al., 2006; Ramsey at al., 2009; Okochy at al., 2009; El Chemaly at al., 2010) e nelle Figure 10 A e 10 B di questo lavoro, riflette invece la produzione extracellulare di ROS.

La discrepanza tra i risultati dell'effetto dello  $Zn^{2+}$  sul RB misurati come produzione di ROS totali e ROS extracellulari, ci hanno portato a formulare un'ipotesi per armonizzare queste osservazioni. Proponiamo che l'estrema depolarizzazione e l'aumento dell'acidificazione del citosol causato dalla difettosa attività dei canali Hv1, determini un aumento del gradiente elettrochimico che favorirebbe il movimento di parte dell' $O_2^-$  generato dalla NADPH ossidasi associata alla membrana verso l'interno della cellula (Figura 17).



**Figura 17. Canali protonici Hv1 e compensazione di carica nel *burst* respiratorio.** (a): in risposta a stimoli solubili quali il PMA, la NADPH ossidasi si assembla sulla membrana plasmatica. Gli elettroni derivanti dal NADPH citosolico vengono traslocati, per mezzo della NADPH ossidasi, attraverso la membrana plasmatica riducendo l' $O_2$  a  $O_2^-$ . Per ciascun elettrone rimosso dal comparto intracellulare, approssimativamente un protone rimane alle spalle. Ciò comporta una depolarizzazione della membrana e una diminuzione del  $pH_i$ . L'efflusso di  $H^+$  attraverso i canali protonici Hv1 è considerato essere la fonte maggiore di compensazione di carica (27). (b) Noi proponiamo che, in assenza di attività dei canali Hv1, l'estrema depolarizzazione e decremento del  $pH_i$  genera un gradiente elettrochimico tale da dirigere all'interno della cellula l' $O_2^-$  prodotto sulla membrana, contribuendo così alla compensazione di carica e al mantenimento dell'attività della NADPH ossidasi.

La conseguenza netta di questa ipotesi sarebbe triplice:

- 1) diminuzione della produzione extracellulare di ROS accompagnata da un aumento della loro produzione a livello intracellulare;
- 2) contributo al contenimento dell'eccessiva depolarizzazione; preservazione dell'integrità cellulare e dell'attività della NADPH ossidasi.

Il fatto che l'inibizione dei canali Hv1 non modifichi l'attività della NADPH ossidasi è suffragato dall'osservazione che la produzione di  $H_2O_2$  in presenza di SOD e  $NaN_3$ , che riflette la produzione totale di  $H_2O_2$ , non è inibita dallo  $Zn^{2+}$  fino alla concentrazione di 0.1 mM (Figura 11). L'inibizione osservata a 0.3 mM  $Zn^{2+}$ , evidente dopo 5 minuti d'incubazione, potrebbe essere una conseguenza dell'effetto del

catione sull'attività della cellula stessa, quali l'adesione, l'aggregazione cellulare, la fagocitosi (Stankova L at al., 1976; Chvapil at al., 1977; Yatsuyanagi at al., 1987; Morgan at al, 2009) o sulla stabilità della membrana cellulare (Chvapil at al., 1976). Un'indicazione che l'effetto inibitorio residuo di 0.3 mM  $Zn^{2+}$  sulla produzione totale di  $H_2O_2$  dopo 5 minuti d'incubazione sia probabilmente non correlato al suo effetto inibitorio sui canali Hv1, è dato dall'osservazione che la velocità e l'entità della depolarizzazione e acidificazione del citosol indotta da 0.3 mM  $Zn^{2+}$  non sono differenti da quelli indotti da 0.1 mM  $Zn^{2+}$  (Figure 15 e 16). In questo lavoro forniamo alcune prove in supporto del ri-direzionamento di parte dell'  $O_2^-$  prodotto dalla NADPH ossidasi nella membrana cellulare all'interno della cellula, anziché all'esterno, in assenza di compensazione di carica da parte degli Hv1.

1) In presenza di  $Zn^{2+}$  notiamo un aumento della frazione intracellulare di  $H_2O_2$  rispetto alla totale prodotta (Tabella 2);

2) Attraverso il saggio della DHR e della luminescenza amplificata da luminolo abbiamo dimostrato che l'inibizione dei canali protonici Hv1 è accompagnata da un netto aumento della produzione di  $H_2O_2$  intracellulare (Figure 12 e 13). Questa ultima osservazione è suffragata da due studi (Hasegawa H at al., 2000; Baginski, 1990) nei quali il metabolismo ossidativo in presenza di  $Zn^{2+}$  risultava leggermente stimolato quando misurato come produzione intracellulare di ROS (chemiluminescenza luminolo-dipendente) mentre quando misurato come produzione di  $O_2^-$  extracellulare (chemiluminescenza lucigenina-dipendente) risultava inibito. Infine, mantenendo la cellula in un ambiente extracellulare acido che contrasta l'efflusso di  $H^+$  mantenendo di conseguenza alta la depolarizzazione e bassi i valori di pH intracellulare, nuovamente abbiamo rilevato che la produzione di  $H_2O_2$  intracellulare risultava più alta di quella osservata a pH 7.4 (Figura 14 A, B).

L'acidosi extracellulare è una condizione comunemente associata con il processo infiammatorio, dove è stato documentato che il pH extracellulare ( $pH_0$ ) può scendere anche a valori di 6.1 (Edlow at al., 1971; Boots at al., 1922). Se l'attività della NADPH ossidasi fosse controllata solamente dai canali Hv1, allora il ridotto efflusso di  $H^+$  e l'aumento della depolarizzazione di membrana causato dal  $pH_0$  acido dell'essudato infiammatorio, potrebbe causare una diminuzione della produzione di

ROS in una condizione nella quale l'attività battericida è essenziale per sconfiggere le infezioni. La nostra osservazione che a  $pH_0$  acido c'è un aumento dell' $H_2O_2$  intracellulare (Figura 14 A, B) indica che, anche in condizioni sfavorevoli di compensazione di carica attraverso i canali protonici, un aumento della generazione di  $O_2^-$  intracellulare può mantenere la depolarizzazione e l'acidità intracellulare entro valori compatibili con l'attività della NADPH ossidasi. Il ruolo non essenziale degli Hv1 per il mantenimento di un RB e di un'attività microbica ottimale è inoltre supportato dall'osservazione che l'uccisione di *Staphylococcus aureus*, che è totalmente dipendente dall'attivazione del RB (Decleva et al., 2006), risulta normale in topi deficitari di Hv1 (Hv1 *knockouts*) (Ramsey et al., 2009).

Nell'insieme, i risultati presentati in questo lavoro non confermano l'ipotesi che i canali Hv1 siano essenziali per il mantenimento dell'attività della NADPH ossidasi. Ciò suggerisce la possibilità che altri meccanismi potrebbero intervenire per neutralizzare l'aumento di depolarizzazione che inficerebbe il mantenimento dell'attività della NADPH ossidasi. In questo lavoro abbiamo messo in evidenza come, in assenza di flussi protonici, entri in gioco un nuovo e imprevisto meccanismo di compensazione di carica basato sul coinvolgimento dello stesso anione superossido. Questi, dopo essere stato prodotto dalla NADPH ossidasi di membrana si dirigerebbe verso l'interno della cellula per neutralizzare l'eccesso di cariche  $H^+$ , riducendo quindi la depolarizzazione e l'acidificazione citosolica (Figura 17). Altri meccanismi, come flussi del potassio (Reeves et al., 2002) e il trasporto del cloro attraverso specifici canali, sono stati proposti contribuire alla compensazione di carica (Ahluwalia, 2008). In condizioni normali, infatti, è stato stimato che questi flussi contribuiscono per circa il 5 - 7% della compensazione di carica. Quando, tuttavia, i canali protonici sono assenti, come nel caso dei topi Hv1 *knockout*, o inibiti da  $Zn^{2+}$ , è possibile ipotizzare che un aumento dei flussi del potassio e del trasporto del cloro insieme alla produzione intracellulare di  $O_2^-$  da noi proposta, intervengano per compensare la carenza dell'attività dei canali protonici. L'ipotesi che altri meccanismi di compensazione di carica entrino in gioco quando il flusso protonico è bloccato è sostenuta dall'osservazione che l'inibizione dei canali Hv1 non causa un

aumento dell'entità della depolarizzazione di membrana e dell'acidificazione del comparto intracellulare (Figure 15 e 16).

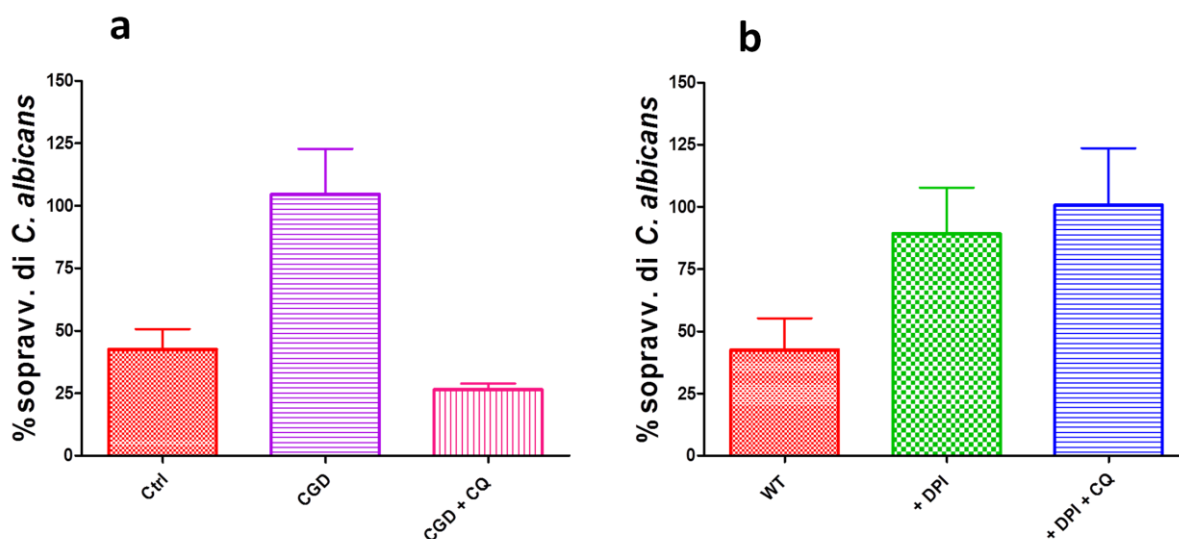
## *RISULTATI - parte II*

# ***1. Scelta del metodo di isolamento dei leucociti polimorfonucleati neutrofili murini***

## ***1.1 Isolamento di neutrofili murini da peritoneo***

Uno dei più comuni metodi per isolare un elevato numero di neutrofili di topo consiste nell'indurre una risposta infiammatoria a livello del peritoneo e nel successivo recupero dei leucociti infiammatori mediante lavaggio peritoneale. Inizialmente abbiamo quindi pensato di utilizzare, per i nostri esperimenti *in vitro*, neutrofili murini ottenuti da lavaggio peritoneale dopo flogosi indotta da caseina, secondo il metodo descritto nel capitolo 10 di Materiali e Metodi. Come emerge dai risultati riportati nella Tabella 3, con questa procedura di isolamento si è ottenuto un discreto recupero di cellule, rappresentate quasi totalmente da leucociti neutrofili.

I PMN così isolati sono stati poi impiegati in alcuni esperimenti preliminari di attività microbica, con i quali si voleva verificare se il comportamento dei neutrofili murini *in vitro* fosse, dal punto di vista qualitativo, paragonabile a quello delle cellule umane. I risultati di queste prove funzionali, espressi come percentuale di sopravvivenza di *C. albicans*, sono riportati nella Figura 18. La parte (a) di quest'ultima mostra come i PMN umani normali, trattati con l'inibitore della NADPH ossidasi difenileneiodonio (DPI), e neutrofili isolati da pazienti CGD, che non sono in grado di uccidere *C. albicans*, acquisiscano attività fungicida dopo il trattamento con cloro china (CQ). Appare evidente che questo risultato non si ripete con i PMN isolati dal peritoneo di topi *wild type* (WT) resi CGD-like dopo trattamento con DPI (Figura 18 b).



**Figura 18: Attività microbica di PMN umani (a) e peritoneali murini (b) nei confronti di *C. albicans*: effetto della cloroquina.** (a) I PMN isolati da soggetti normali (Ctrl) e pazienti CGD ( $8 \times 10^6$ /ml c.f. in tampone HEPES/BSA) venivano incubati per 30 min a  $37^\circ\text{C}$  con blastospore di *C. albicans* ( $8 \times 10^6$ /ml c.f.). Al termine dell'incubazione, dopo lisi in  $\text{H}_2\text{O}$  a pH 11 e successive diluizioni, un'aliquota (in duplicato) di queste diluizioni veniva seminata su agar/Sabouraud per la conta delle CFU. Dove indicato (CGD + CQ), i PMN venivano preincubati per 20 min a  $37^\circ\text{C}$  con CQ  $100 \mu\text{M}$  c. f. (b) L'attività microbica veniva eseguita con le stesse modalità con PMN isolati dal peritoneo di topi normali, mantenuti tali (WT) o resi CGD-like con il trattamento con DPI  $5 \mu\text{M}$  c.f. (+ DPI). Dove indicato (+ DPI + CQ), i PMN CGD-like venivano preincubati per 20 min a  $37^\circ\text{C}$  con CQ  $100 \mu\text{M}$  c. f. Per ulteriori dettagli metodologici vedere capitolo 15 di Materiali e Metodi. La capacità microbica è espressa in % di sopravvivenza di *C. albicans*. I dati riportati sono la media di 3 esperimenti  $\pm$  sem eseguiti in duplicato.

Alla luce di questa discrepanza tra i risultati ottenuti con i neutrofili umani e quelli ottenuti con le cellule di topo, abbiamo ipotizzato che i neutrofili murini isolati dopo induzione di flogosi peritoneale non rappresentino il modello ideale per valutare l'effetto della CQ sull'attività microbica. Questi PMN infatti, essendo di natura infiammatoria, sono verosimilmente già attivati. Poiché l'attivazione induce i neutrofili a degranulare e comporta una serie di variazioni di pH citoplasmatico e lisosomiale, era plausibile pensare che, in questi fagociti, l'accumulo di una sostanza basica quale la cloroquina fosse ostacolato. A supporto di questa ipotesi ci sono dati di letteratura che riportano una riduzione del 30 - 40% della concentrazione intracellulare di cloroquina nei PMN infiammatori murini rispetto a quelli normali.

Questo minor accumulo della CQ, dovuto per l'appunto agli eventi successivi l'attivazione di queste cellule, riduce nei topi l'effetto terapeutico del farmaco (Raghoobar et al., 1987).

## ***1.2 Isolamento di neutrofili murini da sangue venoso periferico***

Al fine di poter disporre di PMN non infiammatori, più simili, quindi, a quelli umani da noi comunemente utilizzati, abbiamo tentato di isolare queste cellule dal sangue venoso periferico del topo. I neutrofili murini si differenziano però da quelli umani per diverse caratteristiche. Innanzitutto, la percentuale di neutrofili nel sangue murino (30% circa) è decisamente minore rispetto a quella dei PMN dell'uomo (60% circa); inoltre, ciò che contribuisce a rendere più difficoltoso l'isolamento dei neutrofili dal topo è la loro minor densità di cui abbiamo dovuto tener conto nell'allestimento dei medium impiegati per le centrifugazioni su gradiente. Come fase preliminare abbiamo dovuto pertanto effettuare uno studio metodologico per cercare di ottenere la miglior resa, sia in termini numerici che qualitativi, dalle procedure di isolamento.

In prima battuta abbiamo applicato al sangue murino lo stesso metodo utilizzato per l'isolamento dei PMN da sangue venoso periferico umano (vedi capitolo 1 di Materiali e Metodi) e abbiamo constatato che, dopo centrifugazione su gradiente discontinuo di Percoll, la distribuzione degli elementi figurati del sangue murino è molto diversa da quella degli elementi corpuscolati del sangue umano: gli eritrociti si distribuiscono su tutto il gradiente mentre i neutrofili maturi si collocano nella banda formatasi all'interfaccia tra Percoll 62% e Percoll 75%, anche se il numero di neutrofili totali è piuttosto scarso (ottenuti  $0.05 - 1.5 \times 10^6$  PMN totali da circa 2 ml di sangue). Per ottimizzare la resa numerica sono stati pertanto allestiti in seguito gradienti discontinui di Percoll a diversa densità (Percoll 61,7% - 74,7% e Percoll 61,5% - 74,5%) che tuttavia non si sono dimostrati efficaci nel migliorare il recupero dei PMN e nel limitare la presenza degli eritrociti.

Visti i risultati non soddisfacenti ottenuti durante i primi tentativi di isolamento su gradiente discontinuo di Percoll, abbiamo ipotizzato che il metodo di prelievo del sangue potesse aver arrecato qualche danno alle cellule. Il sangue infatti era prelevato goccia a goccia dalla guancia dei topi e raccolto in provette contenenti un volume di EDTA 40 mM tale che, in un volume finale calcolato di 2 ml di campione, l'anticoagulante raggiungesse la concentrazione di 1 mM. Le prime cellule raccolte, perciò, venivano in contatto con una concentrazione di EDTA elevata, tale da rendere molto probabile un loro danneggiamento.

Nelle prove successive si è passati quindi all'utilizzo di eparina 20 U/ml come anticoagulante. Inoltre, per tentare di risolvere il problema dell'interferenza degli eritrociti nell'isolamento dei neutrofili si è impiegato il destrano in associazione a Percoll 61,5% o Ficoll-paque. Il destrano è un polimero del glucosio ad alto peso molecolare e permette la pseudoagglutinazione degli eritrociti per modificazioni della carica elettrica di superficie. Il Ficoll-paque è un altro mezzo a densità nota (1,114 g/mL) comunemente utilizzato per le procedure di isolamento dei leucociti dal sangue periferico. Si sono sperimentate perciò quattro diverse combinazioni: Ficoll-paque/Destrano e Destrano/Ficoll-paque; Percoll 61.5%/Destrano e Destrano/Percoll 61.5% (vedi capitolo 11 di Materiali e Metodi).

I dati, piuttosto omogenei, ottenuti da queste ultime prove d'isolamento di PMN murini sono stati mediati e riportati nella Tabella 3. Anche se la purezza delle popolazioni di neutrofili murini isolate da sangue venoso si aggira fra il 70% e il 90%, la quantità di cellule recuperate è stata sempre piuttosto modesta, insufficiente per il loro impiego nelle prove funzionali.

Procedura	leucociti recuperati (x 10 <sup>6</sup> )	formula leucocitaria (%)			
		N	Ni	L/M	E
Lavaggio peritoneale	6.5 ± 1.5 (n = 7)	90	-	8.5	1.5
Prelievo di sangue venoso periferico	< 1.5 (n = 6)	70-90	-	10-30	1-3
Estrazione da midollo osseo	WT : 9.6 ± 1.9 (n = 10) gp91 <sup>phox</sup> KO: 9.6 ± 1.2 (n = 8)	85-90	5-7	2-6	-

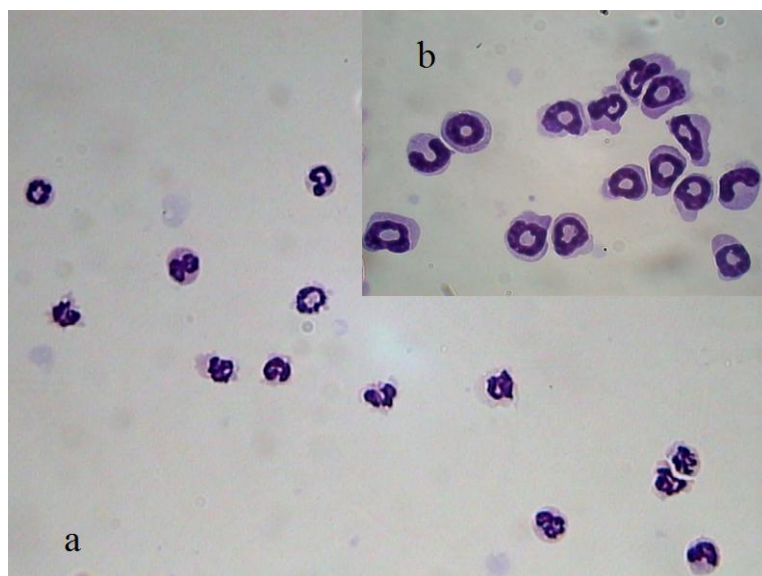
**Tabella 3: Quadro riassuntivo delle procedure di isolamento di PMN murini: analisi quantitativa e qualitativa.** La tabella riporta i dati ottenuti con i diversi metodi utilizzati per isolare i PMN di topo. N: neutrofili; Ni: neutrofili immaturi; L/M: linfociti-monociti; E: eosinofili. I dati riguardanti il numero di neutrofili recuperati sono espressi come media ± s.e.m. del numero di esperimenti riportato in parentesi (n).

### ***1.3 Isolamento di neutrofili murini da midollo osseo***

Poiché dal sangue venoso periferico non è stato possibile ottenere un numero di neutrofili murini adeguato alle nostre esigenze sperimentali, abbiamo deciso di considerare l'isolamento dei neutrofili dal sangue midollare di femori e tibie. Come suggerito da dati di letteratura, il midollo osseo murino è una grande riserva di neutrofili competenti: infatti, se comparati morfologicamente e funzionalmente con i PMN isolati da sangue periferico, non si osservano differenze sostanziali fra le due popolazioni (Boxio et al., 2004).

Diverse prove sono state quindi effettuate per ottimizzare questa tecnica di isolamento, fino alla messa a punto di un metodo (descritto in dettaglio in Materiali e Metodi, capitolo 12) che, come riportato nella Tabella 3, permette di ottenere una

popolazione cellulare sufficientemente pura (Figura 19) e in quantità adeguata per il successivo impiego nei saggi di attività microbica.

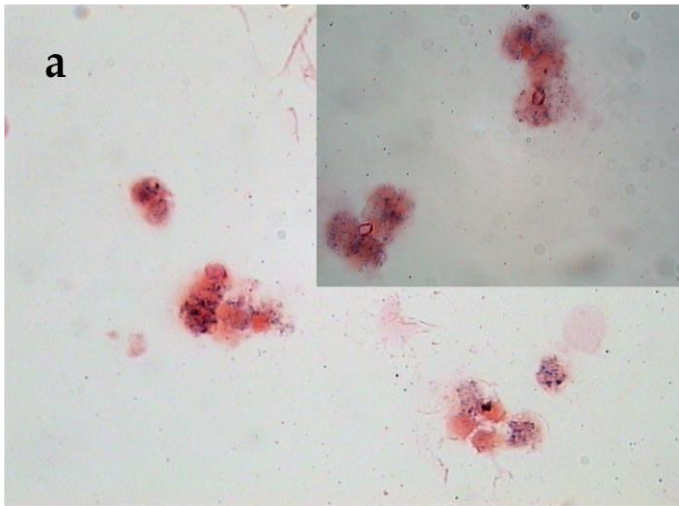


**Figura 19: Neutrofili murini di origine midollare.** Neutrofili di topo isolati da midollo osseo di tibie e femori. Si distingue bene la caratteristica morfologia nucleare ad anello con bordo irregolare dei neutrofili maturi. I citocentrifugati sono stati trattati con il Dip-Quick il quale colora di viola molto intenso il materiale nucleare. (a) Ingrandimento 40x; (b) Ingrandimento 100x.

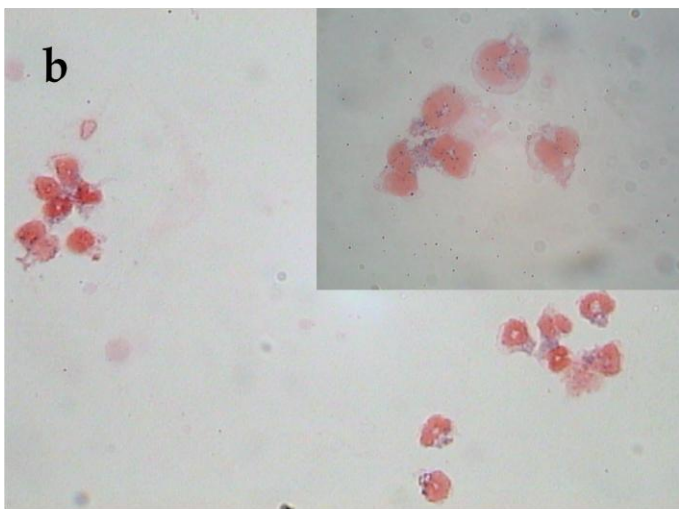
## ***2. Caratterizzazione fenotipica di neutrofili CGD e prova di attività microbica***

Prima di proseguire gli studi *in vitro* con PMN isolati dai topi CGD, propedeutici alla successiva sperimentazione *in vivo*, si è proceduto con l'accertamento del fenotipo dei neutrofili degli animali da utilizzare. Sui neutrofili isolati da midollo osseo è stato quindi eseguito il test dell'NBT, durante il quale la produzione di anione superossido da parte dell'NADPH ossidasi attivata permette la riduzione del nitro blu di tetrazolio a sali di formazano che precipitano conferendo alle cellule una particolare colorazione (vedi Materiali e Metodi, capitolo 13). Nella Figura 20 a si può osservare la deposizione di formazano nei PMN WT, indice della

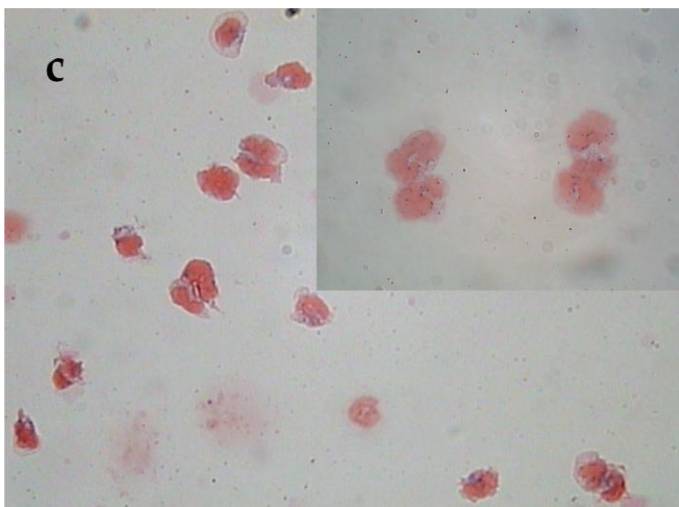
presenza di una NADPH ossidasi funzionante. Il significato della positività al test dei neutrofili WT è rafforzato dall'evidenza che, se l'attività dell'ossidasi viene inibita preincubando le cellule con il DPI, i PMN murini WT diventano negativi al test (Figura 20 b). Il test NBT condotto su PMN isolati da topi CGD è risultato, come ci si aspettava, negativo (Figura 20 c), confermando funzionalmente l'assenza del complesso NADPH ossidasi.



**Figura a:** E' evidente la presenza intracellulare nei PMN WT di precipitati blu scuro-viola (sali di formazano), formatisi in seguito alla riduzione del Nitroblu di Tetrazolio da parte dell'anione superossido.



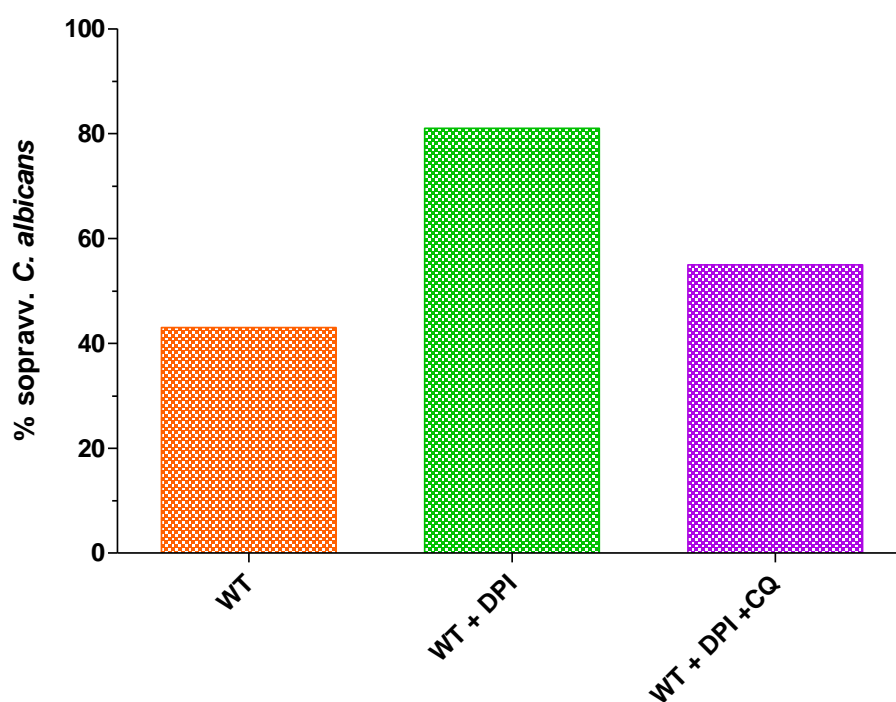
**Figura b:** PMN WT trattati con DPI non sono più in grado di produrre  $O_2^-$ .



**Figura c:** Non si osserva alcun precipitato nei PMN gp91phox KO a testimoniare la mancata produzione di anione superossido in questi fagociti.

**Figura 20: Fenotipizzazione di neutrofili midollari murini C57Bl WT e gp91phox KO.** I citocentrifugati sono stati trattati per il test NBT come descritto in dettaglio nel capitolo 13 di Materiali e Metodi.

Una volta ottimizzato il metodo d'isolamento e stabilito che I PMN midollari sono idonei ai nostri scopi, abbiamo testato la loro capacità di *killing in vitro* nei confronti di *C. albicans*. Il grafico riportato nella Figura 21 mostra infatti che, per quanto riguarda l'attività microbica nei confronti di *C. albicans*, i neutrofili midollari murini si comportano funzionalmente in maniera simile ai neutrofili umani (Figura 18 a): il *killing* viene abolito dal DPI e ripristinato in parte dal trattamento con cloroquina.

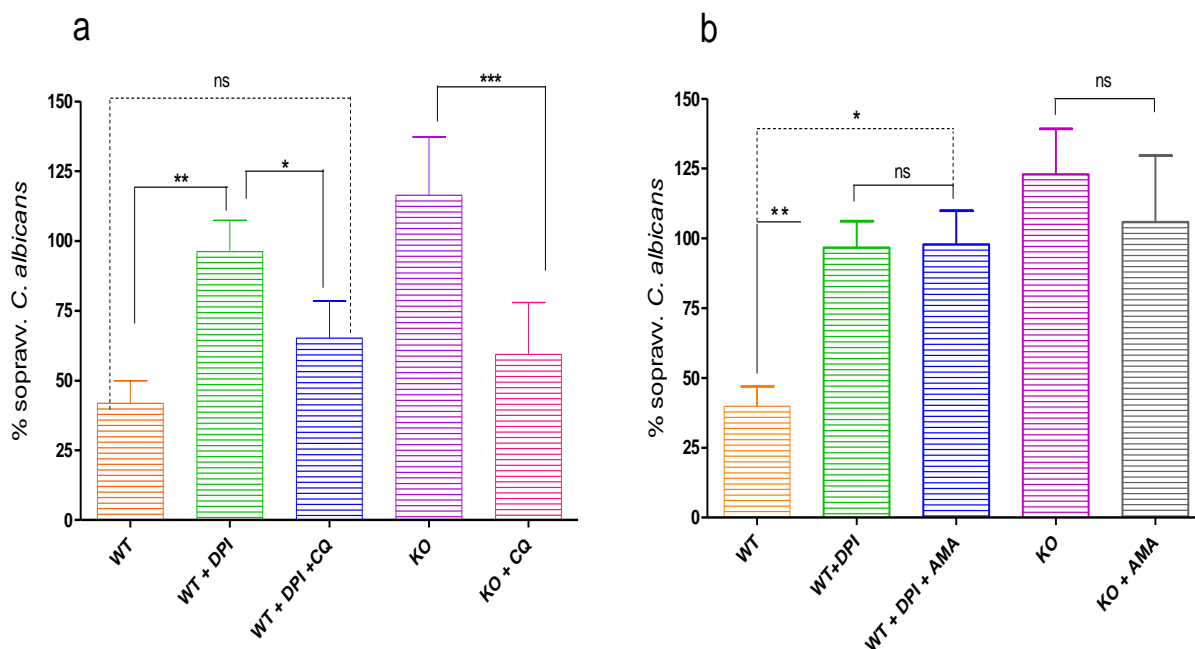


**Figura 21. Attività microbica di neutrofili midollari murini: effetto della cloroquina.** L'attività microbica è stata valutata utilizzando PMN isolati dal midollo di topi normali e mantenuti tali (WT) o resi CGD-like con il trattamento con DPI 5  $\mu$ M c.f. (WT + DPI). Dove indicato (WT + DPI + CQ), i PMN CGD-like venivano preincubati per 20 min a 37°C con CQ 100  $\mu$ M c. f. Per ulteriori dettagli metodologici, vedere il capitolo 15 di Materiali e Metodi. La capacità microbica è espressa in % di sopravvivenza di *C. albicans*. I risultati riportati nel grafico sono la media di due esperimenti condotti in duplicato.

### ***3. Effetto di amantadina e cloroquina sull'attività microbica di neutrofili murini gp91phox KO***

Una volta constatato che il fenotipo dei neutrofili isolati dai topi gp91phox KO fosse quello atteso e i neutrofili murini isolati da midollo osseo fossero adatti al tipo di prove funzionali da noi utilizzate, si è passati alla valutazione dell'effetto di cloroquina e amantadina sul *killing* utilizzando sia neutrofili isolati da topi C57Bl WT e trattati con DPI, sia PMN da topi gp91phox KO

Nella Figura 22 a vengono riportati i risultati delle prove di attività microbica in vitro nei confronti di *C. albicans* da parte di PMN isolati dal midollo osseo di topi normali (WT) e gp91phox KO. Appare evidente come, dopo trattamento con CQ, la capacità di *killing* di PMN gp91phox KO e PMN WT resi CGD-like con l'aggiunta di DPI, sia nettamente migliorata. Si osserva infatti una significativa riduzione della sopravvivenza di *C. albicans*, che risulta del 30% per i neutrofili WT trattati con DPI e del 60% per i neutrofili gp91phox KO. Per quanto riguarda, invece, l'effetto dell'amantadina (Figura 22 b) essa non sembra attribuire capacità microbica ai neutrofili murini in esame. Infatti, nelle condizioni da noi testate, sia nei PMN WT addizionati di DPI che nei PMN gp91phox KO, non si osserva un aumento della mortalità di *C. albicans*. Alla luce dei risultati negativi ottenuti con l'amantadina, abbiamo deciso di utilizzare la sola cloroquina per le successive prove di attività microbica *in vivo*.



**Figura 22: Attività microbica di PMN midollari murini in presenza di cloroquina (a) e amantadina (b).** L'attività microbica è stata valutata utilizzando PMN isolati dal midollo di topi gp91phox KO (KO) e topi normali, mantenuti tali (WT) o resi CGD-like con il trattamento con DPI 5  $\mu$ M c.f. (WT + DPI). Dove indicato, i PMN CGD-like e quelli gp91phox KO venivano preincubati per 20 min a 37°C con CQ (100  $\mu$ M c. f.) o amantadina (1.5 mM c. f.) Per ulteriori dettagli metodologici, vedere il capitolo 15 di Materiali e Metodi. La capacità microbica è espressa in % di sopravvivenza di *C. albicans*. I dati riportati in figura sono la media  $\pm$  s.e.m. di 3-6 esperimenti. Per determinare il grado di significatività dei risultati ottenuti è stato eseguito il test t di Student su dati appaiati. \*  $p < 0.02$  ; \*\*  $p < 0.006$  ; \*\*\*  $p < 0.002$ .

## 4. Sperimentazione in vivo: controlli preliminari e definizione delle condizioni sperimentali

### 4.1 Valutazione della tossicità della cloroquina

Constatato che la cloroquina è in grado di ripristinare in parte l'attività microbica dei PMN murini gp91phox KO *in vitro*, si è passati alla sperimentazione *in vivo*, per verificare se il trattamento con questo farmaco potesse migliorare la resistenza dei topi gp91phox KO all'infezione da *C. albicans*. Prima dell'inizio dei *trial*

abbiamo testato sugli animali l'eventuale tossicità del farmaco; dati di letteratura riportano infatti che, assunta in dosi eccessive, la cloroquina può provocare reazioni di tossicità a carico delle strutture neurosensoriali deputate alla funzione uditiva e all'equilibrio (Moreno et al., 2001). Un gruppo ristretto di animali è stato quindi trattato con cloroquina alle concentrazioni di 35 mg/kg e 7 mg/kg per via intraperitoneale (IP) e 70 mg/kg, 35 mg/kg e 7 mg/kg per OS. Queste concentrazioni sono state scelte facendo riferimento a lavori di letteratura nei quali topi di peso ed età paragonabili a quelli da noi testati erano trattati con cloroquina o con farmaci ad azione analoga (Raghoebar et al., 1986; Weber et al., 2000; Odds et al., 2000).

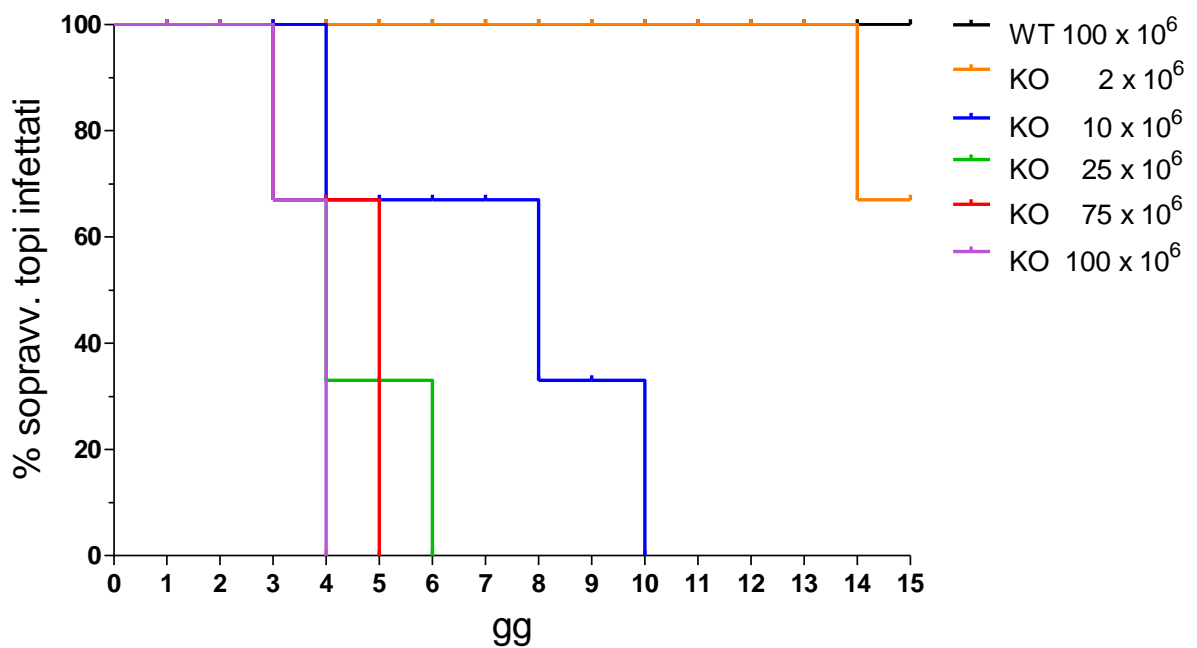
Ad eccezione di un caso, attribuibile probabilmente ad una sensibilità particolare dell'animale alla sostanza, la cloroquina, alle dosi utilizzate, non sembra causare negli animali fenomeni di tossicità rilevanti. Inoltre, ai fini sperimentali, la via di somministrazione IP sembra quella più semplice da utilizzare.

## ***4.2 Ottimizzazione dell'entità della carica microbica***

La scelta della quantità di patogeni da inoculare è senza dubbio importante per una corretta valutazione degli effetti di una qualsivoglia sostanza sulla sopravvivenza degli animali da esperimento infettati. Nel nostro caso, in particolare, l'infezione dei topi gp91phox KO con una carica microbica eccessiva provocherebbe la morte precoce della maggior parte degli animali, rendendo impossibile l'evidenziazione di un eventuale effetto benefico della cloroquina sulla loro sopravvivenza. Abbiamo quindi dovuto effettuare delle prove preliminari per individuare la carica fungina alla quale i topi gp91phox KO potevano sopravvivere, anche senza trattamento, per un tempo sufficientemente lungo. Topi gp91phox KO e topi C57Bl WT di controllo sono stati pertanto inoculati con concentrazioni crescenti di blastospore di *C. albicans*, e il monitoraggio della loro sopravvivenza è stato eseguito fino al 15° giorno successivo all'infezione.

La Figura 23 riporta le curve di sopravvivenza ottenute da queste prove preliminari. Osservando il grafico si nota innanzitutto che i topi WT sembrano in

grado di fronteggiare l'infezione da *C. albicans* anche alle dosi di inoculo più elevate: tutti gli animali infettati con  $100 \times 10^6$  blastospore sono infatti sopravvissuti oltre il termine della sperimentazione. I topi gp91phox KO, invece, soccombono troppo rapidamente a cariche microbiche superiori a  $10 \times 10^6$ , mentre alla concentrazione fungina minima testata ( $2 \times 10^6$  blastospore) il tempo di sopravvivenza appare eccessivamente lungo. Abbiamo quindi ritenuto che la carica fungina da utilizzare nella fase sperimentale successiva dovesse essere compresa tra  $2$  e  $10 \times 10^6$  blastospore/animale.



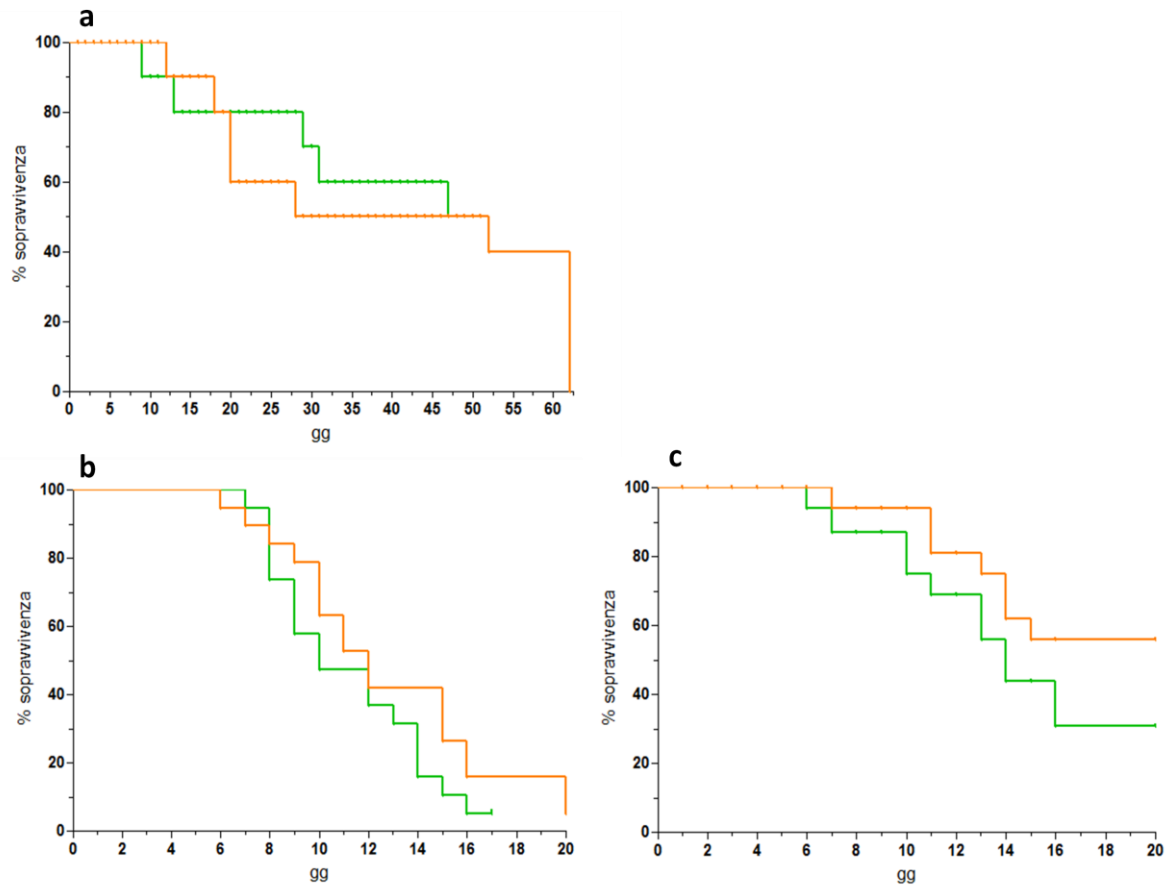
**Figura 23: Curve di sopravvivenza di topi WT e topi gp91phox KO infettati con *C. albicans*.** I topi sono stati inoculati IP con le quantità di *C. albicans* riportate nella legenda. Gli animali sono stati mantenuti in condizioni sterili all'interno di gabbie contenute in armadi ad areazione ventilata a pressione negativa ed il loro stato di salute veniva monitorato giornalmente. I dati del grafico sono la media di tre prove condotte su gruppi composti da tre animali ciascuno.

### 4.3 Effetto della cloroquina sulla sopravvivenza di topi gp91phox KO all'infezione da *C. albicans*

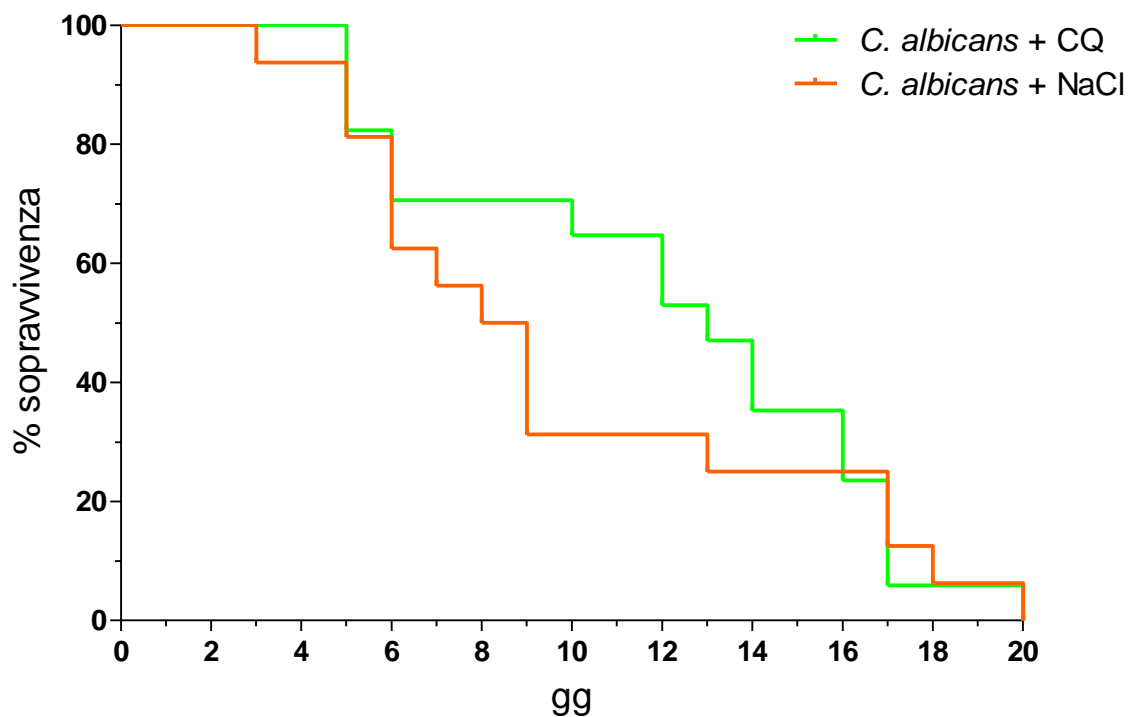
Una volta appurato che la cloroquina, alle concentrazioni utilizzate, non suscita reazioni patologiche negli animali e scelto l'intervallo dell'entità della carica microbica di *C. albicans* da inoculare in ciascun animale ( $2-10 \times 10^6$ ), siamo passati a valutare il possibile effetto del farmaco sulla sopravvivenza dei topi gp91phox KO all'infezione. Gli studi sono stati condotti su gruppi omogenei per età, sesso e peso. I topi inclusi nella sperimentazione sono stati suddivisi in tre gruppi: il primo gruppo era trattato solo con la CQ via IP per controllare la comparsa di eventuali effetti collaterali del farmaco, il secondo e il terzo gruppo venivano invece infettati con *C. albicans* via IP e trattati, rispettivamente, con il farmaco o con soluzione fisiologica (controllo negativo).

Più prove sono state eseguite per ottimizzare la resa del trattamento: si è provato a somministrare la CQ a diverse concentrazioni (35 e 70 mg/kg) e a diversi giorni dall'inoculo del patogeno monitorando l'aumento del tempo di sopravvivenza degli animali. Abbiamo inoltre variato la carica del patogeno e controllato la reazione allo stesso in base al sesso dell'animale. Il pannello riportato nella Figura 24 riassume le varie prove effettuate.

Alla fine, cercando di variare uno alla volta i parametri in gioco, il trattamento che ha dato i risultati migliori, per lo meno registrabili entro le due settimane dall'inoculo di *C. albicans*, è stato quello nel quale la cloroquina, alla concentrazione di 35 mg/kg, è stata iniettata IP sia il giorno precedente ( $T_{-1}$ ) che il giorno stesso ( $T_0$ ) dell'inoculo del patogeno ( $5 \times 10^6$  blastospore/topo), con un richiamo settimanale di CQ alla medesima dose. Con questo protocollo si è cercato di mantenere il più possibile costanti i livelli di cloroquina nel sangue, affinché fosse maggiormente disponibile ai compartimenti acidi dei PMN impegnati nell'attività microbica. In figura 25 sono riportati i dati ottenuti da questo *trial*.



**Figura 24. Curve di sopravvivenza di topi gp91phox KO infettati con *C. albicans*: ottimizzazione del trattamento con cloroquina.** In verde sono riportati i dati ottenuti con gruppi di topi (8-12 animali in media) trattati IP con 35 mg/kg CQ e in arancio quelli ottenuti con gruppi di topi non trattati. **(a)** la CQ è stata somministrata 4 giorni prima ed il giorno stesso dell'infezione con  $3 \times 10^6$  *C. albicans*; successivamente il trattamento con CQ veniva ripetuto ogni 4 giorni fino al 12° giorno; un ultimo richiamo con CQ è stato effettuato il 35° giorno dall'infezione. **(b)** la CQ è stata somministrata 2 giorni prima e un giorno dopo l'infezione con  $5 \times 10^6$  *C. albicans* **(c)** CQ e *C. albicans* ( $4 \times 10^6$  blastospore) sono state inoculate nello stesso giorno. Gli animali sono stati mantenuti in condizioni sterili all'interno di gabbie contenute in armadi ad areazione ventilata a pressione negativa ed il loro stato di salute veniva monitorato giornalmente.



**Figura 25. Curve di sopravvivenza di topi gp91phox KO infettati con *C. albicans*: effetto del trattamento con cloroquina.** Un giorno prima dell'infezione con *C. albicans*, un gruppo di topi (17 animali) è stato trattato IP con 35 mg/kg di CQ, mentre un altro gruppo (16 animali) con soluzione fisiologica. Ad ogni topo dei due gruppi sono stati successivamente inoculati IP  $5 \times 10^6$  blastospore di *C. albicans* ( $t = 0$ ). Durante il periodo di osservazione, una volta a settimana, ai topi del primo gruppo veniva ripetuta la somministrazione di 35 mg/kg di CQ. Gli animali sono stati mantenuti in condizioni sterili all'interno di gabbie contenute in armadi ad areazione ventilata a pressione negativa ed il loro stato di salute veniva monitorato giornalmente.

## *DISCUSSIONE – parte II*

La malattia granulomatosa cronica (CGD, Chronic Granulomatous Disease) è un'immunodeficienza primaria, o congenita, a carico del sistema dell'immunità innata. Questa condizione è generata dall'assente o ridotta attività della proteina multimerica NADPH ossidasi, l'enzima alla base dei meccanismi microbicidi ossigeno dipendenti nei leucociti polimorfonucleati neutrofili. Ciò predispone i soggetti CGD a frequenti e gravi infezioni batteriche e fungine, con un caratteristico aspetto granulomatoso delle lesioni infiammatorie, da cui prende il nome la malattia. L'attuale strategia terapeutica, che prevede profilassi antibiotica e antifungina ed il trattamento aggressivo delle infezioni acute, ha migliorato in modo rilevante il decorso delle infezioni nei pazienti CGD. Tuttavia, questo approccio richiede la somministrazione di dosi elevate di antibiotici e antifungini per lunghi periodi di tempo con pesanti effetti collaterali. Anche se il trattamento ha incrementato l'aspettativa di vita dei soggetti affetti da CGD, l'unica cura definitiva alla malattia è il trapianto allogenico di midollo osseo, terapia comunque associata a gravi complicazioni cliniche e di limitato impiego data la scarsità di donatori.

Analizzando l'attività microbica di neutrofili di soggetti normali e soggetti CGD, si è osservato che nei PMN sani la funzionalità della NADPH ossidasi contribuisce ad un'iniziale alcalinizzazione del pH vacuolare (seguita da una lenta acidificazione). Questo balzo di pH sembra essere indispensabile all'attivazione e al funzionamento dei meccanismi battericidi ossigeno indipendenti. Nei PMN CGD, privi dell'attività ossidasica, l'aumento iniziale del pH viene a mancare. Considerato questo diverso andamento del pH fagosomale, si è ipotizzato che l'impiego di sostanze con caratteristiche di basi deboli lisosomotropiche potesse ripristinare, almeno in parte, le normali condizioni del vacuolo di fagocitosi nei neutrofili CGD. A questo scopo, è stato testato l'effetto di diverse sostanze alcalinizzanti sull'attività microbica di PMN normali trattati con DPI (CGD-like) e di PMN isolati da pazienti CGD. I primi risultati da noi ottenuti nelle prove funzionali di attività microbica *in vitro* sono stati molto incoraggianti. Tra le basi testate, la cloroquina (CQ) ha fornito i migliori risultati. Il trattamento con questo farmaco ha infatti migliorato in modo considerevole il *killing* dei neutrofili CGD e CGD-like: nelle prove di attività microbica eseguite con questi fagociti si assiste ad una riduzione della

sopravvivenza delle candide paragonabile, se non maggiore, a quella riscontrata nei saggi condotti con neutrofili isolati da soggetti sani. L'efficacia di questa sostanza è riconducibile molto probabilmente alla sua natura di base debole: infatti, nella forma non protonata presenta caratteristiche lipofile che le consentono di penetrare attraverso il doppio strato lipidico della membrana plasmatica e di accumularsi a livello di lisosomi ed endosomi (il cui pH interno è circa pari a 5). In questi compartimenti acidi acquista una carica netta positiva che, nello stato protonato, le impedisce di ridiffondere nel citosol.

Dati di letteratura rafforzano la nostra tesi, dimostrando come la CQ sia efficace nei confronti di miceti (Newman et al. 1994; Weber et al. 2000). Queste indagini hanno però evidenziato che l'attività antifungina della CQ non è imputabile unicamente alla sua natura di base debole, ovvero alla sua azione sul pH vacuolare. E' plausibile quindi pensare che questo farmaco apporti ulteriori modificazioni all'ambiente fagosomale tali da incrementare il *killing* dei neutrofili nei confronti di patogeni quali i funghi. Attualmente questo aspetto dell'effetto della CQ non è ancora stato chiarito.

E' stato riportato l'utilizzo della cloroquina in un primo caso clinico, un paziente CGD di 29 anni con consistente ispessimento della parete gastrica e numerose spesse formazioni granulomatose sempre a livello dello stomaco (Arlet et al. 2008). La CQ viene prescritta di norma non solo per la profilassi e la cura della malaria, ma anche come antiinfiammatorio in alcune malattie autoimmuni, con ottimi risultati. Per questo motivo, mantenendo il regime di profilassi con antifungini e antibiotici, il soggetto è stato trattato con idrossicloroquina per quattro mesi. Dopo questo periodo, si è constatato che non erano più presenti granulomi e che lo spessore della parete gastrica si era ridotto dell'80%. E' plausibile che la CQ possa aver ridotto la sovrapproduzione di mediatori dell'infiammazione implicati nella formazione dei granulomi. Per questa sua proprietà immunomodulatoria e la sua attività antifungina, oltre che per le sue caratteristiche farmacocinetiche ed effetti collaterali contenuti, pensiamo che la CQ sia un farmaco che potrebbe essere utilmente impiegato in una terapia mirata anche ad un minor impatto sulla qualità della vita dei pazienti CGD. Perciò, in vista di una possibile futura applicazione

clinica del farmaco alla CGD, si è passati ad indagare l'effetto della CQ in un modello murino, dapprima sulla sua attività microbica *in vitro* e successivamente *in vivo*.

La prima fase del nostro lavoro dedicata al ripristino dell'attività microbica mediante sostanze alcalinizzanti è stata dunque dedicata agli studi *in vitro* sulle cellule murine isolate, riproponendo le prove funzionali già eseguite con i neutrofili umani. Viste le differenti caratteristiche dei PMN murini dai PMN umani, è stato necessario mettere a punto un protocollo adeguato per l'isolamento dei neutrofili dal topo. Per raggiungere questo scopo, si sono provate diverse soluzioni impiegando esclusivamente topi *wild type* C57BL. Il primo tentativo è stato effettuato mediante l'isolamento dei PMN attraverso lavaggio peritoneale post-flogosi, una metodica ampiamente utilizzata in letteratura. Questa tecnica ci ha permesso di raccogliere una quantità discreta di cellule, che tuttavia si sono dimostrate inadeguate per le successive prove funzionali. Nei test di attività microbica in presenza di CQ non si è riscontrato infatti alcun potenziamento del *killing* da parte di questi PMN peritoneali murini resi *CGD-like*. Si è ipotizzato che questi fagociti di tipo infiammatorio potrebbero essere già preattivati: l'attivazione induce i neutrofili a degranulare e comporta una modificazione del pH citoplasmatico e lisosomiale tale da poter interferire con l'accumulo di una base debole come la cloroquina. Dati di letteratura riportano una diminuzione del 30 - 40% dell'accumulo di CQ nei PMN infiammatori rispetto a quelli normali (Raghoobar et al., 1986; Weber et al., 2000). Questa riduzione, assieme ad altre alterazioni presenti nei PMN preattivati, potrebbe essere sufficiente a rendere nullo l'effetto terapeutico del farmaco.

Alla luce di queste considerazioni, si è provato ad isolare i neutrofili dal sangue venoso periferico, con l'intento di ottenere cellule più simili a quelle recuperate dal sangue venoso periferico umano ed impiegate comunemente nelle prove di attività microbica. La bassa percentuale di PMN nel torrente ematico e la loro così diversa densità rispetto a quelli umani, hanno contribuito a rendere molto difficoltoso l'isolamento stesso e quantitativamente insoddisfacente e inadeguata la resa cellulare ottenuta. Nonostante i tentativi, entrambe queste procedure d'isolamento non hanno fornito risultati apprezzabili in termini di recupero numerico di PMN.

Seguendo le indicazioni di altri lavori presenti in letteratura, abbiamo messo a punto un protocollo per isolare i neutrofili dal midollo osseo di tibie e femori murini. Il sangue midollare contiene un grande numero di neutrofili, la cui funzionalità è simile a quella dei PMN isolati da sangue periferico (Boxio R et al., 2004). Come riportato nei dati raccolti nella Tabella 1, questa tecnica ci ha permesso di ottenere una popolazione cellulare composta in maggioranza da neutrofili (più del 90% del totale) in quantità adeguata per il loro impiego nei saggi di attività. Nelle prove funzionali eseguite con neutrofili midollari abbiamo ottenuto risultati più che soddisfacenti. La CQ si è infatti dimostrata efficace nel potenziare l'attività microbica dei PMN WT trattati con DPI e dei PMN CGD (Figura 22).

Confortati da questi risultati positivi ottenuti *in vitro*, si è avviata la sperimentazione *in vivo* nei topi CGD, nella quale i roditori, trattati o meno con la CQ, sono stati infettati con blastospore di *C. albicans*. Prima di intraprendere questi *trial*, sono stati svolti degli studi preliminari per valutare sia l'eventuale tossicità della cloroquina somministrata a diverse concentrazioni sia la virulenza di differenti cariche microbiche del fungo nel topo gp91phox KO.

Per la valutazione dell'eventuale tossicità della cloroquina, le diverse dosi del farmaco sono state somministrate a gruppi di tre topi ciascuno sia per via intraperitoneale (IP) che per via orale (PO). In letteratura vi sono dati discordanti sulla concentrazione di cloroquina sopportabile dal modello murino. Alcuni autori sostengono che è possibile trattare topi, criceti e ratti con dosi di CQ marcatamente superiori alla concentrazione abitualmente prescritta per l'uomo; le tre specie possono sopportare rispettivamente fino a 12, 9 e 7 volte quelle previste per l'uomo (Freireich et al. 1966). Altri invece hanno riportato casi di intossicazione nel topo a concentrazioni del farmaco così elevate e pertanto di aver utilizzato negli esperimenti le dosi previste per il ratto (Moreno et al., 2001) o di aver ulteriormente abbassato la dose (Khan et al., 2002). Da queste indicazioni abbiamo testato l'effetto della CQ nel *range* di concentrazioni: 7 - 35 mg/kg per l'inoculo IP e 7 - 35 e 70 mg/kg per la somministrazione PO. Ciascuna dose è stata somministrata su gruppi composti da tre topi. In questa fase della sperimentazione non è stato rilevato nessun effetto tossico della CQ.

Successivamente si è passati a determinare la carica microbica adatta per i nostri esperimenti. Gli animali sono stati divisi in gruppi da tre ed infettati con differenti quantità di *C. albicans*, scelte in base ad indicazioni provenienti dalla letteratura (Arlet et al., 2008, Roger et al., 1976). I topi gp91phox KO si sono dimostrati suscettibili al fungo in modo dose-dipendente. I topi WT impiegati nella sperimentazione sono tutti sopravvissuti anche alla massima carica fungina testata ( $100 \times 10^6$  CFU) (Figura 23).

Considerati i dati ottenuti dalla valutazione della tossicità della cloroquina, della virulenza di *C. albicans* e dalla tempistica di somministrazione del patogeno, nel modello murino impiegato in questa sperimentazione, si è deciso di inoculare gli animali il giorno seguente la prima somministrazione del farmaco per permettere ai neutrofili di accumulare la CQ nei compartimenti acidi della cellula. Quindi, un numero di 17 roditori trattati con la CQ e 16 con soluzione fisiologica sono stati infettati via IP con una carica microbica pari a  $5 \times 10^6$  candide/topo. Nel trattamento *in vivo* appena descritto, della durata di 20 gg, il 50 % dei topi trattati con fisiologica sono deceduti entro l'8° giorno dall'infezione, mentre la metà dei roditori trattati con il farmaco è sopravvissuta fino al 13° giorno. Come si può osservare dal grafico della Figura 24, gli effetti della CQ sembrano comparire dopo 6 giorni dall'inoculo di *C. albicans*. Tuttavia, dal 16° giorno in poi, la curva di sopravvivenza dei due gruppi infettati ha mostrato un andamento simile.

Diverse sono le ipotesi sul come potrebbe essere reso più efficace il trattamento con CQ al fine di scongiurare gli effetti letali dell'infezione con *C. albicans*: è necessario aumentare la concentrazione del farmaco? potrebbero rivelarsi efficaci somministrazioni di CQ più ravvicinate nel tempo? Una profilassi con la CQ condotta per più giorni prima dell'infezione potrebbe migliorare la sopravvivenza degli animali trattati? O ancora, potrebbe dare risultati migliori un regime di somministrazioni di CQ a dosi scalari?

L'assenza di un evidente effetto benefico della CQ nel modello *in vivo* suggerisce altre ipotesi. Dati di letteratura indicano che nell'uomo la CQ viene accumulata soprattutto nei tessuti lipidici e metabolizzata in gran parte attraverso il sistema escretore, ma poco conosciuti sono i processi metabolici che regolano nel

topo il destino di questo farmaco. Uno smaltimento precoce della CQ e/o una sua modificazione metabolica potrebbero forse giustificare i nostri dati che dimostrano l'efficacia di questa sostanza nel modello *in vitro* - dove i neutrofili midollari murini rispondono al trattamento con la CQ in maniera simile a quelli umani (Figura 18 a) - e l'assenza di un suo effetto benefico nei topi CGD.-Altre indagini sono quindi necessarie per cercare di migliorare l'effetto della cloroquina somministrata *in vivo* nel modello murino.

# *BIBLIOGRAFIA*

## A

**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* (1941); 2A (Suppl. 8): 1-62.

**Agner K:** Peroxidative oxidation of chloride ions. In *Proceedings of the 4<sup>th</sup> international congress on biochemistry*, Vienna (1958); 15: 64A.

**Agner K:** Biological effect of hypochlorous acid formed by MPO-peroxidation in the presence of chloride ions. In *Structure and Function of Oxidation Reduction Enzymes*, Vol. 18 (Akeson A and Ehrenberg A eds.) NY, Pergamon (1972); 329-333.

**Akira S, Takeda K, Kaisho T:** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* (2001); 2:675-680.

**Ahluwalia J:** Chloride channels activated by swell can regulate the NADPH oxidase generated membrane depolarization in activated human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* (2008); 365: 328-333.

**Ambruso DR, Abell AN, Panepinto J, Kurkchubasche A, Thurman G, Gonzalez-Aller C, Hiester A, Deboer M, Harbeck RJ, Oyer R, Johnson GL, Roos D:** Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl acad Sci USA* (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 female with a de novo mutation in gp91-phox and a non familiar, extremely skewed X chromosome inactivation. *Clin immunol* (2003); 109: 308-317.

**Arlet JB, Aouba A, Suarez F, Blanche S, Valeyre D, Fischer A, Damotte D, Cellier C, Hermine O:** Efficacy of hydroxychloroquine in the treatment of granulomatous complications in chronic granulomatous disease. *Eur J Gastrointestinal Hepatol* (2008).

**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 defence mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* (1973); 52(3): 741-4.

**Babior** BB: NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* (2004); 16: 42-47.

**Baginski** B: Alterations of the oxidative metabolism and other microbicidal activities of human polymorphonuclear leukocytes by zinc. *Free Radic Res Commun* (1990); 10: 227-235.

**Bainton** DF, Farquhar MG: Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. 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.

**Barese** CN, Goebel WS, Dinauer MC: Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Exp Opin Biol Ther* (2004); 4: 1423-1434.

**Baehner** RL, Nathan DG: Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *New Engl J Med* (1968); 278: 971-976

**Bernheim** L, Krause RM, Baroffio A, Hamann M, Kaelin A and Bader CR: A voltage-dependent proton current in cultured human skeletal muscle myotubes. *J Physiol* (1993); 470: 313-33.

**Borregaard** N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA: Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: traslocation during activation. *J Cell Biol* (1983); 97: 52-61.

**Borregaard** N, Tauber AL: Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase b-cytochrome and associated flavoprotein. *J Biol Chem* (1984); 242: 1295-1298.

**Borregaard** N, Miler LJ, Springer TA: Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils. *Science* (1987); 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 of 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 neutrophil differentiation. *Blood* (1995); 85: 812-817.
- Borregaard N**, Cowland JB: Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* (1997); 89(10): 3503-21.
- Borregaard N**, Sorensen OE, Theilgaard MK: Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* (2007); 8: 340-345.
- Boxio R**, Bossenmeyer-Pourière C, Steinckwich N, Dournon C, Nüße O: Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J Leuk Biol* (2004); 75: 604-611.
- Brochetta C**, Perrotta MG, Jeromin A, Romano M, Vita F, Soranzo MR, Borrelli 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, Scandiuzzi L, Moranzo 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.
- Busetto S**, Trevisan E, Decleva E, Dri P, Menegazzi R: Chloride movements in human neutrophils during phagocytosis: characterization and relationship to granule release. *J Immunol* (2007); 179: 4110-4124.

## C

**Campanelli D**, Detmers PA, Nathan CF and Gabay JE: Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J Clin Invest* (1990); 85: 904-915.

**Campanelli D**, Melchior M, Fu Y, Nakata M, Shuman H, Nathan C, Gabay JE: Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils. *J Exp Med* (Dec 1990); 172(6): 1709-15.

**Carolyn JP**, Jayson IVJ, Jayson IVM: Chloroquine: its effect on leucocyte auto- and heterophagocytosis of the Rheumatic Diseases (1984); 43: 205-212.

**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-gamma transcriptionally modulates the expression for the high affinity IgG-FC Receptor and p47-kDa cytosolic component of NADPH oxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* (1991); 266: 22079-22082.

**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* (1998); 66: 2434-2440.

**Chavakis T**, May EA, Preissner KT, Kanse SM: Molecular mechanism of zinc-dependent leukocytes adhesion involving the urokinase receptor and beta2-integrins. *Blood* (1999); 93: 2976-2983.

**Chernomordik LV**, Sukharev SI, Popov SV, Pastushenko VF, Sokirko AV: The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies. *Biochim Biophys Acta* (1987); 902: 360-373.

**Cherny VV**, Markin VS, DeCoursey TE: The voltage-activated hydrogen ion conductance in rat alveolar epithelial cells is determined by the pH gradient. *J Gen Physiol* (1995); 105(6): 861-896.

**Cherny VV**, Murphy R, Sokolov V, Levis RA and DeCoursey TE: Properties of single voltage-gated proton channels in human eosinophils estimated by noise analysis and direct measurement. *J Gen Physiol* (2003); 121: 615-28.

**Chvapil M**: Effect of zinc on cells and biomembranes. *Med Clin North Am* (1976); 60: 799-812.

**Chvapil M**, Stankova L, Zukovski IV C, Zukovski III C: Inhibition of some functions of polymorphonuclear leukocytes by in vitro zinc. *J Lab Clin Med* (1977); 89: 135-146.

**Cross AR**, Noack D, Rae J, Curnutte JT, Heyworth PG: Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood Cells Mol Dis* (2000); 26: 561-565.

**Crowley JM**: Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophys J* (1973); 13: 711-724.

## D

**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**, Cherny VV: Potential, pH, and arachidonate gate hydrogen ion currents in human neutrophils. *Biophysics J* (1993); 65: 1590-8.

**DeCoursey TE** and Cherny VV. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport detected through hydrogen ion currents in rat alveolar epithelial cells and human neutrophils. *J Gen Physiol* (1994); 103: 755-785.

**DeCoursey TE**, Cherny VV: Voltage-activated hydrogen ions current. *J Membr Biol* (1994); 141: 203-23.

**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, Dinauer MC: The gp91phox component of NADPH oxidase is not the voltage-gated proton channel in phagocytes, but in helps. *J Biol Chem* (2001); 276(39): 36063-36066.

- DeCoursey TE**, Cherny VV, DeCoursey AG, Xu W, Thomas LL: Interactions between NADPH oxidase-related proton and electron currents in human eosinophils. *J Physiol* (2001); 535: 767-781.
- DeCoursey TE**, Cherny VV: The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocyte need proton channels. *Nature* (2003); 422: 531-534.
- DeCoursey TE**: Voltage-gated proton channel and other proton transfer pathways. *Physiol Rev* (2004); 83: 475-579.
- DeCoursey TE**: Voltage-gated proton channels. *Cell Mol Life Sci* (2008); 65: 2554-2573.
- DeCoursey TE**: Voltage-gated proton channels find their dream job managing the respiratory burst in phagocytes. *Physiology* (2010); 25: 27-40.
- 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: 13896-893.
- Demaurex N**, Petheö GL: Electron and proton transport by NADPH oxidases. *Phil Trans R Soc* (2005); 360: 2315-2325.
- Dinauer MC**, Pierce EA, Bruns GAP, Curnutte JT, Orkin SH: Human neutrophils cytochrome b light chain (p22phox): gene structure, chromosomal location and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* (1990); 86: 1729-37.
- Dri P**, Bellavite P, Berton G, Rossi F: Interrelationship between oxygen consumption, superoxide anion and hydrogen peroxide formation in phagocytosing guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *Mol Cell Biochem* (1979); 23: 109-122.
- Dri P**, Presani G, Peticari S, Alberi L, Prodan M, Decleva E: Measurement of phagosomal pH of normal and CGD-like human neutrophils by Dual Fluorescence Flow Cytometry (2002); 48: 159-166.
- Ducharme J**, Farinotti R: Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Chloroquine: Focus on Recent Advancements. *Clin Pharma* (1996); 31: 257-274.

## E

**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: 431-436.

**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.

**El Chemaly A**, Okochi Y, Sasaki M, Arnaudeau S, Okamura Y: VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification. *J Exp Med* (2010); 207: 129-139.

**Edlow DW**, Sheldon WH: The pH of the inflammatory exudates. *Proc Soc Exp Biol Med* (1971); 137: 1328-1322.

**Ellis JA**, Mayer SJ, Jonhes OTG: The effect of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium on aerobic and anaerobic microbicidal activities of human neutrophils. *Biochem J* (1988); 251: 887-891.

**Elsbach P**: The bactericidal/permeability increasing protein (BPI) in antimicrobial host defence. *J Leukoc Biol* (1998); 64: 14-18.

**Elsbach P**, Weiss J and Levy O: Oxygen-independent antimicrobial systems of phagocytes; In: Gallin JL and Snyderman: *Inflammation: Basic principle and clinical correlates*. Pagg. 801-817. Lippincott W&W, Philadelphia (1999). VI eds.

**Emaus MK**, Grunwald R, Lemasters JJ: Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* (1986); 850: 436-448.

**Ezekowitz RA**, Orkin SH, Newberger PE: Recombinant interferon-gamma augments phagocyte superoxide production and X-linked 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, Asakaa J, Borregaard N: fensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory proprieties. *Biochem Biophys Acta* (2002); 1591: 29-35.

**Faurschou** M, Borregaard N; Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* (2003); 5: 1317-1327.

**Fäldt** J, Dahlgren C, Karlsson A, Ahmed AMS, Minnikin DE et al.: Activation of human neutrophils by mycobacterial phenolic glycolipids. *Clin Exp Immunol* (1999); 118: 253-260.

**Femling** JK, Cherny VV, Morgan D, Rada B, Davis AP: The antibacterial activity of human neutrophils and eosinophils requires proton channels but not BK channels. *J Gen Physiol* (2006); 127: 659-672.

**Folkesson** HG, Matthay MA, Hegert CA, Broaddus VC: Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J Clin Invest* (1995); 96:107-116.

**Frankenhaeuser** B, Hodgkin AL: The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J Physiol* (1957); 137: 218-44

**Freireich** EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE: Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother* (1966).

## G

**Giroux** EL, Henkin, RI: Competition for zinc among serum albumin and aminoacids. *Biochim Biophys Acta* (1972); 273: 64-72.

**Grinstein** S, Furuya W, Cragoe EJ Jr: Volume changes in activated human neutrophils: role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *J Cell Physiol* (1986); 128: 33-40.

**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 analysis on 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 human neutrophil cathepsin G on *Eimeria tenella* sporozoites. *J Parasitol* (1991); 77: 775-779.

## H

**Hackam DJ**, Rotstein OD, Zhang WJ, Deamaurex N, Woodside M, Tsai O, Grinstein S: Regulation of phagosomal acidification. *J Biol Chem* (1997); 272(47): 29810-29820.

**Hampton MB**, Winterbourn CC : Modification of neutrophil oxidant production with diphenyleneiodonium on aerobic and its effect on bactericidal killing. *Free Radic Biol Med* (1995); 18: 633-639

**Hampton MB**, Kettle AJ, Winterbourn CC: Inside the neutrophils fagosome: oxidant, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* (1998); 92: 3007-3017.

**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.

**Hasegawa H**, Suzuki K, Suzuki K, Nakaji S, Sugawara K: Effects of zinc on the reactive oxygen species generating capacity of human neutrophils and on the serum opsonic activity in vitro. *Luminescence* (2000); 15; 321-327.

**Henderson LM**, Chappel JB, Jones OT: The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H<sup>+</sup> channel. *Biochem J* (1987); 246: 325-329.

**Henderson LM**, Chappel JB: Dihydrorhodamine-123: a fluorescent probe for superoxide generation?. *Eur J Biochem* (1993); 217: 973-980.

**Heyworth PG**, Bohl PB, 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.

**Heyworth PG**, Cross AR, Curnutte JT: Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol* (2003); 15:578-584.

**Hille B**: Ion channels of excitable membranes. Sunderland MA, Sinauer Associates Inc. (2001).

## 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 osponic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997); 94: 10973-10978.

**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

**Jacobs** RF, Wilson CB: Activity of antibiotics in chronic granulomatous disease leukocytes. *Pediatric Res* (1983); 17: 916-919.

**Jackson** SH, Gallin JL, Holland SM: The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J Exp Med* (1995); 182: 751-758.

**Jankowaski** A, Scott CC, Grinstein S: Determinants of the phagosomal pH in neutrophils. *J Biol Chem* 277(8): 6059-6066

**Jankowaski** 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.

## K

**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.

**Khan** MA, Jabeen R, Nasti TH, Mohammad O: Enhanced anticryptococcal activity of chloroquine in phosphatidylserine-containing liposomes in a murine model. *J Antimicrob Chem* (2002).

**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 leukocytes. *Sciences* (1970); 169: 1095-1098.

**Klebanoff** SJ: Antimicrobial mechanisms in neutrophil polymorphonuclear leukocytes. *Semin Hematol* (1975); 12(2): 117-42.

**Klebanoff** SJ: Myeloperoxidase. *Proc Ass Am Physicians* (1999); 111(5): 383-389.

**Klebanoff** SJ: Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* (2005); 77: 598-625.

**Kobayashi** SD, Voych JM, DeLeo FR: Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* (2003); 5: 1337-1344.

**Koga** H, Terasawa H, Nuno H, Tekeshige 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: 25051-060.

**Kume** A, Dinauer MC: Gene therapy for CGD. *J Lab Clin Med* (2000); 135(2): 122-128.

**Kuribayashi** F, Kumatori A, Susuki S, Nkamatura M, Matsumoto T, Tsuji Y: Human peripheral eosinophils have a specific mechanism to express gp91phox, the large subunit of cytochrome b558. *Biochem Biophys Res Commun* (1995); 209: 146-152.

**Kuribayashi** F, Nuno 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**

**Labro** MT and Babin-Chevaye C: Effects of Amodiaquine, Chloroquine, and Mefloquine on Human Polymorphonuclear Neutrophil Function In Vitro. *Antimicrobial Ag Chem* (1988): 1124-1130.

**Lehrer** RI and Ganz T: Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood* (1990); 76: 2169-2181.

**Leto** TL, Lomax KJ, Volpp BD, Nunoï H, Secler JMG, NAuseef WM, Clark RA, Gallin JL, Malech HL: Cloning of a 67 kDa neutrophil oxidase factors with similarity to a non-catalytic region of p90<sub>s-src</sub>. *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: 10650-654.

**Liese** JC, 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.

**Lomax** KJ, Leto TL, Nunoï H, Gallin JL, Malech HL: recombinant 47-kDa cytosolic factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous 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.

## **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 JL, Holland SM: Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* (2004); 39(5): 692-699.

**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, Steel M, Kellner JD, Yu W, Meroueh SO, Nauseef WM, Dinarello

MC: A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutation in p40 phox and selective defects in neutrophils NADPH oxidase activity. *Blood* (2009); 114: 3309-3315.

**Mauch L**, Lun A, O’Gormann MR, Harris JS, Shculze I at al.: Chronic granulomatous disease and complete myeloperoxidase deficiency both yield strongly reduce dihydrorhodamine-123 test signals but can be easily discerned in routine testing for CGD. *Clin Chem* (2007); 53: 890-896.

**McCord JM**, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzimi function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* (1969); 244: 6049-6055.

**McCord JM**, Crapo JD, Fridovich I: Superoxide dismutase assay: a review of methodology. In: Michelson AM, McCord JM, Fridovich I editors. *Superoxide and superoxide dismutase*, 1<sup>st</sup> ed. London Acad Press (1977); 11-17.

**Menegazzi R**, Cramer R, Patriarca P, Scheurich P, Dri P: Evidence that tumor necrosis factor-induced activation of neutrophil respiratory burst on biological surfaces is mediated by the p55 TNF receptor. *Blood* (1994); 84: 287-293.

**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 biological surface. *J Cell Biol* (1996); 135(2): 511-522.

**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 leukocytes 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, Root RK: Preparation of cells and materials for functional assays. In *Laboratory manual of neutrophil function* (2-8), Ed. By Raven Press (1986).

**Meyers JB**, Cantiello HF, Schwartz JH, Tauber AI: Phorbol ester-stimulated human neutrophil membrane depolarization is dependent on Ca<sup>2+</sup>-regulated Cl<sup>-</sup> efflux. *Am J Physiol* (1990); 79(4): 1373-1413.

**Moreno** A, Badell E, Van Rooijen N, Druilhe P: Malaria in Immunocompromised Mice: New In Vivo. Model for Chemotherapy Studies. *J Antimicrob Chem* (2001); 45(6): 1847-1853.

**Morgan** D, Capasso M, Musset B, Cherny VV, Rios E et al.: Voltage -gated proton channels maintain pH in human neutrophils during phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009); 106: 18022-18027.

## N

**Nada** A, Grinstein S, Curnutte JT: Abnormal activation of H<sup>+</sup> conductance in NADPH oxidase-defective neutrophils. *Proc Natl Acad Sci* (1979); 90: 760-764.

**Nagaoka** I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M: Synergistic action 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.

**Newberger** PE, Ezekowitz RA: Cellular and molecular effects of recombinant interferon-gamma in chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am* (1988);2: 267-276.

**Newberger** PE, Skalnik DG, Jopkins PJ, Eklund EA, Curnutte JT: Mutation in the promoter region of the gene for gp91phox in X-linked chronic granulomatous disease with decreased expression. *J Clin Invest* (1994); 1205-1211.

**Newman** SL, Gootee L, Brunner G, Deepe GS: Chloroquine induces human macrophage killing of *Histoplasma capsulatum* by limiting the availability of intracellular iron and is therapeutic in a murine model of histoplasmosis. *J Clin Invest* (1994).

## O

**Odds** FC, Van Nuffel L, Gow N: Survival in experimental *Candida albicans* infections depends on inoculum growth conditions as well as animal host. *Microbiology* (2000); 146: 1881-1889.

**Odeberg** H, Olssen I: Antimicrobial cationic proteins of human granulocytes. *J Clin Invest* (1975); 56: 1118-1124.

**Odeberg** H, Olsson I: Microbicidal mechanism of human granulocytes: synergistic effects of granulocyte elastase and myeloperoxidase or chymotrypsin-like cationic protein. *Infect Immun* (1976); 14: 1276-1283.

**Ogawa** M: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* (1993); 81: 2844-2853.

**Okochi** Y, Sasaki M, Iwasaki H, Okamura Y: Voltage-gated proton channel is expressed on phagosome. *Biochem Biophys Res Commun* (2009); 382: 274-279.

**Ooi** CE, Weiss J, Elsbach P, Frangione B, Mannion B: A 25-kDa NH<sub>2</sub>-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability-increasing protein. *J Biol Chem* (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-kDa light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998); 85: 3319-3323.

**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); 172(11): 6988-6993.

**Platt** N, Da Silva RP, Gordon S: Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Immunol Lett* (1999); 65: 15-19.

**Pollak** J, Williams D, Gifford M et al.: Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocytes superoxide production. *Nat Genet* (1995); 9: 202-209.

**Porter** CD, Kuribayashi F, Parkar MH, Roos D, Kinnon C: Detection of gp91phox precursors proteins in B-cell line from patient 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 Rap 1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b<sub>558</sub>. *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** BK, Hably C, Meczner A, Timar C, Lakatos G, Enyedi P, Ligeti E: Role of Nox2 in elimination of microorganism. *Semin Immunol* (2008); 30: 237-253.

**Raghoobar** M, Peeters PAM, Van Den Berg WB, Van Ginneken CAM: Mechanism of cell association of chloroquine to leucocytes. *J Pharm Exp Ther* (1986); 239(1): 302-306.

**Raghoobar** M, Huisman JA, van den Berg WB, Riel PL, Van Ginneken CA: Chloroquine interaction with inflammatory human polymorphonuclear leucocytes. *J Pharm Exp Ther* (1987).

**Ramsey** IS, Moran MM, Chong JA, Clapham DE: A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature* (2006); 440: 1213-1216.

**Ramsey** IS, Ruchti E, Kaczmarek JS, Clapham DE: Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009); 106: 7642-7647.

**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<sup>+</sup> flux. *Nature* (2002); 416 (6878): 291-7.

**Rinaldi M**, Moroni P, Paape MJ, Bannerman DD: Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Vet Immunol Immunopathol* (2007); 115: 107-125.

**Rizo J**, Sudhof TC: Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat. rev. Neuro.* (2002); 3: 641-653.

**Roos D**, Van Bruggen R, Meischl C: Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infection* (2003); 5: 1307-1315.

**Rosen H**, Klebanoff SJ: Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J Biol Chem* (1977); 252(14): 4803-4810.

**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); 322 (6074): 32-8.

## S

**Salvesen G**, Farley D, Shuman J, Przbyla A, Reilly C, Travis J: Molecular cloning of human cathepsin G: structural similar to mast cell and cytotoxic T lymphocytes proteinases. *Biochemistry* (1987); 26: 2289-2293.

**San Sebastian E**, Mercero J, Stote RH, Dejaegere A, Cossio FP at al.: On the affinity regulation of the metal-ion-dependent adhesion sites in integrins. *J Am Chem* (2006); 128: 3554-3563.

**Schumann MA**, Leung CC, Raffin TA: Activation of NADPH-oxidase and its associated whole-cell H<sup>+</sup> current in human neutrophils by recombinant human tumor necrosis factor alfa and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Biol Chem* (1995); 270: 124-132.

**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); 58: 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, Scrace 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.

**Segal** BH, Leto TL, Gallin JL, Malech HL, Holland SM: Genetic, biochemical and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine* (2000), 79: 170-300.

**Seeger** RA, Gungor T, Belohradsky BH, Blanche S, Bordigoni P, Dibartolomeo P: Treatment of chronic granulomatous disease with myeloblastic conditioning and unmodified hematopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985-2000. *Blood* (2002); 100: 4344-4350.

**Seeger** RA: Modern management of chronic granulomatous disease. *Br J Haematol* (2008); 140(3): 255-266.

**Seligmann** BE, Gallin JL: Use of lipophilic probes of membrane potential to assess human neutrophil activation. Abnormality in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* (1980); 66: 493-503.

**Sengelov** H, Kyeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N: Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha and beta2) in human neutrophils. *J Clin Invest* (1993); 92: 1467-1476.

**Shafer** WM, Onunka VC: Mechanism 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.

**Sheppard** FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJD, Banerjee A: Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* (2005); 78: 1025-1042.

**Simchowitz** L, De Weer P: Chloride movements in human neutrophils. Diffusion, exchange and active transport. *J Gen Physiol* (1986); 88: 167-194.

**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* (2001); 97: 3951-3959.

**Stankova** L, Drach GW, Hicks TC, Zukoski F, Chvapil M: regulation of some function of granulocytes by zinc of the prostatic fluid and prostate tissue. *J Lab Clin Med* (1976); 88: 640-648.

**Stasia** MJ, Lardy B, Maturana A, Rousseau P, Martel C, Bordigoni P, Demareux 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, Foret D; Brion JP, Post-Bru C, Michel G, Gatel P, Duratnt-Vital D, Voelkel MA, Li XJ, Gulliot M, Maquel E, Martel C, Morel F: Characterization of six novel mutations in the CYBB gene leading to different sub-type 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 granulomatous septique chronic - Chronic granulomatous disease. *La revue de medicine interne* (2009); 30: 221-232.

**Styrt** B, Klempner MS: Alkalinizing the intralysosomal pH inhibits degranulation of human neutrophils. *J Clin Invest* (1983); 71: 1793-1800.

**Styrt** B, Klempner MS: Modification of interactions between neutrophils and staphylococci by lysosomotropic weak bases. *Infec Imm* (1985); 50(2): 415-419.

**Sumimoto** H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, Fukumaki Y, Nakamura M, Takeshige K: Assembly and activation of the phagocytes 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); 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.

**Sundelini** SP, Terman A: Different effects of chloroquine and hydroxychloroquine on lysosomal function in cultured retinal pigment epithelial cells. *APMIS* (2002); 110: 481-9.

## T

**Thomas** RC and Meech RW: Hydrogen ion currents and intracellular pH in depolarized voltage-clamped snail neurones. *Nature* (1982); 299: 826-828.

**Tschesche** H, Pieper M: In *Handbook proteolytic enzyme*, Barrett AJ et al. eds., Academic Press, San Diego (1998): 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.

## V

**Volpp** BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA: Cloning of the cDNA and functional expression of the p47-kDa cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989); 86: 7195-7199.

## W

**Warren** LL, Harrison RE, Grinstin S: Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection* (2003); 5: 1299-1306.

**Weber** SM, Levitz SM, Harrison TS: Chloroquine and the fungal phagosome. *Curr Opin Microbiol* (2000); 3: 349-353.

**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, Dinanuer

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: Interaction between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci* (1994); 3: 1362-73.

## Y

**Yamauchi K**, Tomita M, Giehl TJ, Ellison RT: Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun* (1993); 61: 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 receptor like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes and T cells. *J Exp Med* (2000); 192: 1069-1074.

**Yang TH**, Cleland JL, Lam X, Meyer JD, Jones LS, Randolph TW, Manning MC, Carpenter JF: Effect of zinc binding and precipitation on structures of recombinant human growth hormone and nerve growth factor. *J Pharm Sci* (2000); 89: 1480-1485.

**Yatsuyanagi J**, Iwai K, Ogiso T: Suppressive effect of zinc on some functions of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. *Chem Pharm Bull* (1987); 35: 699-704.

**Yatsuyanagi J**, Ogiso T: Zinc inhibition of respiratory burst in zymosan-stimulated neutrophils: a possible membrane action of zinc. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* (1988); 36: 1035-1040.

**Yu L**, Zhen L, Dinauer MC: Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase Cytocrome b558. *J Biol Chem* (1997); 272: 88-94.

**Yu L**, Zhen L, Dinauer MC: Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase Cytocrome 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 NADPH oxidase in granulocytic cells expressing a delta 488-497 gp91phox deletion mutation. *Blood* (1999); 94: 2497-2504.

## **Z**

**Zaworski PG, Gill GS:** Precipitation and recovery of proteins from culture supernatants using zinc. *Anal Biochem* (1988);173: 440-444.