

**Neutrofiilin fagolysosomaalisten hapettavien aineiden toksisuus
Escherichia colia kohtaan**

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Biokemian laitos

Joulukuu 2019

Reijo Niemi

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

Luonnontieteiden ja tekniikan tiedekunta

NIEMI, REIJO:

Fagolysosomaalisten hapettavien aineiden
toksisuus *Escherichia coli* kohtaan

Pro gradu –tutkielma, 32 s., 7 liites.

Biokemia

Joulukuu 2019

Fagosytoosi on prosessi, jossa immuunijärjestelmän solut–keskeisimpinä neutrofiilit, monosyytit ja makrofagit–ottavat sisään ja tuhoavat patogeenejä. Fagosyytti ympäröi kohteensa solukalvolla ja ottaa sen sisään sytoplasmaan fagosomiksi kutsutun vakuolin sisällä. Sytoplasmassa fagosomi yhdistyy antimikrobiaalisia aineita sisältäviin lysosomeihin ja rakkuloihin muodostaen fagolysosomin, jossa kohde tuhoetaan joko hapestä riippuvaisissa tai riippumattomissa prosesseissa. Happiyhdisteistä keskeisiä ovat NADPH-oksidaasin valmistamasta superoksidista dismutaatioreaktiolla muodostuva vetyperoksidi (H_2O_2) ja myeloperoksidaasin (MPO) valmistama hypokloorihapoke (HOCl).

H_2O_2 :n, HOCl:n ja MPO:n tehoa tarkasteltiin eri konsentraatioilla ja bakteeripitoisuuksilla ja eri pH-arvoissa. Koeorganismina käytettiin *Photorhabdus luminescensin* lusiferaasigeeneillä transfektoituja *Escherichia coli* K12 -soluja, joiden bioluminesenssia seuraamalla saatiin tietoa tappoprosessin etenemisestä.

Yhdisteiden tappokäyrissä havaittiin eroja, jotka saattavat viitata erilaisiin tappomekanismeihin. H_2O_2 -pitoisuuden kasvu johti tehokkaampaan tappoon, kun taas HOCl-konsentraation kasvulla ei ollut vaikutusta. HOCl:llä suurempi bakteeripitoisuus heikensi tappoa, kun taas H_2O_2 :lla bakteeripitoisuus ei vaikuttanut merkittävästi tappotehoon. MPO-reaktioissa tappo oli korkeilla pH-arvoilla H_2O_2 :n kaltaista, mutta tehostui merkittävästi alemmilla pH-arvoilla, mikä viittaa MPO:n inhibitioon korkeissa pH:issa. H_2O_2 -tappoon pH ei vaikuttanut merkittävästi, mutta HOCl:llä alempi pH tehosti tappoa huomattavasti.

ASIASANAT: fagosytoosi, kolibakteerit, myeloperoksidaasi, neutrofiilit

Sisältö

Tiivistelmä

1 JOHDANTO

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Synnynnäinen immuniteetti

2.1.1 Komplementti

2.2 Fagocytoosi

2.2.1 Neutrofiilien granulopoiesi ja fagolysosomin muodostuminen

2.2.2 Neutrofiilien ekstravasaatio

2.2.3 NADPH-oksidaasi

2.2.4 Myeloperoksidaasi

2.2.5. Muut hapesta riippuvaiset yhdisteet

2.2.6. Hapesta riippumaton tappo

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4 TULOKSET

5 POHDINTA

6 KIRJALLISUUS

1 JOHDANTO

Modernin immunologian harjoittamisen katsotaan usein alkaneen Louis Pasteurin työstä tautien syntyperän ja rokotteiden parissa 1800-luvun lopulla. Hän popularisoi ajatuksen mikrobeista taudinaiheuttajina, kehitti rokotteen vesikauhua ja pernaruttoa vastaan, ja auttoi kumoamaan Aristoteleen ajoista lähtien voimassa olleen ajatuksen spontaanista sikiämisestä, jonka mukaan elämä syntyy spontaanisti elottomasta aineesta, esimerkiksi karpäsen toukat kuolleesta lihasta tai kirput pölystä (Smith 2012). Mitään näistä hän ei kuitenkaan tehnyt yksin tai edes ensimmäisenä. Ensimmäisen rokotteen kehitti Edward Jenner jo 1700-luvun lopulla, havaittuaan että isorokkoa vastaan voidaan immunisoida huomattavasti vähemmän vaaralliselle lehmärokolle altistamalla (Smith 2011). Pasteurin pernaruttorokote taas perustui kilpailijansa Henri Toussaintin työhön, minkä Pasteur piti salassa esitellessään tuloksiaan ja myydessään rokotetta (Smith 2012). Vuonna 1876 Robert Koch todisti kokeillaan pernaruton aiheutuvan mikrobeista, ja näin osoitti että mikrobit ovat syy tartuntatauteihin eivätkä seurausta niistä. Toistaessaan Kochin kokeet kaksi vuotta myöhemmin, Pasteur unohti mainita Kochin roolin löydöksessä. Spontaanin sikiämisen ajatuksen kumoamisessa Pasteur kuitenkin oli keskeinen tekijä, osoittaessaan että steriloituun näytteeseen ei ilmesty mikrobeja kuukausienkaan jälkeen jos se on eristetty ilmasta (Smith 2012).

Alan kehityksen kannalta tärkeä oli Elie Metchnikoffin meritähden toukkien liikettä tarkkaillessaan saama oivallus, että samankaltaiset liikkuvat solut voisivat osallistua organismin puolustukseen tunkeilijoita vastaan (Metchnikoff 1905). Hän julkaisi ensimmäiset tuloksensa fagosyyttisestä teoriasta vuonna 1884, ja omisti seuraavat 25 vuotta sen kehittämiseen. Teoria aiheutti välittömästi suurta vastustusta, ja johti kahden kiivaasti yhteenottavan leirin muodostumiseen: Metchnikoffin ympärille keskittyneisiin lähinnä Ranskalaisiin soluvasteen puolestapuhujiin, joiden mukaan immuniteetti perustuu pääasiassa fagosytoiviin makrofageihin ja granulosyytteihin, ja Robert Kochin johtamiin humoraalisen vasteen roolia korostaviin pääosin Saksalaisiin tutkijoihin. Kiistassa oli huomattavia poliittisia ja nationalistisia piirteitä, ja kuten edellisen vuosikymmenen alussa käyty Saksan-Ranskan sota jolle se vaikutti olevan akateemista jatkoa, kiista päättyi lopulta Saksalaisten voittoon vuosisadan loppuun mennessä. Tämän seurauksena fagosytoosi jäi lähes huomiotta alan tutkimuksessa yli 50 vuoden ajaksi (Silverstein 2009).

Neutrofiilit ovat yksisoluisien mikro-organismien fagosytointiin ja tuhoamiseen erikoistuneita leukosyyttejä, jotka toimivat osana synnynnäistä immuunivastetta. Ne tunnistavat kohteensa joko suoraan konservoituneiden molekyyliarakenteiden perusteella, tai komplementin tai vasta-aineiden opsonisaation perusteella. Sitoutuminen kohteeseen johtaa sen ottamisen solun sisään fagosomissa, johon sotysolissa sijaitsevat lukuisia eri yhdisteitä sisältävät rakkulat fuusioituvat. Samanaikaisesti neutrofiilin hapenkulutus kasvaa merkittävästi, ja solu muodostaa suuria määriä superoksidia joka dismutoituu vetyperoksidiksi. Tämä toimii yhdessä kloridi-ionin kanssa lähtötuotteena myeloperoksidaasi-entsyymille reaktiossa, jossa muodostuu hypokloorihapoketta, jota yhdessä vetyperoksidin kanssa pidetään keskeisenä tekijänä neutrofiilien oksidatiivisessa tapossa. Tämä työ tarkastelee eri olosuhteiden vaikutuksia aineiden kykyyn tappa gram-negatiivinen malliorganismi *Escherichia coli*, ja pohtii syitä havaituille eroille.

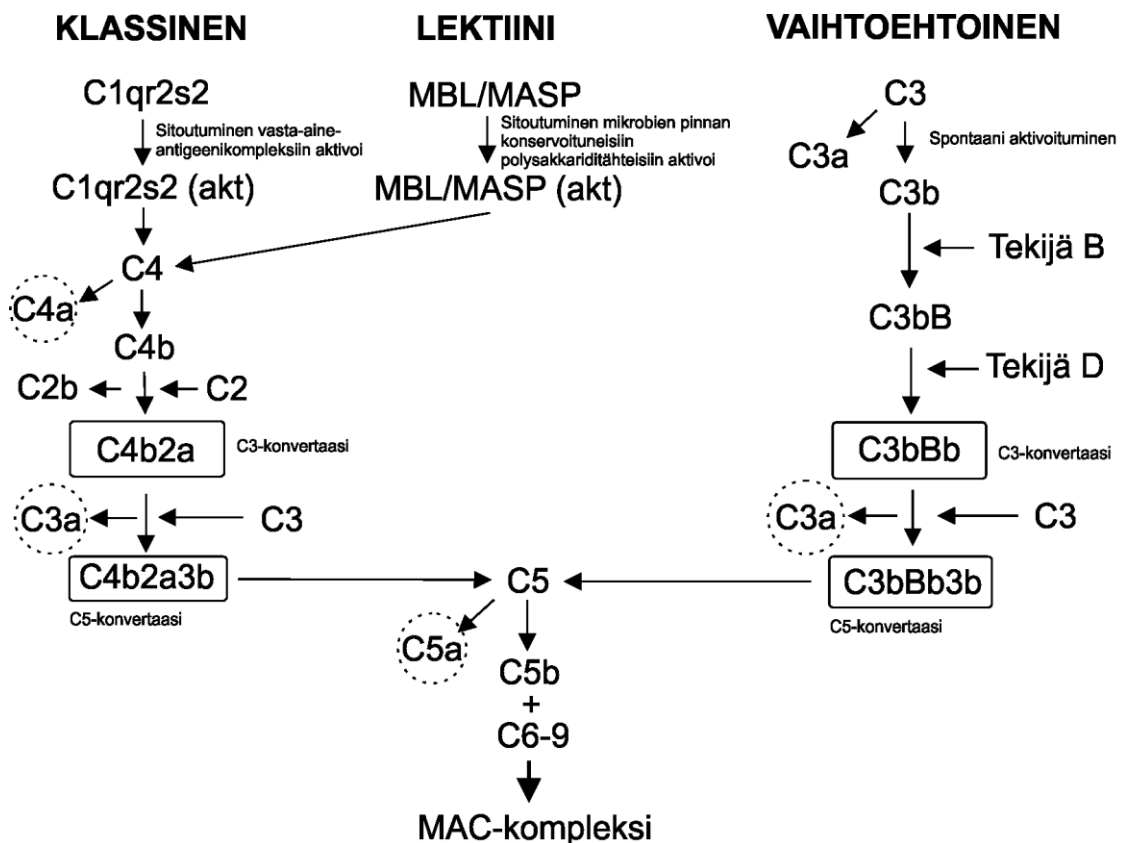
2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Synnynnäinen immunitetti

Synnynnäinen immuunivaste koostuu fysiologisista ja kemiallisista esteistä, sekä solullisesta ja humoraalisesta vasteesta. Fysiologisina esteinä toimivat ihon, limakalvojen ja avoeriterauhasten epiteelit, ja kemiallisina näiden pintojen alhainen pH ja niille erittyvät antimikrobiaaliset entsyymit, peptidit ja rasvahapot. Nämä esteet läpäiseviä patogeenejä kohtaan laukaistaan solullinen ja humoraalinen vaste, joka alkaa minuuttien sisällä altistumisesta, ja koostuu fagosytoivista ja antimikrobiaalisia yhdisteitä erittävistä soluista sekä komplementin komponenteista (Owen, Punt et al. 2013, Coico, Sunshine 2015).

2.1.1 Komplementti

Komplementti koostuu useista pääosin maksassa tuotetuista seerumin proteiineista, jotka kiertävät veressä ja kudostesteissä inaktiivisessa muodossa, kunnes ne aktivoituvat ja aloittavat itseään vahvistavan ketjureaktion. Aktivoituminen voi tapahtua kolmea eri reittiä, jotka kaikki johtavat kalvoon hyökkäävän kompleksin (membrane attack complex, MAC) muodostumiseen ja kohteen lyysaantumiseen. Klassinen reaktiotie alkaa komplementin C1-komponentin C1q-alayksikön sitoutumisella vasta-aine-antigeeni-kompleksiin, joten se toimii osana hankittua immunitettä. Vasta-aineena voi olla IgM ja jotkin IgG:t, erityisesti IgG₃. Sitoutuminen aktivoi C1r-alayksikön, joka leikkaa C1s:n, joka puolestaan leikkaa C4:n C4a:ksi ja C4b:ksi. C4b sitoutuu C2:een ja tekee sen alttiiksi C1s:n leikkaamiselle, jolloin se hajoaa C2a:ksi ja C2b:ksi. C2a sitoutuu C4b:hen ja muodostaa C4b2a:n, klassisen reaktiotien C3 konvertaasin. Lektiniereaktiotiessä mannoosia sitova lektiini (mannose-binding lectin, MBL) sitoutuu vasta-aineista riippumattomasti konservoituneisiin terminaalisiin polysakkariditähteisiin. Tämä aktivoi MBL:n yhteydessä olevat seriiniproteaasit (MBL-associated serine proteases, MASPs), jotka pilkkovat C2:n ja C4:n, muodostaen C4b2a C3-konvertaasin klassista reaktiotietä vastaavasti. Vaihtoehtoinen reaktiotie aktivoituu monen vieraan aineen toimesta sekä spontaanisti, ja se onkin jatkuvasti heikosti aktiivinen. Reaktiotien aloittaa C3:n spontaani hajoaminen ja C3b:n kiinnittyminen kohdesolun pintaan. Kiinnittymisen puuttuessa se inaktivoituu nopeasti. Seerumin proteiini tekijä B liittyy solun pintaan kiinnittyneeseen C3b:hen ja muodostaa C3bB:n. Tekijä D leikkaa tekijä B:n Ba:ksi ja Bb:ksi, joista jälkimmäinen jää kompleksiin C3b:n kanssa, muodostaen C3bBb:n, vaihtoehtoisen reaktiotien C3-konvertaasin. C3-konvertaasien muodostuttua reaktiotiet etenevät toisiaan vastaavasti, leikkaamalla C3:n C3a:ksi ja C3b:ksi, joista jälkimmäinen liittyy C3-konvertaasiin muodostaen C5-konvertaasin. C5-konvertaasi leikkaa C5:n C5a:ksi, joka on voimakas tulehduksen edistäjä, ja C5b:ksi, joka kiinnittyy solun pintaan ja toimii muodostuvan MAC-kompleksin keskuksena. C6 sitoutuu C5b:hen stabiloiden sen, ja C7 sitoutuu muodostuneeseen kompleksiin ankkuroiden sen solun ulkokalvoon. C8:n sitoutuminen C5b67:een johtaa kompleksin ankkuroitumiseen syvemmälle solukalvoon, ja lopulta useita C9-molekyylejä polymerisoituu kompleksiin muodostaen transmembraanisen kanavan, joka johtaa solun osmoottisen tasapainon häiriintymiseen ja solun kuolemaan (Owen, Punt et al. 2013, Coico, Sunshine 2015) (Kuva 1).



Kuva 1. Kaavakuva komplementin kalvohyökkäyskompleksin muodostumisesta. Ohessa syntyvät tulehdusta edistävät tekijät ympyröity katkoviivoin.

Komplementin keskeinen tehtävä on tuottaa opsonoivia fragmentteja, jotka kerääntyvät patogeenein pinnalle ja edistävät fagosyyttien kykyä ottaa sisään ja tuhota kohteitaan. Opsoniineina toimivat C3b, C4b ja iC3b, ja niitä tunnistavia fagosytoosia edistäviä reseptoreita ovat CR1, CR3 ja CR4. Komplementin komponentit C5a ja C3a ja vähemmässä määrin C4a ovat myös tärkeitä anafylatoksiineja, eli tulehdusta edistäviä molekyylejä. Ne aktivoivat verisuonten endoteelisoluja tehden ne läpäisevämmiksi, jolloin kudokseen pääsee nestettä ja sen mukana leukosyyttejä, vasta-aineita ja komplementin komponentteja. Anafylatoksiinit ovat myös kemotaktisia neutrofiilejä kohtaan (Owen, Punt et al. 2013, Coico, Sunshine 2015).

Lyysiksen, opsonoinnin ja tulehduksen edistämisen lisäksi komplementti edesauttaa myös hankitun immuniteetin toimintaa. B-solut ilmentävät CR2/CD21-reseptoria, joka pystyy sitomaan C3d:tä ja C3dg:tä, jotka ovat sitoutuneet B-solun tunnistamaan antigeeniin. Tämän ansiosta B-solu pystyy sitomaan antigeenin samanaikaisesti sekä vasta-aine-reseptorin että komplementtiresptorin välityksellä, mikä alentaa B-solun aktivaatioon vaadittavaa ärsykettä merkittävästi. Komplementin komponentit C3dg ja iC3b osallistuvat myös B-muistisolujen kypsymiseen. Imukerästen itukeskusten follikulaariset dendriittisolut ilmentävät näitä tunnistavia komplementtiresptoreita CR1 ja CR2, joiden välityksellä ne voivat sitoa C3dg:n ja iC3b:n opsonoimia antigeeni-vasta-aine-komplekseja ja esitellä niitä itukeskuksen B-soluille.

Komplementti toimii myös immuunikompleksien ja apoptoottisten solujen käsittelyssä. Immuunikompleksit syntyvät kun vasta-aineet sitoutuvat multivalentteihin antigeneihin ja nämä kasaantuvat suuriksi komplekseiksi, jotka saattavat kerääntyä kudoksiin ja aiheuttaa tulehdustilan. Tämän estämiseksi C3b sitoutuu komplekseihin, häiriten niitä koossa pitäviä sidoksia, jolloin ne hajoavat pienemmiksi kappaleiksi jotka makrofagit fagosytoivat ja hajottavat. C3b mahdollistaa myös CR1:tä ilmentävien erytrosyyttien sitoutumisen komplekseihin, jolloin ne voivat kuljettaa immuunikompleksit maksaan ja haimaan makrofagien fagosytoitaviksi. Apoptoosissa solut hajoavat pienemmiksi solumembraanin ympäröimiksi apoptoottisiksi kappaleiksi, joiden pinnalla on DNA:n kappaleita ja normaalisti kalvon sisäpinnalla olevaa fosfatidyyliseriiniä. C1q sitoutuu DNA:han ja aloittaa klassisen reaktiotien, minkä seurauksena kappale opsonoidaan C3b:llä ja fagosyytit tuhoavat sen (Owen, Punt et al. 2013, Coico, Sunshine 2015).

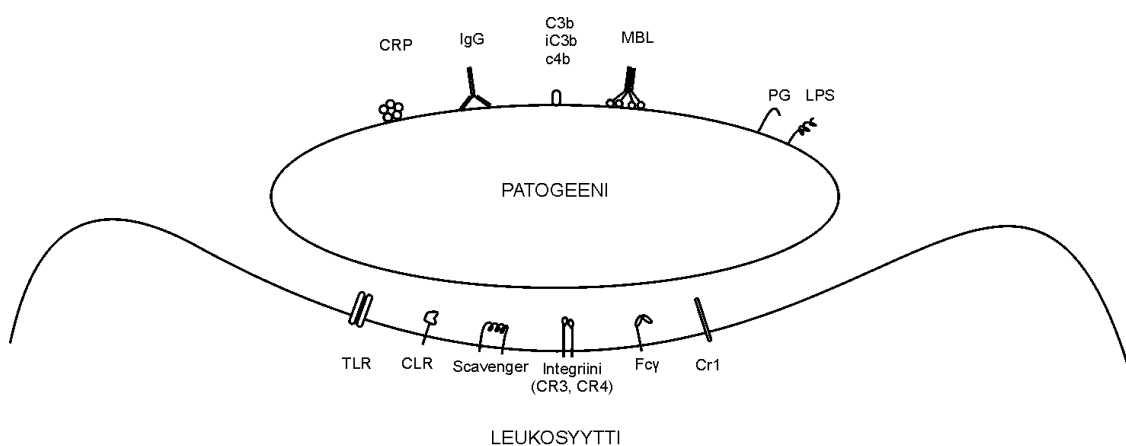
Koska komplementin liiallinen aktivaatio vahingoittaisi isäntää ja ehdyttäisi komponenttivarannot seuraavan infektion varalta, sen toiminta on tarkkaan säädeltyä sekä passiivisten että aktiivisten mekanismien toimesta. Passiivinen säätely on seurausta komplementin komponenttien epästabiiliudesta tai isännän solujen rakenteesta. Vaihtoehtoisen reaktiotien C3 ja C5 -konvertaasit hajoavat nopeasti ilman properdiinin stabiloivaa vaikutusta. C3b:tä hajottavat proteaasit taas sitoutuvat tehokkaammin runsaasti siaalihappoa sisältäviin isäntäsoluihin ja estävät näin komplementin aktivaatiota. Aktiivisista mekanismeista seerumin proteiini C1INH sitoutuu C1r:ään ja C1s:ään saaden ne dissosioitumaan C1q:sta, estäen näin klassisen reaktiotien aktivaation. Se säätelee myös lektiinireaktiotietä inhiboimalla MASP2:ta, ja vaihtoehtoista reaktiotietä inhiboimalla C3bBb:tä. Useat proteiinit säätelevät C3-konvertaasien toimintaa. Hajoamista nopeuttava tekijä (decay-accelerating factor, DAF/CD55), CR1 ja C4:ää sitova proteiini (C4-binding protein, C4BP) nopeuttavat klassisen- ja lektiinireaktiotien C4b2a:n hajoamista komponenteikseen. C2a diffusoituu pois, ja tekijä I hajottaa solun pinnalle jääneen C4b:n. DAF ja CR1 toimivat vastaavalla tavalla vaihtoehtoisen reaktiotien C3bBb:n hajottamisessa, mihin niiden lisäksi tarvitaan tekijä H:ta. Bb diffusoituu pois, ja tekijä I hajottaa solun pinnalle jääneen C3b:n. Kalvoon hyökkäävän kompleksin muodostuminen on myös säädeltyä. CD59 sitoutuu solun pinnan C5b-C8-kompleksiin estäen C9:n polymerisaation. Liukoinen vitronektiini taas sitoo nestefaasiin irronneita C5b6, C5b67, C5b678 ja C5b6789 -komplekseja, estäen niitä sitoutumasta solukalvolle (Owen, Punt et al. 2013, Coico, Sunshine 2015).

2.2 Fagosytoosi

Fagosytoosi on prosessi, jossa syöjäsolu ottaa sisäänsä ja tuhoaa kohteensa, joka voi olla mikrobi tai elimistön oma apoptoottinen tai nekroottinen solu. Synnynnäisen immuunivasteen kannalta keskeisimpiä fagosyyttejä ovat neutrofiilit ja monosyytit veressä sekä makrofagit kudoksissa, minkä lisäksi dendriittisolut osallistuvat antigenein esittelyyn T-soluille, ja ovat siten tärkeässä roolissa adaptiivisen immunitetin aktivoimisessa. Kaikki synnynnäisen immunitetin solut eriytyvät yhteisistä myeloidikantasoluista luuytimessä (Owen, Punt et al. 2013, Coico, Sunshine 2015).

Fagosytoosi aktivoituu lukuisten eri reseptorien välityksellä, jotka joko tunnistavat kohteensa suoraan konservoituneiden molekyylikompleksien (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) perusteella, tai komplementin, vasta-aineiden tai liukoisten proteiinien opsonisaation välityksellä (Kuva 2). Komplementin komponenteista opsoniineina toimivat aiemmin mainitut C3b, iC3b ja C4b, vasta-aineista IgG ja komplementin kautta IgM, ja liukoisista proteiineista mm. C-reaktiivinen proteiini (C-

reactive protein, CRP) ja mannoosia sitova lektiini (mannose-binding lectin, MBL). Ensikosketus patogeeniin johtaa useiden sytokiinien erittymiseen, kuten makrofagien erittämään interleukiini 1:een ja 6:een ja monosyyttien erittämään tuumorinekroositekijään (tumor necrosis factor, TNF)—jotka johtavat muun muassa akuutin vaiheen liukoisten proteiinien synteesiin maksassa, lisääntyneeseen neutrofiilien tuottoon sekä kuumeeeseen—ja makrofagien erittämään interleukiini 8:aan, joka toimii kemotaktisena tekijänä erityisesti neutrofiileille. Patogeenien konservoituneita molekyyliarakenteita ja elion omia vahingoittuneita soluja tunnistavia reseptoreita kutsutaan malleja tunnistaviksi reseptoreiksi (pattern recognition receptor, PRR), joita leukosyyteissä on lukuisia erilaisia. Niitä ovat muun muassa TLR:t, C-tyypin lektiinireseptorit, scavenger-reseptorit ja jotkin integriinit. Opsonoituja kohteita taas tunnistavat Fc γ - ja komplementtiresseptorit CR1, CR3 ja CR4. Kaikki näistä eivät pysty suoraan laukaisemaan fagosytoosia, vaan osallistuvat sen säätelyyn. Fagosytoosin laukaisevia reseptoreita ovat ainakin Fc γ -reseptorit, C-tyypin lektiinireseptori Dectin 1 ja komplementtiresseptorit (Owen, Punt et al. 2013, Coico, Sunshine 2015).



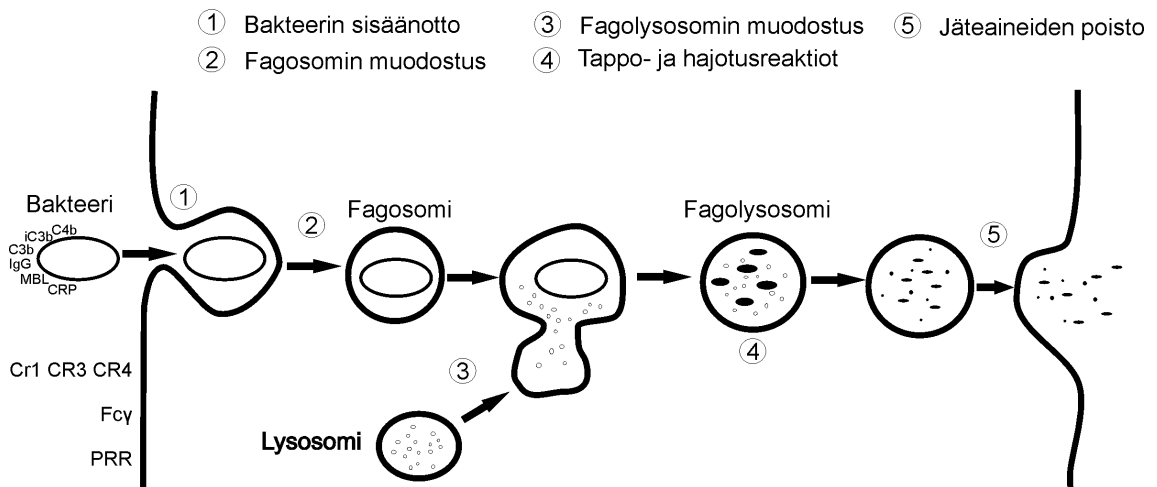
Kuva 2 Fagosytoosiin osallistuvat reseptorit ja niiden tunnistamat kohteet. CRP = C-reaktiivinen proteiini, MBL = mannoosia sitova lektiini, PG = peptidoglykaani, LPS = lipopolysakkaridi, TLR = toll-like reseptori, CLR = C-tyypin lektiinireseptori.

Sisäänotto voi tapahtua kahdella eri mekanismilla, aktivoituvasta reseptorista riippuen (Kaplan 1977). Neutrofiilien ja makrofagien eroista huolimatta kumpikin mekanismi esiintyy molemmissa soluissa, ja suuri osa tutkimuksesta onkin tehty makrofageissa johtuen neutrofiilien geneettisen manipulaation vaikeudesta (Lee, Harrison et al. 2003). Sitoutuminen IgG-opsonoituun kohteeseen saa Fc γ -reseptorien sytoplasmisen domeenin itse reseptorissa tai sen γ -alalyksikössä sijaitsevien aktivointimotiivien (immunoreceptor tyrosine-based activation-motif, ITAM) tyrosiinit fosforyloitumaan, mikä mahdollistaa tyrosiinikinaasi Syk:n sitoutumisen ja viereisten Fc γ -ITAM:ien fosforyloimisen. Tämä johtaa useiden entsyymien aktivaation kautta Arp2/3-kompleksin aktivoitumiseen (Cox, Greenberg 2001). Aktivoitunut Arp2/3 toimii nukleatiokeskuksena aktiinisäikeiden polymerisaatiolle ja paikalliseen solukalvon kurottumiseen opsonoidun kohteen ympärille. Tämä luo uusia reseptori-vasta-aine-kontakteja, jotka johtavat vastaavaan aktiinin polymerisaatioon ja solukalvorintaman etenemiseen, kunnes koko kohde on ympäröity (Griffin, Griffin et al. 1975). Suurten kappaleiden ympäröimiseen fagosyytti saa lisää solukalvoa soluorganellien fuusiolla kasvavan fagosomin tyveen (Huynh, Kay et al. 2007).

Sitoutuminen C3bi-opsonoituun kohteeseen tapahtuu CR3:n välityksellä, ja toisin kuin Fc γ -välitteisessä pseudopodien kurottumisessa kohteen ympärille, opsonoitu kohde

uppoaa suoraan fagosyytin sytoplasmaan (Kaplan 1977). CR3 sitoo mutta ei pysty yksinään fagosytoimaan kohdetta, vaan vaatii aktivoimisen toisen signaalin toimesta. Tällaisena voi toimia sitoutuminen fibronektiinirikkaaseen substraattiin, tai useat liukoiset tekijät kuten PMA (forboli-12-myristaatti-13-asetatti) ja muut proteiinikinaasi C:n aktivaattorit, TNF- α ja lymfokiinit (Wright, Craigmyle et al. 1983, Wright, Griffin 1985, Aderem, Underhill 1999). Komplementtiresptorivälitteisen fagosytoosin mekanismia ei tunneta tarkasti, mutta tarttumisen fagosytoitavaan kohteeseen tiedetään tapahtuvan pistemäisten tarttumiskohtien välityksellä, jotka sisältävät runsaasti useita solun tukirangan proteiineja, F-aktiinia sekä sen yhteydessä Arp2/3-kompleksia, joka osallistuu aktiinisäikeiden nukleatioon ja polymerisaatioon (Allen, Aderem 1996, May, Caron et al. 2000).

Kohteen sisäänotossa muodostuneeseen fagosomiin fuusioituu useita antimikrobiaalisia aineita sisältäviä rakkuloita ja lysosomeja, muodostaen lopullisen fagolysosomin. Organellien mobilisaatio on riippuvaista intrasellulaarisen vapaan Ca⁺-konsentraation noususta (Lew, Monod et al. 1986, Jaconi, Lew et al. 1990), mutta rakkuloiden välillä on eroja. Azurofiiliset rakkulat kohdentuvat muodostuvaan fagosomiin mikrotubuluksista riippuvaisesti jo ennen sen sulkeutumista, kun taas spesifiset rakkulat fuusioituvat solukalvoon satunnaisesti (Tapper, Furuya et al. 2002). Fagosomin muodostumisvaiheessa azurofiilisten rakkuloiden mobilisaatio on riippuvaista kalsiumista, mutta valmiiseen fagosomiin ne fuusioituvat kalsiumista riippumattomasti (Nordenfelt, Winberg et al. 2009) (Kuva 3).



Kuva 3. Fagosytoosin vaiheet. Fagosyytit tunnistavat kohteensa joko IgG:n tai komplementin komponenttien C3b ja C3bi opsonisaation perusteella, tai jonkin mikrobin konservoituneen rakenteen perusteella. Sitoutuminen komplementtiin tapahtuu komplementtiresptorien CR1, CR3 ja CR4 kautta, IgG:hen Fc-reseptorien kautta ja konservoituneisiin rakenteisiin muun muassa Toll-Like Reseptorien ja mannoosireseptorin kautta. Reseptoreihin sitoutuminen aktivoi solun tukirangan aktiinisäikeitä polymerisoitumaan ja venyttämään solukalvon kohteen yli ja se otetaan solun sisään fagosomissa. Sytosolissa fagosomi yhdistyy erilaisia antimikrobiaalisia aineita sisältäviin lysosomeihin ja rakkuloihin ja muodostaa fagolysosomin missä tappaminen tapahtuu. Pidempi-ikäisissä fagosyyteissä jätteet myös poistetaan solun ulkopuolelle ja mikrobifragmentteja voidaan käyttää antigeeniesittelyyn, mutta neutrofiileissä tätä ei tapahdu, vaan ne ajautuvat joko spontaaniin tai reseptorivälitteiseen apoptoosiin ja kierrätetään makrofagien toimesta.

2.2.1 Neutrofiilien granulopoiesi ja fagolysosomin muodostuminen

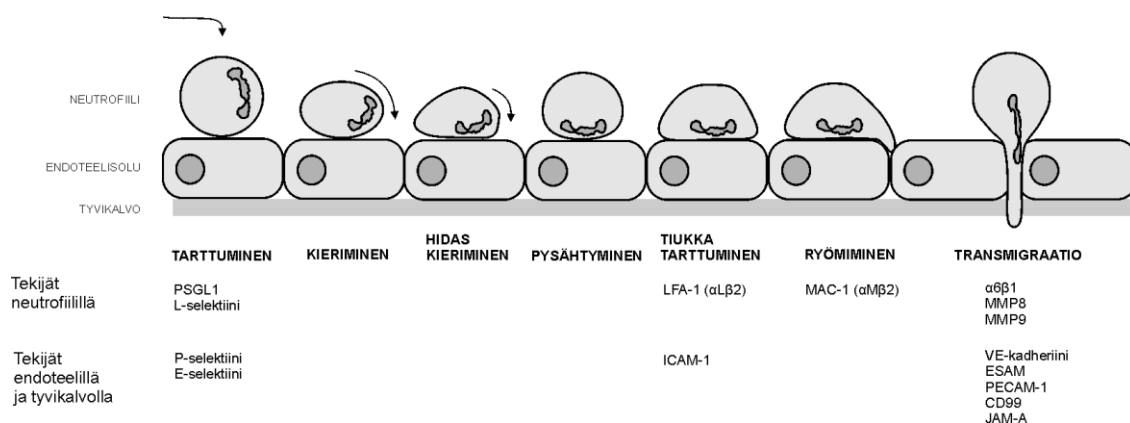
Neutrofiilien hajottava toiminta perustuu lysosomien ja erinäisten antimikrobiaalisia yhdisteitä ja entsyymejä sisältävien rakkuloiden hallittuun fuusioon fagosomin kanssa. Rakkulat sisältävät myös neutrofiilien ekstravasaatioon ja kudoksessa liikkumiseen tarvittavia reseptoreita. Rakkulat muodostuvat neutrofiilien eriytymisen yhteydessä, ja niiden sisältö riippuu muodostumisen hetkellä syntetisoiduista proteiineista (Borregaard, Sehested et al. 1995, Le Cabec, Cowland et al. 1996). Eriytyminen jaetaan kuuteen vaiheeseen solujen morfologian, koon ja rakkulaprofiilin perusteella, järjestyksessä myeloblasteihin, promyelosyytteihin, myelosyytteihin, metamyelosyytteihin, sauvatumaisiin granulosityyhteihin ja kypsiin polymorfonukleaarisiin leukosyytteihin. Rakkuloista muodostuvat ensin runsaasti myeloperoksidia (MPO) sisältävät azurofiiliset rakkulat promyelosyyteissä. Azurofiiliset rakkulat sisältävät myös useita lysosomaalisia entsyymejä (Bainton, Ulliyot et al. 1971). Myelosyyteissä MPO:n tuotto lakkaa, ja myelosyyteissä ja metamyelosyyteissä muodostuu spesifisiä rakkuloita, jotka voidaan tunnistaa korkean laktoferriinipitoisuuden perusteella. Lopulta sauvatumaisissa granulosityyhteissä muodostuu gelatinaasirakkuloita, joille nimensä mukaisesti on ominaista korkea gelatinaasipitoisuus (Borregaard, Sehested et al. 1995). Gelatinaasi (Dewald, Bretz et al. 1982) ja spesifisissä rakkuloissa sijaitseva kollageenaasi (Hasty, Pourmotabbed et al. 1990) ovat solun ulkopuolista matriksia hajottavia metalloproteinaaseja, jotka mahdollisesti edesauttavat solun liikkumista kudoksessa. Gelatinaasirakkuloissa on myös tyvikalvoa hajottavaa heparanaasia ja CR3 (CD11b/CD18) –reseptoria, jotka osallistuvat neutrofiilin kudokseen siirtymiseen (Mollinedo, Nakajima et al. 1997). Viimeiseksi neutrofiileissä muodostuu sekretorisia vesikkeleitä, joiden membraanit sisältävät runsaasti soluadheesiossa ja ekstravasaatioissa tarvittavia reseptoreja, kuten CR3 (Sengelov, Kjeldsen et al. 1993b) ja CR1 (Sengelov, Kjeldsen et al. 1994), sekä muita neutrofiilien varhaisessa aktivaatioissa keskeisiä proteiineja (Sengelov, Boulay et al. 1994, Detmers, Zhou et al. 1995).

Rakkuloiden ja sekretoristen vesikkeleiden alttius degranulaatioon on päinvastainen muodostumisjärjestyksen kanssa: altistaessa neutrofiilit kasvavalle intrasellulaariselle Ca^{2+} -pitoisuudelle, havaitaan ensin sekretoristen vesikkeleiden ja sen jälkeen gelatinaasirakkuloiden, spesifisten rakkuloiden ja azurofiilisten rakkuloiden mobilisaatio (Sengelov, Kjeldsen et al. 1993a). Sama järjestys on havaittavissa reseptorivälitteisessä eksosytoosissa vasteena tulehduksenvälittäjäaine N-formyyli-metioniinileusyyli-fenyylialaniinille (fMLP) (Sengelov, Kjeldsen et al. 1993a), sekä in vivo tarkastelemalla ekstravasoituja neutrofiilejä imulla aiheutetuissa iholeesioissa (Sengelov, Follin et al. 1995).

2.2.2 Neutrofiilien ekstravasaatio

Patogeenin kohdatessaan kudoksen leukosyytit erittävät tulehdustekijöitä, jotka aktivoivat endoteelisolut tarttumaan verenkierron kiertäviin neutrofiileihin. Aktivoituneet solut vapauttavat varastoitua P-selektiiniä Weibel-Paladen kappaleista minuuttien sisällä ärsykkeestä, sekä alkavat syntetisoida E-selektiiniä (Petri, Phillipson et al. 2008). P- ja E-selektiini sitoutuvat neutrofiilin pinnalla oleviin ligandehinsa, joista keskeisin on P-selektiinin glykoproteiiniligandi 1 (P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL1) (McEver, Cummings 1997). Selektiinien sidos ligandehinsa syntyy ja katkeaa nopeasti, mistä seuraa verenkierron liikkuvan neutrofiilin hidastuminen ja kieriminen epiteelin pinnalla (Muller 2013) (Kuva 4). Neutrofiilit itse ilmentävät L-selektiiniä, joka myös vuorovaikuttaa PSGL1:n kanssa, minkä ansiosta jo epiteeliin sitoutuneet neutrofiilit

voivat edesauttaa toisten neutrofiilien hidastumista ja kierintää (Bargatze, Kurk et al. 1994, McEver, Cummings 1997).



Kuva 4. Neutrofiilien ekstravasaatio. Tulehdustekijöiden aktivoimat endoteelisolut tarttuvat verenkierron neutrofiileihin P- ja E-selektiinien ja PSGL1:n välisillä vuorovaikutuksilla. Vuorovaikutuksen hidastamat solut alkavat kieriä endoteelin pinnalla, mikä aktivoi neutrofiilin integriinivälitteisen tiukan tarttumisen ja sitä seuraavan läpäisykohtaan ryömimisen. Läpäisyssä neutrofiili ohittaa verisuonen seinämän komponentit–endoteelisolut, perisytyt ja tyvikalvon–sarjassa monimutkaisia vuorovaikutuksia useiden eri reseptoreiden ja ligandien välillä.

Kierivät neutrofiilit tulevat kontaktiin epiteelin pinnalla olevan kemotaktisen gradientin kanssa, joka aktivoi ne. Gradientti koostuu muun muassa CXC kemokiinireseptori 2:n (CXCR2) aktivoivista kemokiineistä kuten IL-8:sta (CXCL8) (Middleton, Neil et al. 1997), jotka ovat kiinnittyneet epiteeliin heparaanisulfaatin välityksellä (Massena, Christoffersson et al. 2010). Tiukka tarttuminen epiteeliin ja sitä seuraava epiteelin pinnalla ryömiminen ekstravasaatiokohtaa kohti tapahtuvat neutrofiilin pinnan β 2-integriinien vuorovaikutuksella endoteelin ICAM-1:n (intercellular adhesion molecule 1) kanssa. Tarttuminen on riippuvaista LFA-1:stä (α L β 2, CD11a/CD18) ja ryömiminen Mac-1:stä (α M β 2, CD11b/CD18) (Phillipson, Heit et al. 2006).

Neutrofiilit pyrkivät läpäisemään endoteelin kolmen solun yhtymäkohdista (Burns, Walker et al. 1997). Solujen toisiinsa liittymisessä keskeisiä ovat VE-kadheriinien (vascular endothelial cadherin) homofiiliset vuorovaikutukset, joiden häiritseminen edistää neutrofiilien ekstravasaatiota (Gotsch, Borges et al. 1997). Solujen liittymäkohdat sisältävät runsaasti myös useita muita molekyylejä, jotka osallistuvat neutrofiilien kudokseen siirtymiseen, kuten ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule) (Wegmann, Petri et al. 2006), PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) (Vaporciyan, DeLisser et al. 1993), CD99 (Lou, Alcaide et al. 2007) ja JAM-A (junctional adhesion molecule A) (Nourshargh, Krombach et al. 2006). Ohitettuaan epiteelisolut neutrofiilien on vielä läpäistävä verisuonten tyvikalvo ja sitä ympäröivät perisytyt, mikä tapahtuu kohdista joissa tyvikalvot ilmentävät keskimääräistä vähemmän kollageeni IV:ää ja laminiini 10:ä ja perisytytien väleissä on aukko (Wang, Voisin et al. 2006). Neutrofiilien ja epiteelisolujen välinen homofiilinen PECAM-1-vuorovaikutus lisää neutrofiilien α 6 β 1-integriinin ilmentymistä, joka on laminiinireseptori ja todennäköisesti auttaa tyvikalvon läpäisyssä (Dangerfield, Larbi et al. 2002). Neutrofiilien rakkuloissa sijaitsevat matriksimetalloproteiinaasit, kuten MMP8 (neutrofiilien kollageenaasi) (Lin, Jackson et al. 2008) ja MMP9 (gelatinaasi) (Lin, Jackson et al. 2008, Reichel, Rehberg et al. 2008), osallistuvat neutrofiilien transmigraatioon tyvikalvon läpi, todennäköisesti laajentamalla matalan tyvikalvokomponenttiekspression alueita.

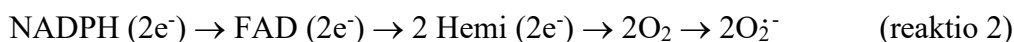
Kudokseen päästyään neutrofiilin on kuljettava pois verisuonen epiteelin kemokiinigradientista. Tämä on mahdollista, koska altistuessaan yhtä aikaa sekä primäärisille että sekundaarisille kemokiineille, neutrofiili kulkee preferentiaalisesti tulehduskohteen välittömästä läheisyydestä saapuvia kemokiinejä kuten fMLP:tä (N-formyyli-metioninileusyyli-fenyylialaniini) ja komplementin komponentti C5a:ta kohti (Foxman, Campbell et al. 1997, Heit, Tavener et al. 2002).

2.2.3 NADPH-oksidaasi

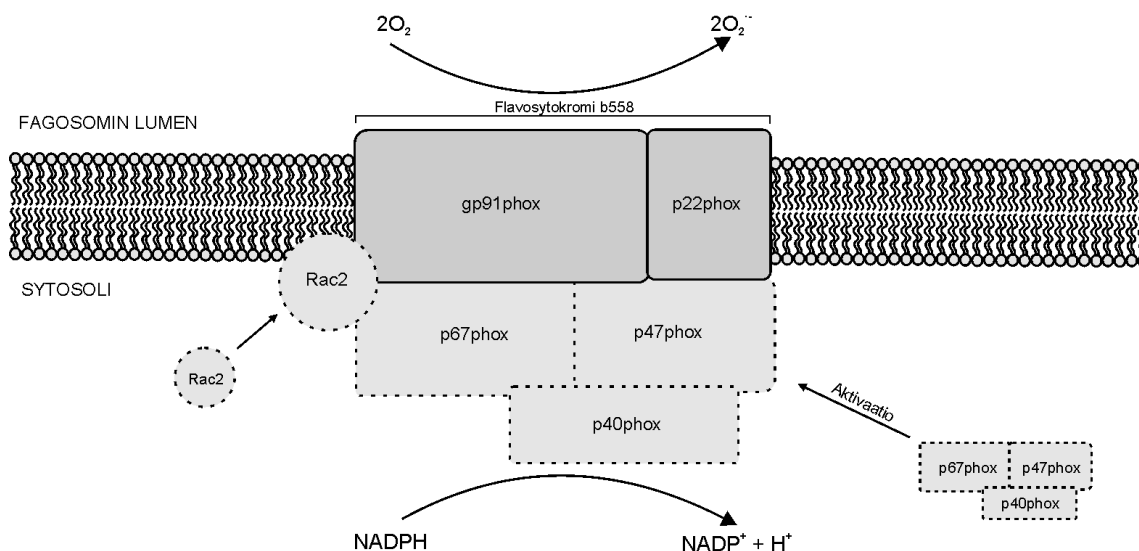
Fagosyyttien NADPH-oksidaasi on kuudesta alayksiköstä koostuva kompleksi, joka aktivoituessaan pelkistää happea superoksidiksi, joka toimii reaktiivisten happiyhdisteiden lähtötuotteena. Inaktiivisessa muodossa kaksi sen alayksiköstä, gp91phox ja p22phox, sijaitsevat solukalvossa ja spesifisten- ja gelatinaasirakkuloiden kalvoissa integraalisena heterodimeerinä, jota kutsutaan flavosytokromi b558:ksi. Loput alayksiköistä—p40phox, p47phox, p67phox ja GTPaasi Rac2—sijaitsevat sytosolissa. Näiden lisäksi GTPaasi Rap1A sijaitsee sytokromi b558:n yhteydessä sekä lepotilassa olevissa että aktivoituissa neutrofiileissa (Quinn, Mullen et al. 1992, Maly, Quilliam et al. 1994), mutta sen roolista NADPH-oksidaasin toiminnassa ei ole selvyyttä. Oksidaasin aktivointi tapahtuu fosforyloimalla p47phox, joka vastaa p40phox-p47phox-p67phox-kompleksin translokaatiosta solukalvolle ja sitoutumisesta flavosytokromi b558:n p22phox-alayksikköön (Heyworth, Curnutte et al. 1991) (Kuva 5). Sitoutuminen tapahtuu p47phox:n kahden SH3 (Src homology 3) -domeenin—jotka ovat inaktiivisessa entsyymissä autoinhiboituneina C-terminaalisen emäksisen alueen kanssa—ja p22phox:n runsaasti proliinia sisältävän alueen välityksellä (Leto, Adams et al. 1994). Rac2 siirtyy solukalvolle muista sytosolin komponenteista erillään (Heyworth, Bohl et al. 1994). Aktivoitunut NADPH-oksidaasi katalysoi hapen pelkistämistä superoksidiksi hapettamalla NADPH:ta (reaktio 1).



Mahdollisen mallin mukaan elektronit siirtyvät NADPH:lta gp91phox:n prosteettiselle FAD:lle p67phox:n (Han, Freeman et al. 1998, Nisimoto, Motalebi et al. 1999) ja Rac2:n (Diebold, Bokoch 2001) välityksellä, ja edelleen yksi kerrallaan gp91phox:n kahdelle peräkkäiselle prosteettiselle hemille, ensin sytosolin puoleiselle ja sitten solukalvon fagosomaalisella puolella olevalle, joka lopulta pelkistää kaksi happimolekyyliä superoksidiksi, (Cross, Curnutte 1995, Cross, Segal 2004) (reaktio 2).



Muodostunut superoksidi dismutoidaan nopeasti vetyperoksidiksi (H_2O_2), joka muunnetaan edelleen muiksi reaktiivisiksi happiyhdisteiksi, tärkeimpänä hypokloorihapoke (HOCl).



Kuva 5. NADPH-oksidaasi. Inaktiivisen oksidaasin gp91phox- ja p22phox- alayksiköt sijaitsevat integraalisena kompleksina (flavosytokromi b558) solukalvolla ja loput alayksiköistä sytosolissa. Entsyymin aktivoituessa p47phox- alayksikkö fosforyloituu ja siirtää sytosolissa sijaitsevan kompleksin flavosytokromi b558:n yhteyteen, missä p47phox- alayksikön SH3-domeenit sitoutuvat p22phox- alayksikön proliinirikkaaseen alueeseen. Aktivoitunut NADPH-oksidaasi pelkistää happea superoksidiksi NADPH:ta hapettamalla. Mahdollisen mallin mukaan elektronit siirtyvät NADPH:lta p67phox- ja Rac2- alayksikköjen kautta gp91phox:in prosteettiselle FAD:lle ja edelleen prosteettisten hemien välityksellä solukalvon yli kahdelle fagosomaaliselle hapelle, pelkistäen ne superoksidiksi.

NADPH-oksidaasin optimaalinen toiminta on riippuvaista oksidaasin yhteydessä sijaitsevasta jänniteohjatusta H_v1 -protonikanavasta. Elektronien siirtyminen sytosolin NADPH:lta fagosomaaliselle hapelle johtaa membraanin depolarisaatioon ja elektroninsiirron pysähtymiseen ilman varauksen tasaamista, mikä tapahtuu siirtämällä protoneja H_v1 :n kautta fagosomiin tai solun ulkopuolelle (Jankowski, Grinstein 1999, DeCoursey, Morgan et al. 2003). H_v1 estää myös sytosolin happamoitumisen NADPH-oksidaasin toiminnassa vapautuvien protonien johdosta, sekä fagosomin liiallisen alkalisoitumisen superoksidin dismutaatioissa kuluvien protonien johdosta (El Chemaly, Okochi et al. 2010).

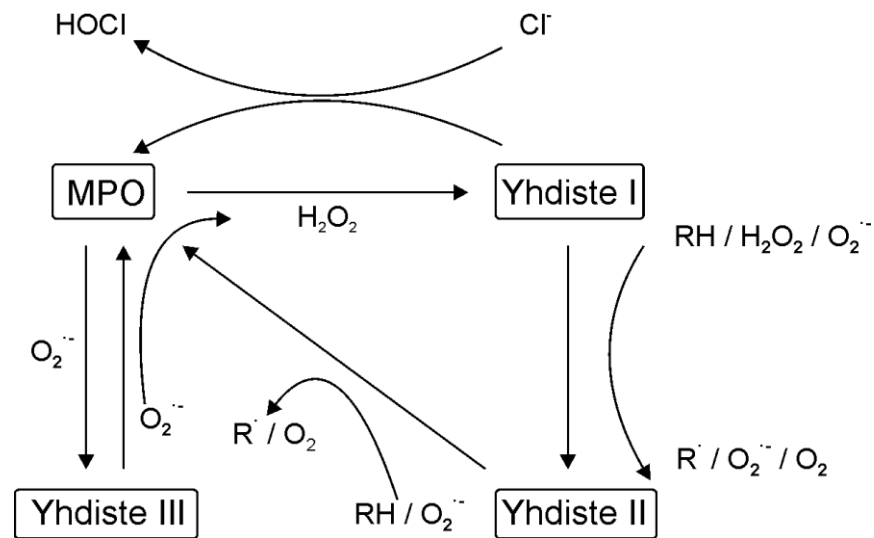
NADPH-oksidaasiin liittyy perinnöllinen sairaus, krooninen granulomatoosi (chronic granulomatous disease, CGD), joka aiheutuu mutaatioista yhdessä tai useammassa phox- alayksikössä, ja johtaa leukosyyttien kykenemättömyyteen muodostaa superoksidia ja siten toistuviiin vakaviin bakteri- ja sieni-infektioihin. Länsimaissa yleisin muoto—noin 70 % tapauksista (Roos, Kuhns et al. 2010b)—on gp91phox:n mutaatio, joka aiheuttaa X-sidonnaisen peittyvän taudin. Mutaatiot muissa alayksiköissä ovat autosomaalisia peittyvästi periytyviä ja muodostavat länsimaissa kolmanneksen tapauksista (Roos, Kuhns et al. 2010a), mutta maissa joissa suvunsisäiset avioliitot ovat yleisiä, autosomaalisten muotojen osuus nousee merkittävästi suuremmaksi, esimerkiksi Iranissa 87 %:iin (Fattahi, Badalzadeh et al. 2011). Oireiden vakavuus riippuu NADPH-oksidaasin jäljellä olevasta aktiivisuudesta (Koker, Camcioglu et al. 2013). Yleisiä infektiota aiheuttavia patogeenejä ovat *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* ja *Aspergillus*-, *Serratia*-, *Nocardia*- ja *Salmonella*-lajit. Yleisimmät infektiot ovat keuhkokuume (*Aspergillus*), imusolmuketulehdus (*Staphylococcus*) ja ihonalaiskerroksen paise (*Staphylococcus*). Yleisin kuolemaan johtava infektiota on *Aspergillus* aiheuttama keuhkokuume ja sepsis. Yleisesti ottaen CGD:n yhteydessä esiintyvät sieni-infektiot ovat yleisempiä ja vakavampia kuin bakteri-infektiot (Winkelstein, Marino et al. 2000, Chiriaco, Salfa et al. 2015). CGD-potilailla yleistyneet

infektiot ovat tyypillisesti katalaasi-positiivisten organismien aiheuttamia, mikä on johtanut käsitykseen että organismien itse tuottama H_2O_2 saattaisi olla riittävää kompensoimaan NADPH-oksidaasin heikentynyttä toimintaa. Kokeissa, joissa *Aspergillus nidulans* (Chang, Segal et al. 1998) ja *Staphylococcus aureus* (Messina, Reeves et al. 2002) poistettiin katalaasiaktiivisuus, niiden patogeenisuus kuitenkin säilyi ennallaan, joten ainakaan niiden kohdalla katalaasi-positiivisuus ei vaikuttaisi olevan ratkaisevaa.

2.2.4 Myeloperoksidaasi

Myeloperoksidaasi (MPO) on homodimeerinen entsyymi, jonka disulfididisidoksella toisiinsa liittyneet alayksiköt koostuvat kevyestä ja raskaasta polypeptidiketjusta, joista jälkimmäisessä on proteettinen hemiryhmä (Furtmuller, Zederbauer et al. 2006). H_2O_2 reagoi natiivin Fe(III) MPO:n kanssa, muodostaen yhdiste I:n. Reaktiossa vetyperoksidin yksi happi kiinnittyy rautaan ja toinen poistuu vetenä. Happiatomi saa yhden elektronin hemin raudalta muodostaen $Fe(IV)=O$ -intermediaatin, ja toisen elektronin hemin porfyriinirenkaalta, jolloin syntyy porfyriiniradikaali $Por^{\cdot-}$ (Lee, Calderwood et al. 1985). Yhdiste I hapettaa halidi-ionin X^- kaksiarvoisesti, jolloin MPO palaa perustilaansa Fe(III)...Por ja muodostuu hypohalogenihapoketta HOX (Kuva 6). MPO pystyy hapettamaan kloridia, jodidia, bromidia ja pseudohalidi tiosyanaattia (SCN^-). Tiosyanaatti reagoi näistä selvästi nopeimmin ja kloridi-ioni hitaimmin yhdiste I:n kanssa (Furtmuller, Burner et al. 1998), mutta kloridi-ionin on yleisesti oletettu olevan keskeisin elektronien luovuttaja johtuen sen huomattavasti muita MPO:n substraatteja korkeammasta pitoisuudesta neutrofiileissä. HOCl:n muodostamiseen kuluvalle H_2O_2 :n määrälle on saatu arvoja 28 %:sta 80 %:een (Weiss, Klein et al. 1982, Foote, Goynes et al. 1983, Jiang, Griffin et al. 1997). Myös HOSCN:ää muodostuu merkittäviä määriä (van Dalen, Whitehouse et al. 1997, Furtmuller, Burner et al. 1998), mutta se on merkittävästi HOCl:ää vähemmän reaktiivinen, eikä se todennäköisesti osallistu bakteerien tappoon suoraan. Sen on kuitenkin havaittu lisäävän endoteelisolujen adheesiomolekyylin E-selektiinin, ICAM-1:n ja VCAM-1:n ilmentymistä (Wang, Mahmud et al. 2006), joten sillä saattaa olla rooli neutrofiilien ekstravasaation edistämisessä.

MPO on herkkä substraattinsa H_2O_2 :n aiheuttamalle inaktivaatiolle. Pienillä H_2O_2 -pitoisuuksilla ulkoisten elektroninluovuttajien puuttuessa muodostunut Yhdiste I hapettaa nopeasti ja peruuttamattomasti hemiryhmän tai sitä ympäröivän proteiinin inaktivoiden MPO:n. Tältä suojaavat Yhdiste I:tä pelkistävät elektroninluovuttajat kuten kloridi-ionit ja korkeampi H_2O_2 -pitoisuus. Korkeammat millimolaariset H_2O_2 -pitoisuudet estävät nopean inaktivaation, mutta johtavat hitaampaan inaktivaatioon, jossa vetyperoksidi pelkistää Yhdiste II:a suoraan Yhdiste III:ksi, ja tämä reagoi ylimääräisen vetyperoksidin kanssa muodostaen reaktiivisia yhdisteitä, jotka hapettavat proteiinin ja hajottavat hemin vapauttaen sen raudan (Paumann-Page, Furtmuller et al. 2013).



Kuva 6. MPO:n primäärinen katalyyttinen muoto on yhdiste I, joka muodostuu H₂O₂:n reaktiossa natiivin entsyymin kanssa. Yhdiste I hapettaa halidi-ionin, tässä kloridin, hypohalogenihapokkeeksi kahden elektronin reaktiossa ja palaa samalla perustilaansa. Myeloperoksidaasi voi myös hapettaa useita muita peroksidaasien substraatteja, RH, kahdessa peräkkäisessä yhden elektronin reaktiossa yhdiste I:nä ja yhdiste II:nä. Yhdiste II:a voi muodostua myös reaktiossa ylimääräisen H₂O₂:n tai O₂⁻:n kanssa, jolloin MPO saattaa juuttua muotoon joka ei pysty hapettamaan kloridi-ioneja, mutta O₂⁻ voi pelkistää tämän natiiviin tilaan. Superoksidi voi myös reagoida natiivin MPO:n kanssa muodostaen yhdiste III:n, joka palaa perustilaan toisessa reaktiossa O₂⁻:n kanssa, jossa muodostuu vetyperoksidia (Hampton, Kettle et al. 1998, Klebanoff 2005, Klebanoff, Kettle et al. 2013).

Vaikka HOCl on fagolysosomin hapettavista aineista selvästi sytotoksisin, sen rooli primäärisenä tappavana yhdisteenä on kyseenalaistettu. Virtaussytometrian käyttöönotto diagnostiikassa paljasti aiemmin harvinaiseksi oletetun MPO-vajeen melko yleiseksi ja usein terveysongelmia aiheuttamattomaksi (Parry, Root et al. 1981, Lanza 1998). Lisäksi halidi-ionin hapettaminen yhdiste I:n toimesta on riippuvaista happo/emäs-ryhmästä jonka pK_a on 4.0-4.6 ja jonka optimaalinen aktiivisuus vaatii ryhmän olevan protonoitunut (Bolscher, Wever 1984, Furtmuller, Burner et al. 1998). Neutrofiilin fagolysosomi kuitenkin happamoituu heikosti: pH vaikuttaisi olevan neutraali tai lievästi alkalinen ensimmäiset 15-20 min fagocytoosin jälkeen, jolloin valtaosa taposta tapahtuu, minkä jälkeen tapahtuu lievä happamoituminen noin pH 6.5:een (Segal, Geisow et al. 1981, Cech, Lehrer 1984, Jankowski, Scott et al. 2002). pH-mittauksissa yleisesti käytetyissä fluoresiini johdannaisissa fluoroforeissa on kuitenkin ongelmana niiden alttius klorinaatiolle hypokloorihapokkeen vaikutuksesta, mikä muuttaa niiden fluoresenssiominaisuuksia, jolloin ei ole selvää johtuvatko fluoresenssin muutokset pH:sta vaiko klorinaatiosta (Hurst, Albrich et al. 1984). Fluoroforin hapettuminen voidaan välttää inhiboimalla MPO:n toiminta atsidilla (NaN₃), mutta tämän on havaittu itsessään alentavan pH:ta MPO:n inhiboinnista riippumattomalla mekanismilla, jolloin fagolysosomin alkalinisaatio ei ole havaittavissa (Levine, Duchon et al. 2015). Lisäksi fluoresiinin pK_a, joka on noin 6.4, ei sovellu lievästikään emäksisten pH-arvojen määrittämiseen (Ohkuma, Poole 1978, Foote, Levine et al. 2017). Fagolysosomin oloihin paremmin sopivat fluoroforit kuitenkin vahvistavat ensin tapahtuvan alkalinisaation jopa pH 8.5-9:ään, ja sitä seuraavan lievän happamoitumisen (Levine, Duchon et al. 2015).

MPO-vajeen oireettomuutta ei voida yksiselitteisesti pitää merkinä MPO:n toisarvoisuudesta antimikrobiaalisessa puolustuksessa. Normaalit neutrofiilit, joissa MPO on inaktivoitu atsidilla, ovat vähemmän sytotoksisia kuin geneettisen MPO-vajeen solut (Klebanoff 1970), mikä viittaa siihen että MPO-vajeen yksilöillä on adaptaatioita

jotka kompensoivat MPO:n puuttumista. MPO:n inaktivaatiossa atsidilla muodostuu kuitenkin atsidyyliiradikaalia (Ortiz de Montellano, David et al. 1988), joka saattaa inhiboida myös MPO:sta riippumattomia reaktioita, mikä voisi selittää MPO-inaktivoitujen normaalien solujen heikomman tapon.

2.2.5. Muut hapesta riippuvaiset yhdisteet

Neutrofiilien antimikrobiaaliset toiminnot jaetaan tavallisesti hapesta riippuvaisiin ja riippumattomiin reaktioihin. Hapesta riippuvaisia MPO:n muodostamalle hypokloorihapokkeelle vaihtoehtoisia sytotoksisia aineita ovat hydroksyyliiradikaali $\cdot\text{OH}$, singlettihappi $^1\text{O}_2$ sekä superoksidi ja siitä muodostettu vetyperoksidi.

Hydroksyyliiradikaalin muodostumisreitiksi on esitetty katalyyttisestä raudasta riippuvaista Haber-Weiss-reaktiota ja raudasta riippumatonta reaktiota superoksidin ja hypokloorihapokkeen välillä. Kummassakin tapauksessa hydroksyyliiradikaalin havaitsemista vaikeuttaa sen suuri reaktiivisuus, minkä vuoksi havaitseminen tapahtuu epäsuorasti sen reaktiotuotteiden kautta, tavallisesti käyttäen elektroni-spin resonanssia ja yhdistettä, joka muodostaa radikaalin kanssa pidempi-ikäisen adduktin, usein 5, 5-dimetyyli-pyrroliini N-oksidia (DMPO). DMPO:n kanssa muodostunut addukti ei kuitenkaan ole spesifinen hydroksyyliiradikaalille, ja todennäköisemmin indikoikin superoksidin läsnäoloa (Finkelstein, Rosen et al. 1979). Superoksidi myös hajottaa muodostunutta adduktia, joten sen puuttumista ei voida pitää merkinä hydroksyyliiradikaalin puuttumisesta (Samuni, Black et al. 1988).

Biologisissa järjestelmissä rauta on tyypillisesti katalyyttisesti inaktiivisessa muodossa sitoutuneena proteiineihin: intrasellulaariseen ferritiiniin tai ekstrasellulaarisiin transferriniin ja laktoferriniin. Useat biomolekyylit kykenevät pelkistämään ferritiinin sitomaan rautaa ja vapauttamaan sen (Dognin, Crichton 1975), mutta niiden relevanssiin fagosytoosin yhteydessä *in vivo* ei ole viitteitä. Superoksidi pystyy kuitenkin vapauttamaan ferritiiniin sitoutunutta rautaa muodossa, joka katalysoi $\cdot\text{OH}$:n muodostumista (Biernacki, Swack et al. 1988, Bando, Aki 1990, Biernacki, van Eijk et al. 1984, Reif 1992). Toinen mekanismi $\cdot\text{OH}$:n muodostumiselle on MPO:sta riippuvainen, oletettavasti HOCl:n ja $\text{O}_2^{\cdot-}$:n välisessä reaktiossa syntyvä (Ramos, Pou et al. 1992, Candeias, Patel et al. 1993).

Hydroksyyliiradikaalin korkean reaktiivisuuden vuoksi fagolysosomissa muodostunut $\cdot\text{OH}$ todennäköisesti reagoi fagolysosomaalisten komponenttien kanssa bakteerin sijaan (Dorfman, Adams 1973, Czapski 1984, Buettner 1993). Vetykarbonaatin kanssa muodostuva vähemmän reaktiivinen karbonaattiradikaali kuitenkin diffusoituu pidemmälle fagolysosomissa ja siten mahdollistaa suuremman antibakteriaalisen vaikutuksen (Wolcott, Franks et al. 1994). Se reagoi joidenkin aromaattisten- ja rikkiä sisältävien aminohappojen kanssa, myös osana proteiineja, ja on merkittävästi hydroksyyliiradikaalia vähemmän reaktiivinen antioksidanttien kanssa (Chen, Hoffman 1973, Wolcott, Franks et al. 1994). Hydroksyyliiradikaalin muodostumiseen kuuluu kuitenkin hyvin pieni osa hengitysryöpsähdyksessä käytetystä hapesta, eikä ole osoitettu että sillä tai sen muodostamilla sekundaariradikaaleilla olisi merkittävää osuutta puolustusreaktioissa (Hampton, Kettle et al. 1998, Klebanoff 2005, Prokopowicz, Marcinkiewicz et al. 2012, Klebanoff, Kettle et al. 2013).

Singlettihappi $^1\text{O}_2$ on virittyneessä tilassa oleva happimolekyylili, joka poikkeaa tavallisesta triplettihapesta $^3\text{O}_2$ sen elektronien kvanttitalan perusteella. Kahdesta mahdollisesta singlettitalasta $^1\Delta_g \text{O}_2$:sta ja $^1\Sigma_g^+ \text{O}_2$:sta jälkimmäinen muuntuu nopeasti

matalampienergiseen $^1\Delta_g$ -tilaan, joka on ainoa biologisesti relevantti singlettihappimuoto (Kearns 1971). Neutrofiileissä singlettihapen muodostumista on esitetty tapahtuvan vetyperoksidin ja hypokloorihapokkeen välisessä reaktiossa (Allen, Stjernholm et al. 1972, Kanofsky, Wright et al. 1984, Kanofsky 1989), mutta fysiologisessa pH:ssa muodostunut määrä on ilmeisen alhainen (Kanofsky, Wright et al. 1984). Valtaosa tutkimuksista on tehty mittaamalla $^1O_2 \rightarrow ^3O_2$ -transitiossa syntyvää 1268 nm kemiluminesenssia tai singlettihapen muodostamaa reaktiotuotetta esimerkiksi kolesterolin kanssa, mutta käytetyistä menetelmistä monissa on ongelmia spesifisyydessä tai herkkyudessa (Steinbeck, Khan et al. 1992). Poikkeuksellisen korkea arvo hengitysröyhdyksessä käytetyn hapen konversiolle singlettihapeksi, 19 %, on saatu 9,10-difenyylirantraseenilla (DPA) päällystettyjen lasihelmien fagosytoosissa. Singlettihappi reagoi spesifisti DPA:n kanssa muodostaen DPA-endoperoksidiä, ja DPA:n määrän väheneminen määritetään spektroskooppisesti. Suuri osa muodostuneesta 1O_2 :sta muodostui MPO/H₂O₂/Cl⁻-järjestelmällä (Steinbeck, Khan et al. 1992). Singlettihapen muodostuminen neutrofiileissä on kuitenkin vielä avoin kysymys, muun muassa koska HOCl on suhteellisen epäreaktiivinen H₂O₂:ta kohtaan ja se reagoi herkemmin fagolysosomin runsaslukuisten proteiinien kanssa (Hurst, Barrette 1989, Hampton, Kettle et al. 1998, Klebanoff 2005, Winterbourn, Hampton et al. 2006, Prokopowicz, Marcinkiewicz et al. 2012).

Muiden reaktiivisten happiyhdisteiden lähtötuotteena toimiva superoksidi O₂⁻ voi myös itse vahingoittaa joitain biomolekyyliä, erityisesti 4Fe-4S-klusterin sisältäviä dehydrataaseja. Negatiivisesti varautunut O₂⁻ sitoutuu katalyyttiseen rautaan elektrostaattisesti ja hapettaa sen, jolloin klusteri muuttuu epästabiiliksi ja entsyymi inaktivoituu. *E. colissa* O₂⁻-inaktivaatiolle alttiita dehydrataaseja ovat muun muassa akonitaasi ja fumaraasi, joiden inaktivaatio estää sitruunahappokierron ja siten oksidatiivisen metabolian, sekä jotkin aromaattisten aminohappojen biosynteesiin osallistuvat entsyymit (Miller, Britigan 1997, Imlay 2003, Imlay 2014). Vapautunut rauta voi osallistua hydroksyyli-radikaalin muodostamiseen Fenton-reaktiolla ja siten aiheuttaa mutaatioita (Keyer, Imlay 1996). Rauta-rikkiproteiinien lisäksi superoksidi voi myös inaktivoita yhden prosteettisen raudan sisältäviä proteiineja. O₂⁻ hapettaa Fe²⁺:n Fe³⁺:ksi, joka dissosioituu mutta korvaantuu nopeasti uudella Fe²⁺-ionilla. Dissosiaatio ja assosiaatio toistuvat, mutta jokaisella syklillä on mahdollista että raudan sijaan apoproteiiniin sitoutuu sinkki, mikä käytännössä inaktivoi entsyymin (Imlay 2014).

Superoksidin antimikrobiaaliselle teholle esteenä on sen solukalvon läpäisemättömyys (Hassan, Fridovich 1979). Se pystyy kuitenkin läpäisemään solukalvon protonoituneessa muodossa HO₂ (pK_a 4.8) (Korshunov, Imlay 2002), mutta neutraalissa fagolysosomissa protonoituneen muodon määrä on hyvin vähäinen. Lisäksi aerobisissa organismeissa lähes universaali superoksididismutaasi tekee superoksidin suoran antimikrobiaalisen vaikutuksen epätodennäköiseksi.

Vetyperoksidin roolin neutrofiilien sytotoksisuudessa on usein oletettu rajoittuvan hypokloorihapokkeen muodostamisen mahdollistamiseen. Pienenä varauksettoman molekyylinä H₂O₂ diffusoituu vaivatta ulos fagosomista – mallinnuksen mukaan sitä kerääntyy vain matalia mikromoolimääriä, MPO-vajaisissa soluissakin maksimissaan 30 μM (Winterbourn, Hampton et al. 2006) – minkä on oletettu olevan liian matala tappoon (Imlay, Linn 1986). Se on myös yksinään epäreaktiivinen useimpien orgaanisten molekyylien kanssa korkeasta hapetuspotentiaalista huolimatta, koska vetyperoksidin toimiminen hapettimena edellyttää happi-happi-sidoksen katkaisemisen. Se pystyy kuitenkin superoksidin tavoin vahingoittamaan rauta-rikki-klusterin sisältäviä entsyymejä hyvin pieninä pitoisuuksina (Jang, Imlay 2007). Vetyperoksidin sytotoksisuutta tutkivat kokeet on usein myös tehty huomattavan korkeilla pitoisuuksilla,

koska solujen katalaasi- ja peroksidaasiaktiivisuus tekee pienten pitoisuuksien koeasetelmat hankaliksi. Kuitenkin kokeissa, joissa näiden entsyymien toiminta on estetty *E. colissa*, jo alle yhden mikromoolin pitoisuus saa aikaan huomattavaa DNA-vauriota (Park, You et al. 2005). Mikromolaariset annokset ovat myös millimolaarisia tehokkaampia vaurioittamaan DNA:ta yksikkömäärään suhteutettuna (Nakamura, Purvis et al. 2003). Vetyperoksidi on myös merkittävästi toksisempaa *E. colia* kohtaan joidenkin muiden aineiden kuten syanidin (Woodmansee, Imlay 2002) tai typpioksidin (Pacelli, Wink et al. 1995) yhteydessä. Typpioksidi pysäyttää *E. colin* respiraaation, ja kerääntyneen NADH:n elektronit ohjataan pelkistämään FAD:ia FADH₂:ksi, joka puolestaan pelkistää vapaata rautaa Fe²⁺:ksi ja ajaa näin Fenton-reaktiota (Woodmansee, Imlay 2003).

Vetyperoksidin aiheuttama inaktivaatio ja tappo konsentraation kasvaessa jaetaan kahteen toisistaan eroavaan alueeseen, sekä bakteereissa (Imlay, Linn 1986) että eukaryoottisoluisissa (Kaneko, Kodama et al. 1994). Moodin 1 tappoa tapahtuu pienillä vetyperoksidipitoisuuksilla, ja se on maksimaalista 1 – 2 mM pitoisuudessa. Moodin 2 tappoa tapahtuu korkeissa, yli 10 mM pitoisuuksissa. Moodin 1 tappo on riippuvaista toimivasta metaboliasta ja Fe²⁺-ioneista ja se aiheutuu DNA:han kohdistuvasta vahingosta, kun taas moodin 2 tappo ei riipu metabolian toimivuudesta eikä yhtä suurelta osin DNA-vauriosta vaan todennäköisesti solukalvon vaurioitumisesta ja sytosolin vuotamisesta (Brandi, Fiorani et al. 1989), ja käytetystä kelaattorista riippuen rautakelaatio joko ei vaikuta tappoon tai vahvistaa sitä (Luo, Han et al. 1994). Lisäksi hydroksyyliiradikaalia poistavat H₂O₂ ja pienemmässä määrin etanoli heikentävät moodin 1 tappoa, mutta eivät vaikuta moodin 2 tappoon (Luo, Han et al. 1994). Matalilla pitoisuuksilla vetyperoksidi myös vahingoittaa preferentiaalisesti RTGR (puriini-T-G-puriini)-sekvenssejä (Henle, Han et al. 1999). Syyt eroille eivät ole selviä, mutta keskeinen tekijä vaikuttaa olevan Fe²⁺-ionien koordinaatio DNA-molekyylin kanssa (Luo, Han et al. 1994, Henle, Han et al. 1999). Ehdotetussa mallissa moodin 1 tapossa rauta on löyhästi assosioitunut DNA:n kanssa sen ympärille kerääntyneenä kationipilvenä, jolloin rautakelaattorit pystyvät poistamaan Fe²⁺-ionit ja H₂O₂ pääsee reagoimaan muodostuneen hydroksyyliiradikaalin kanssa muodostaen vähemmän reaktiivista superoksidia (·OH + H₂O₂ → HO₂⁻ + H₂O). Moodin 2 tapossa rauta ja muodostuneet hapettajat ovat tiukemmin sitoutuneina DNA:han, ja vastustuskykyisiä sekä rautakelaatiolle että H₂O₂-vaimennukselle (Luo, Han et al. 1994).

Vetyperoksidin roolista oksidatiivisessa tapossa ei ole selvyyttä, mutta sen muodostamaan uhkaan viittaa organismien pyrkimys pitää sen pitoisuudet erittäin matalina. Ilman ulkoista lähdettä, *E. colin* alkyylhydroperoksidireduktaasi (?) (Ahp) pitää vetyperoksidipitoisuuden alle 20 nM:n. Pitoisuuden noustessa 100 nM:iin, solu aktivoi OxyR-regulonin, mikä nostaa Ahp:n ja katalaasin (hydroperoksidaasi I) ekspressiota (Seaver, Imlay 2001). Ahp⁻-mutanteissa jo tämä määrä on riittävä edistämään spontaania mutageneesiä (Gonzalez-Flecha, Demple 1997).

2.2.6. Hapestä riippumaton tappo

Hapettavien aineiden lisäksi neutrofiilien rakkulat sisältävät myös suuren määrän antimikrobiaalisia aineita, joiden toiminta ei ole hapestä riippuvaista. Antimikrobiaalisia peptidejä on löydetty tuhansia, ja niitä esiintyy jokaisessa eliökunnan domeenissa (Wang, Li et al. 2016). Ne ovat tyypillisesti positiivisesti varautuneita, sisältävät keskimäärin noin 50% hydrofobisia aminohappotähteitä ja niiden rakenteelle on tyypillistä laskostuminen amfipaattisiksi α-helikseiksi ja β-levyiksi (Yeaman, Yount 2003). Nämä ominaisuudet

edesauttavat peptidien selektiivistä kohdentumista mikrobien solukalvoon, joka on tyypillisesti eukaryoottisoluja elektronegatiivisempi (Dathe, Wieprecht 1999, Yeaman, Yount 2003).

Ihmisen neutrofiileissä esiintyy monia hapestä riippumattomia entsyymejä ja peptidejä, jotka todennäköisesti osallistuvat sisään otettujen mikrobien tuhoamiseen. Defensiinit ovat ryhmä pieniä kationisia peptidejä, jotka ovat konservoituneet useiden lajien genomeissa. Ne jaetaan α - ja β -defensiiniperheisiin, joiden aminohapposekvenssit poikkeavat huomattavasti toisistaan, mutta joiden laskostunut muoto on samankaltainen ja jotka kaikki sisältävät kuusi disulfididisidoksin liittyntä kysteiniä jotka stabiloivat β -levyrakenteen (Liu, Zhao et al. 1997). Ihmisen neutrofiileissä esiintyvät defensiinit ovat α -defensiinit HNP1-4, ja ne muodostavat suurilukuisimman proteiinijoukon azurofiilisten rakkuloiden alaryhmässä (Rice, Ganz et al. 1987, Ganz, Lehrer 1994). Niiden antimikrobiaalinen vaikutus on epäspesifinen ja perustuu todennäköisesti kationisten aminohappotähteiden vuorovaikutukseen negatiivisesti varautuneen solukalvon kanssa, hydrofobisen osan työntymiseen kalvon sisään ja jänniteohjattujen kanavien muodostamiseen, mikä johtaa sytosolin komponenttien vuotamiseen ulos solusta (Lehrer, Lichtenstein et al. 1993, Yeaman, Yount 2003). Defensiinit myös sitovat DNA:ta, ja pystyvät aiheuttamaan yhden juosteen katkoksia (Gera, Lichtenstein 1991).

Azurofiiliset rakkulat sisältävät myös neutrofiilien seriiniproteaaseja (NSP) katepsiini G:tä, neutrofiilin elastaasia, proteinaasi 3:a ja neutrofiilin seriiniproteaasi 4:ää (Korkmaz, Moreau et al. 2008, Perera, Schilling et al. 2012). NSP:t varastoidaan azurofiilissä rakkuloissa valmiiksi aktiivisessa muodossa elektrostaattisesti sitoutuneena negatiivisesti varautuneeseen proteoglykaanimatriksiin, joka estää niiden ennenaikaisen toiminnan. Fuusioituminen fagolysosomiin vapauttaa proteiinit ja mahdollistaa niiden tarttumisen sisään otettujen bakteerien solukalvoon (Ganz 1999, Cowland, Borregaard 2016). Suoran tappamisen lisäksi ne tuottavat antimikrobiaalisia peptidejä muita proteiineja leikkaamalla, inaktivoivat bakteerien virulenssitekijöitä ja solun ulkopuolelle eritettynä säätelevät immuunivastetta (Korkmaz, Moreau et al. 2008, Stapels, Geisbrecht et al. 2015).

Yksi NSP:iden leikkaama proteiini on katelisiidiini hCAP-18, ainut ihmisistä löytynyt katelisiidiini-perheen proteiini, joka koostuu konservoituneesta N-terminaalista kateliini-domeenista ja variaabelista C-terminaalista antimikrobiaalisesta domeenista (Cowland, Johnsen et al. 1995). Propeptidi hCAP-18 sijaitsee neutrofiilin spesifisissä rakkuloissa, ja se leikataan proteolyttisesti antimikrobiaaliseksi LL-37-peptidiksi. Vaikka kaikki neutrofiilin seriiniproteaasit pystyvät leikkaamaan hCAP-18:n ja propeptidiä löytyy fagolysosomista, LL-37:ää ei ole löydetty fagolysosomista, joten on mahdollista että se on aktiivinen vain solun ulkopuolelle eritettynä (Sorensen, Follin et al. 2001), missä antimikrobiaalisen vaikutuksen lisäksi se toimii kemotaktisena tekijänä synnynnäisen ja adaptiivisen immuunivasteen soluille (De, Chen et al. 2000). Monien muiden kationisten antibakteeristen peptidien tavoin LL-37:n bakterisidinen vaikutus perustuu solukalvon häiritsemiseen. Se työntyy lipidikaksoiskalvon hydrofobiseen ytimeen ja häiritsee lipidien asyyliketjujen välisiä vuorovaikutuksia, mikä heikentää kalvoa ja johtaa suoraan tai muiden tekijöiden yhteydessä solun kuolemaan (Oren, Lerman et al. 1999, Henzler-Wildman, Martinez et al. 2004).

Bakterisidinen/läpäisevyyttä parantava proteiini (bactericidal/permeability-increasing protein, BPI) on azurofiilissä rakkuloissa sijaitseva kationinen proteiini, jonka aktiviteetti kohdistuu spesifisesti Gram-negatiivisiin bakteereihin, seurauksena sen affiniteetista lipopolysakkarideja kohtaan, jotka ovat Gram-negatiivisten bakteerien ulomman kalvon keskeinen komponentti (Weiss, Elsbach et al. 1978, Gazzano-Santoro,

Parent et al. 1992). BPI:n antibakteerinen vaikutus tapahtuu kahdessa vaiheessa, johtaen ensin kasvun pysähtymiseen ulomman kalvon häiritsemisen kautta (Mannion, Weiss et al. 1990), ja myöhemmin bakterisidiseen vaikutukseen todennäköisesti sisemmän kalvon vahingoittamisen välityksellä (in't Veld, Mannion et al. 1988). Kummankaan vaikutuksen tarkkaa mekanismia ei tunneta, mutta tappo on todennäköisesti seurausta bakteerin oksidatiivisen fosforylaation elektroninsiirtoketjun häiritsemisestä (in't Veld, Mannion et al. 1988). Solun ulkopuolelle eritettynä BPI:llä on myös opsonoiva (Iovine, Elsbach et al. 1997) ja endotoksiinia neutraloiva (Marra, Wilde et al. 1990) vaikutus.

Neutrofiileissä esiintyy myös lukuisia muita hapestä riippumattomia potentiaalisesti antimikrobiaalisia yhdisteitä ja entsyymejä, kuten laktoferriniä (Caccavo, Pellegrino et al. 2002), lysosyymiä (Ragland, Criss 2017), azurosidiinia (Soehnlein, Lindbom 2009) ja kalprotektiinia (Corbin, Seeley et al. 2008). Näistä löytyy perusteellisempi listaus esimerkiksi artikkeleista (Faurichou, Borregaard 2003) ja (Cowland, Borregaard 2016).

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Materiaalit

Kaliumdivetyfosfaatti (KH_2PO_4) ja dinatriumvetyfosfaatti ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), J. T. Baker, Deventer, Alankomaat.

Tryptoni ja hiivauute, Difco laboratories, Detroit, Michigan.

Ampisilliini, glyseroli, natriumkloridi (NaCl), Natriumhypokloriitti (NaOCl) ja vetyperoksidi (H_2O_2), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri.

Myeloperoksidaasi, PLANTA Natural Products, Wien, Itävalta.

3.2 Puskurit

Luria-Bertani-liuos (LB) (10 g/L tryptoni, 5 g/L hiivauute, 5 g/L NaCl , 100 $\mu\text{g/mL}$ ampisilliini, pH 7.4)

Fosfaattipuskuri (sis. 77 mM NaCl) valmistettiin sekoittamalla 0.67 mM kaliumdivetyfosfaattia ja 0.67 mM dinatriumvetyfosfaattia vaihtelevassa suhteessa, jotta pH:ksi saatiin 5.0 – 7.8.

3.3 Solut

Kokeissa käytettiin ampisilliiniresistenttejä *E. coli* K-12 M72 –soluja, jotka oli transformoitu *Photobacterium luminescens* eristetyillä luxABCDE-lusiferaasigeeneillä pEGFP-plasmidissa (*E. coli*-lux) (Atosuo, Lehtinen et al. 2013). Syväjäädetyttyjä soluja kasvatettiin yön yli 5 mL:ssa LB-liuosta 250 rpm ravistuksessa 37 °C lämpötilassa. Kasvatus lisättiin 200 mL:aan LB-liuosta jossa 100 $\mu\text{g/mL}$ ampisilliinia ja kasvatettiin 250 rpm ravistuksessa 37 °C lämpötilassa, kunnes OD_{620} oli 0.4. Solut eristettiin 3000 g

sentrifugoinnilla ja resuspensoitiin kymmenesosaan LB-liuosta jossa 25 % glyserolia ja 100 µg/mL ampisilliinia ja pakastettiin -80 °C lämpötilassa.

3.4 Mittaukset

Hidex Chameleon (Hidex, Turku, Suomi) -> MikroWin 2000 (Mikrotek) -> Excel 2010 (Microsoft) -> Origin 8 (OriginLab)

Hidex Triathler LSC

GE ultrospec 7000

Tappokokeet tehtiin seitsemässä eri pH:ssa välillä 5.0 – 7.8 neljässä eri tilavuudessa välillä 50 µL – 300 µL. Soluja käsiteltiin joko vakiokonsentraatiolla tai vakioainemäärällä H₂O₂:ta, NaOCl:ää tai MPO + H₂O₂:ta 40 minuutin ajan. Soluja käytettiin 10⁵ / reaktio, joten bakteeripitoisuus vaihteli välillä 0.3·10⁶ bakteeria / mL (300 µL) – 2.0·10⁶ bakteeria / mL (50 µL). Vakiokonsentraatiomittauksissa H₂O₂:n pitoisuus oli 100 µM ja NaOCl:n 2 µM. Vakioainemäärämittauksissa käytetty H₂O₂:n määrä oli 10 nmol jolloin pitoisuus vaihteli välillä 33 µM (300 µL) – 200 µM (50 µL), ja NaOCl:n määrä oli 0.2 nmol jolloin pitoisuus vaihteli välillä 0.67 µM (300 µL) – 4 µM (50 µL). MPO + H₂O₂-mittauksissa MPO:n pitoisuus oli aina vakio 0.67 nM ja H₂O₂:n pitoisuus vaihteli kuten edellä.

Reaktiot suoritettiin valkoisessa 96-kuoppalevyssä ja luminesenssi mitattiin 37 °C lämpötilassa Hidex Chameleonilla (Hidex, Turku, Suomi) jota ohjattiin MikroWin 2000 –ohjelmistolla (Mikrotek). Mittauksia tehtiin kaksi rinnakkaista, joiden keskiarvoa verrattiin pelkästään bakteereja sisältäviin reaktioihin. Luminesenssia mitattiin 0.5 s/kaivo 60 s välein. Data käsiteltiin Excel 2010:llä (Microsoft) ja kuvaajat piirrettiin Origin 8:lla (OriginLab). Vastaavat mittaukset tehtiin myös yhden näytteen Hidex Triathler LSC:llä (Hidex, Turku, Suomi).

4 TULOKSET

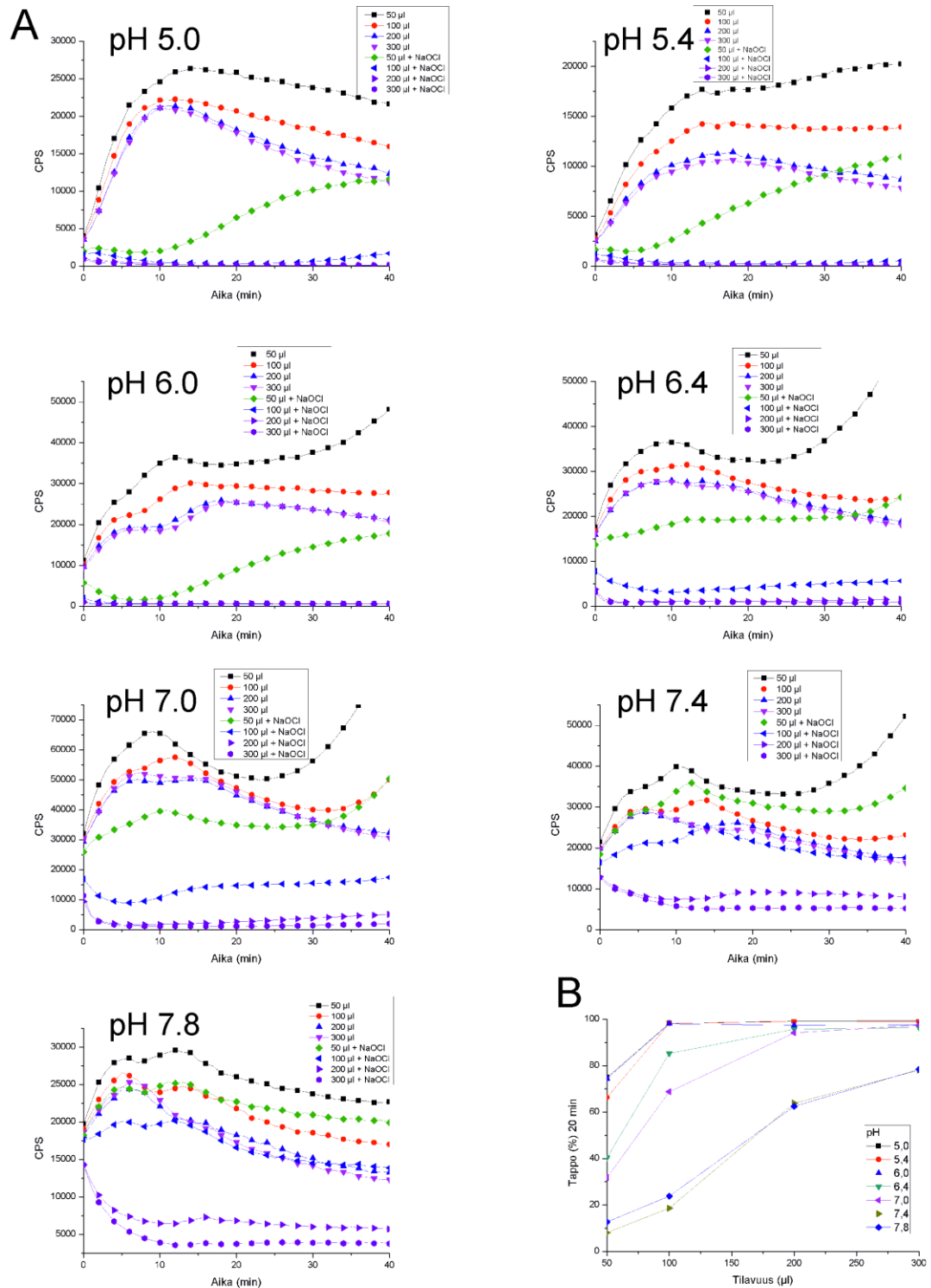
4.1 Luminesenssimittaukset

Tutkittavat antimikrobiaaliset yhdisteet lisättiin bakteerisuspensioihin, jotka oli puskuroitu tiettyyn pH-arvoon. Reaktiot käynnistettiin lisäämällä joko NaOCl:ää tai H₂O₂:ta, ja luminesenssin laskusta nähdään aineiden aiheuttama muutos elossa olevien bakteerien määrässä (Atosuo, Lehtinen et al. 2013). Vakiokonsentraatioisissa reaktioissa voidaan nähdä bakteeripitoisuuden vaikutus tappotehokkuuteen, kun taas vakioainemäärän reaktioissa nähdään tappavan aineen konsentraation vaikutus tappotehoon. Vakiokonsentraatioisen NaOCl:n reaktioista (kuva 7) nähdään, että pienemmissä tilavuuksissa luminesenssi laskee selvästi suurempia tilavuuksia vähemmän, joten bakteeripitoisuuden nousulla on merkittävä NaOCl:n tappotehoa heikentävä vaikutus, ja suurimmalla bakteeripitoisuudella korkeammassa pH:ssa NaOCl:ää sisältävät kaivot eivät ole erotettavissa taustakaivoista. NaOCl-pitoisuus taas ei vaikuta tappotehoon merkittävästi, vaan kaikkien tilavuuksien luminesenssit ovat lähellä toisiaan (kuva 8). Molemmista kuvista nähdään, että tappoteho on huomattavasti parempi matalammassa pH-arvoissa, ja että fysiologisessa pH:ssa tappo on melko heikkoa.

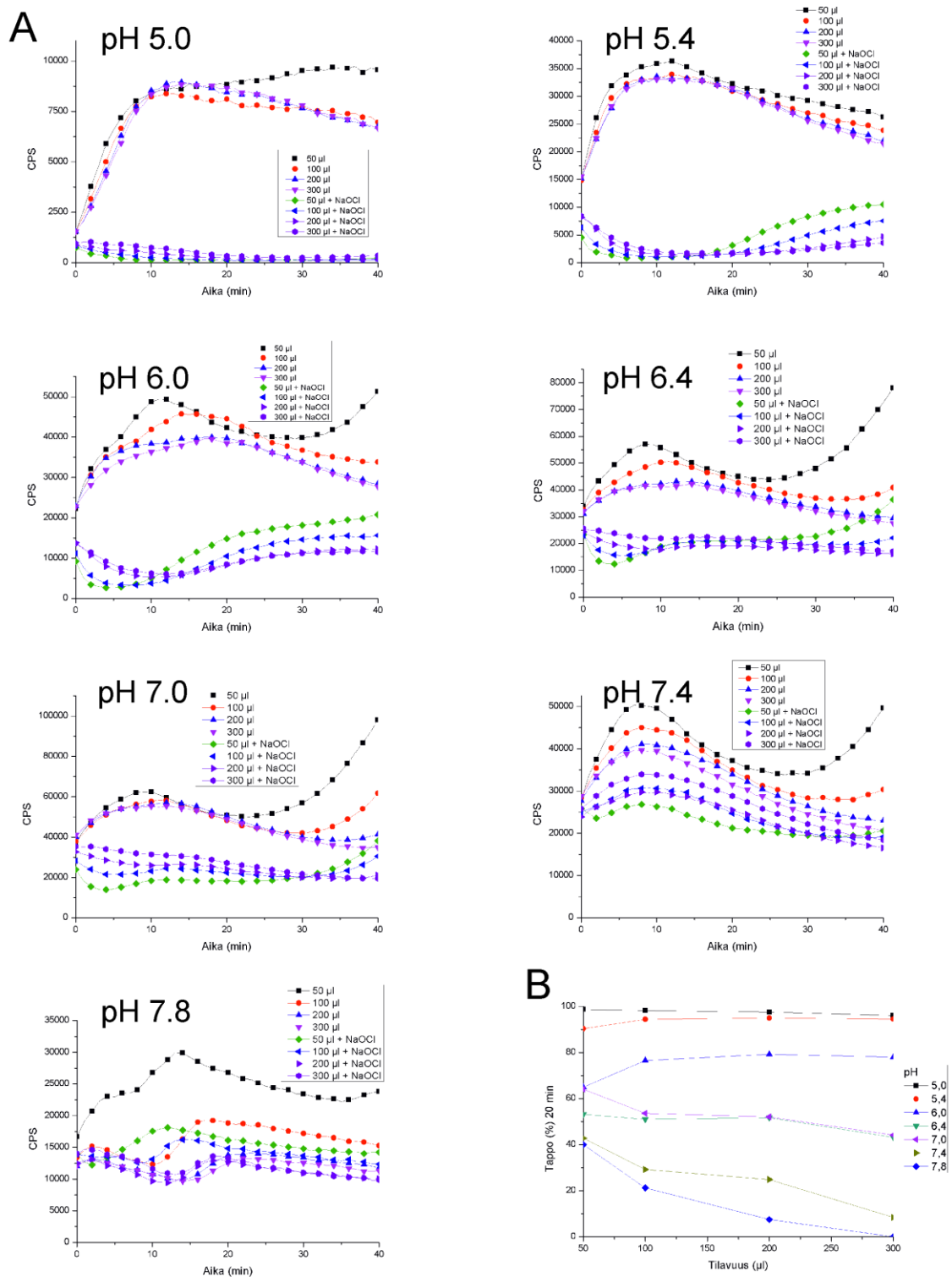
Vakiokonsentraatioisen H_2O_2 :n reaktioista nähdään, että reaktiotilavuudesta riippumatta luminesenssikäyrät ovat hyvin lähellä toisiaan, joten toisin kuin NaOCl:n tapauksessa bakteeripitoisuudella ei ole merkittävää vaikutusta H_2O_2 :n tappoon (kuva 9). Kuvasta 10 taas nähdään, että pienemmissä reaktiotilavuuksissa eli suuremmilla H_2O_2 -pitoisuuksilla tappo on selkeästi tehokkaampaa, mikä on jälleen päinvastainen tulos NaOCl:ään verrattuna. Kuvien 9 ja 10 perusteella pH:lla ei ole merkittävää systemaattista vaikutusta H_2O_2 :n tappotehokkuuteen.

MPO:ta ja H_2O_2 :ta vakiokonsentraatiot sisältävissä reaktioissa (kuva 11) tappo on matalammissa pH-arvoissa niin tehokasta että bakteeripitoisuuden vaikutusta on vaikea arvioida, mutta korkeammassa pH:ssa bakteeripitoisuudella ei ole vaikutusta tappotehokkuuteen. Vakiokonsentraatioisen MPO:n ja vakioainemääräisen H_2O_2 :n reaktioissa tappo on matalassa pH:ssa tehokkaampaa, ja konsentraation vaikutusta on vaikea arvioida; korkeammassa pH:ssa suurempi H_2O_2 -pitoisuus taas parantaa tappoa (kuva 12).

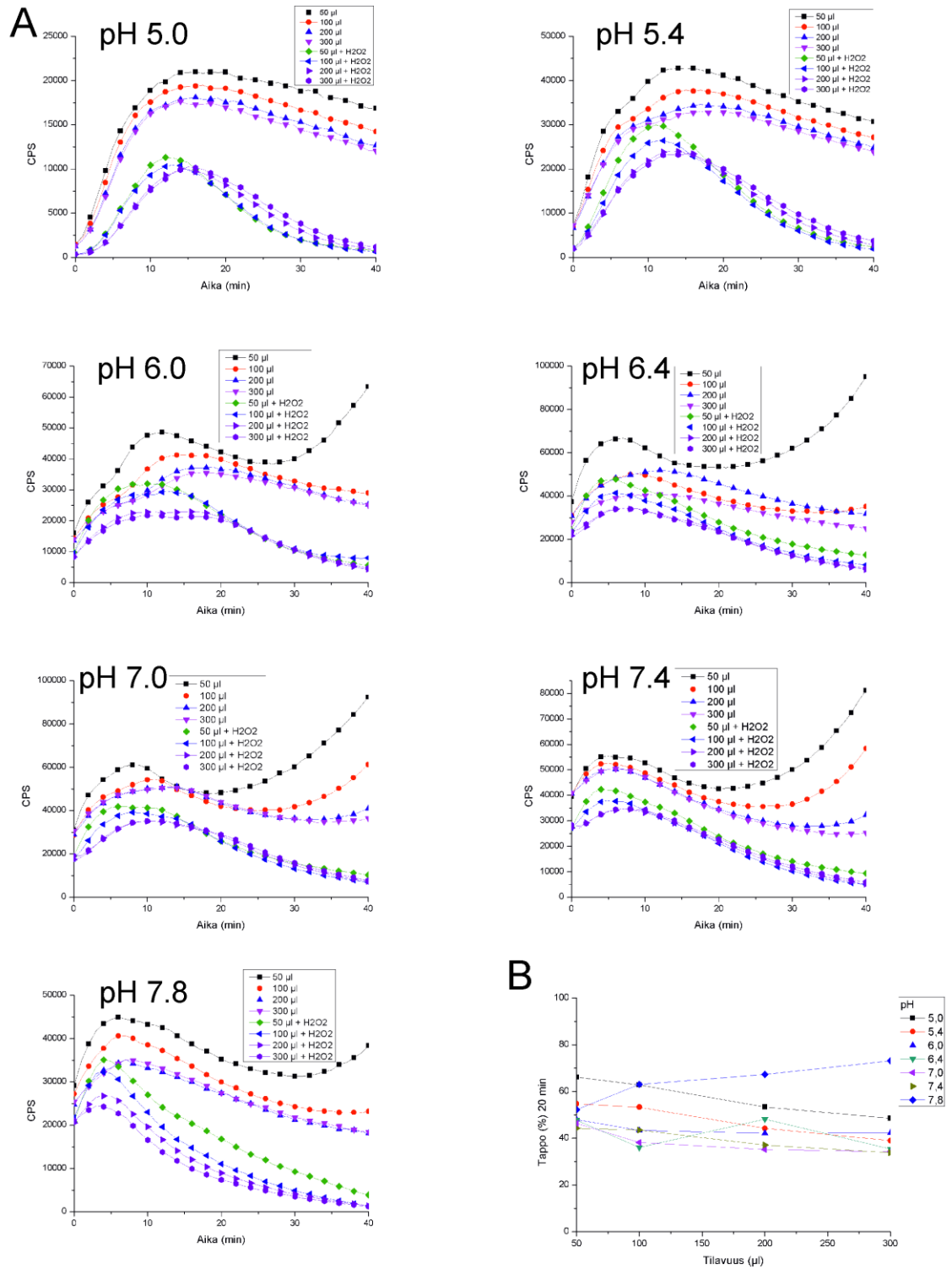
Vastaavat mittaukset tehtiin myös manuaalisesti Hidex Triathler LSC:llä (liite 1).



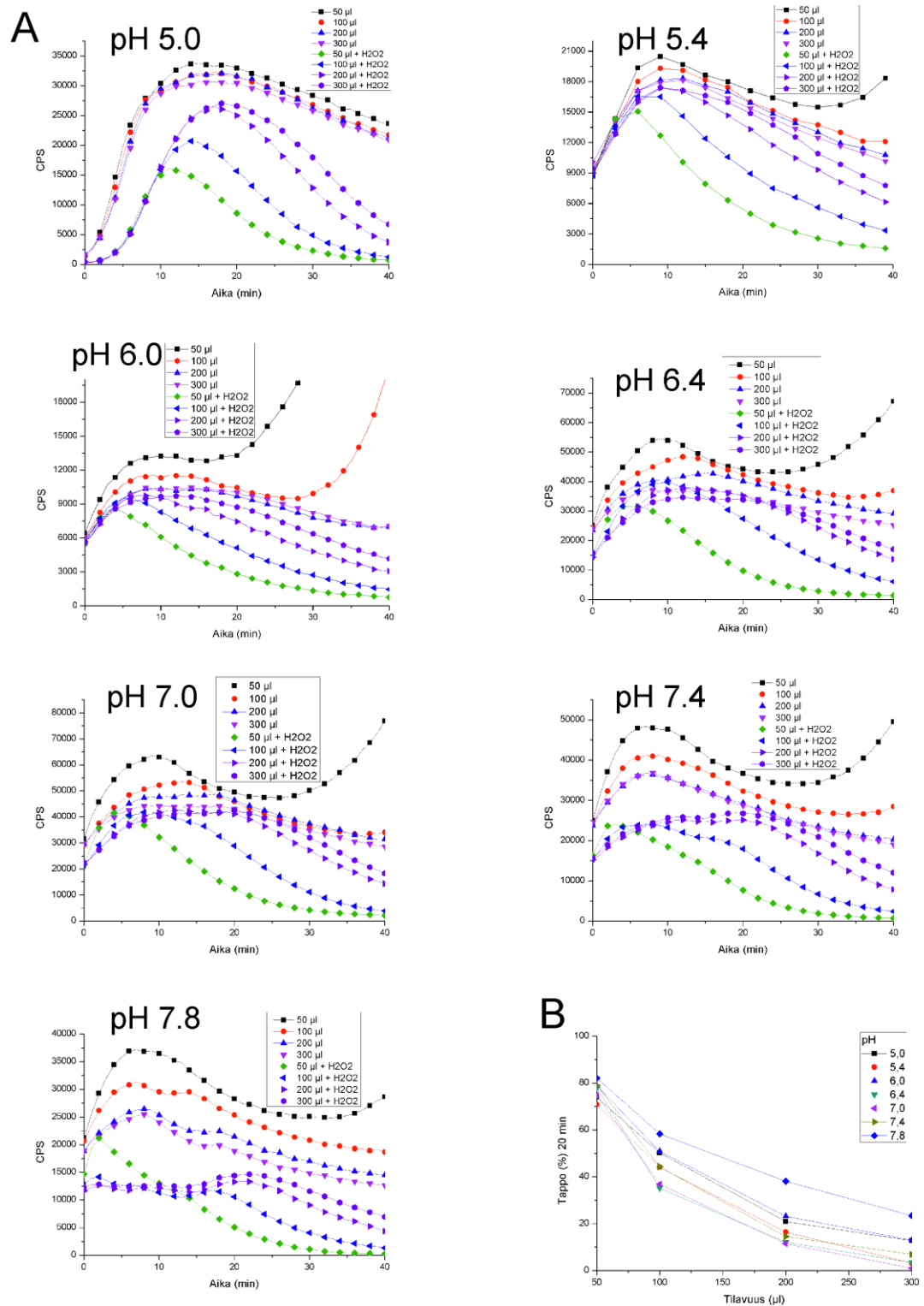
Kuva 7. **A** NaOCl vakiokonsentraatio, pH 5.0-7.8. Pidettäessä NaOCl-konsentraatio vakiona bakteeripitoisuuden muuttuessa reaktiutilavuuden mukaan, nähdään että bakteeripitoisuuden nousu heikentää NaOCl:n tappotehoa merkittävästi. ■: taustareaktio 50 µl ●: taustareaktio 100 µl ▲: taustareaktio 200 µl ▼: taustareaktio 300 µl ◆: tapporeaktio 50 µl, NaOCl 0,2 µM ◀: tapporeaktio 100 µl, NaOCl 0,2 µM ▶: tapporeaktio 200 µl, NaOCl 0,2 µM ●: tapporeaktio 300 µl, NaOCl 0,2 µM. **B** Annosvaste. Tappoprosentti tilavuuden funktiona kussakin pH:ssa 20 minuutin kohdalla.



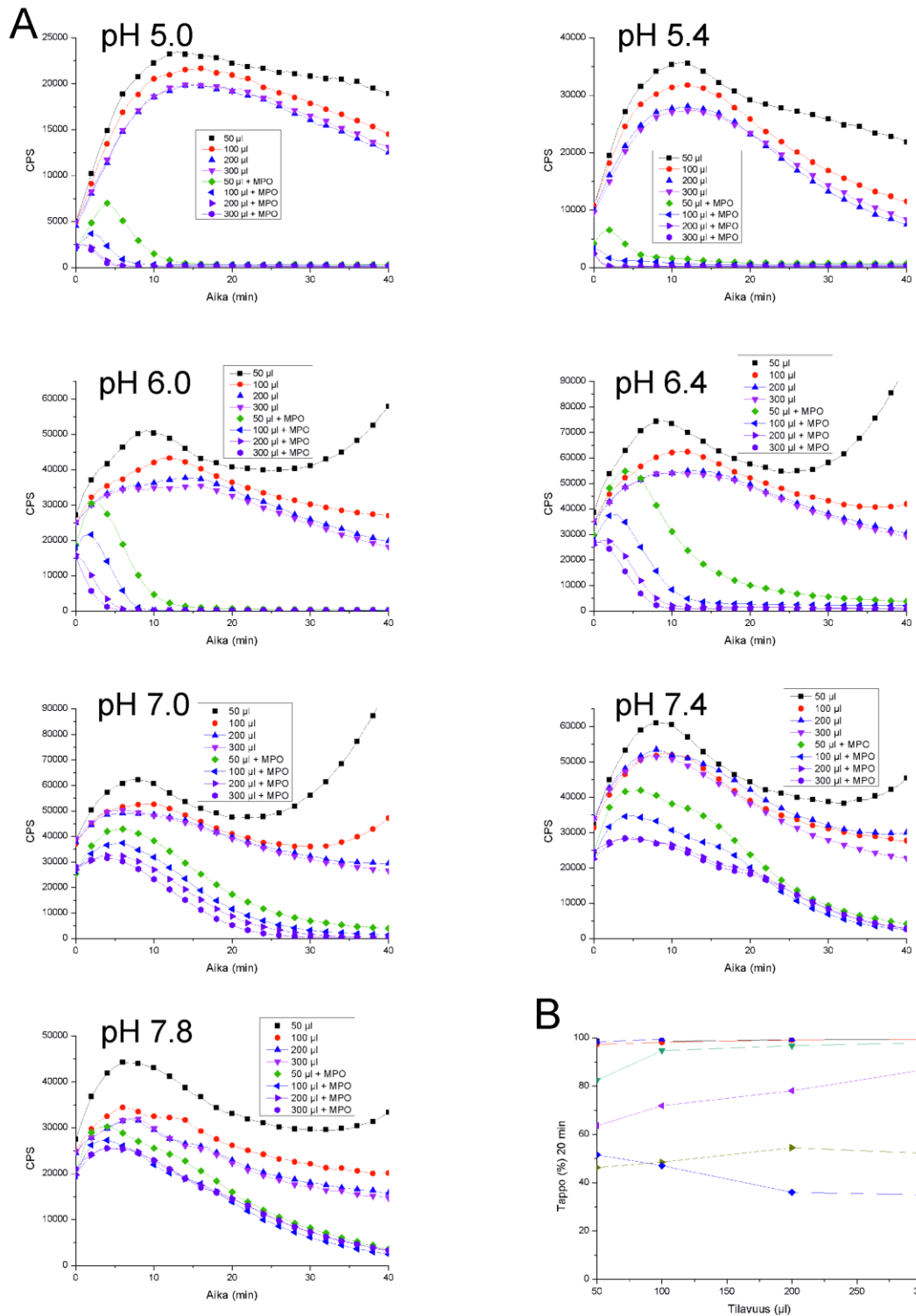
Kuva 8. **A** NaOCl vakioainemäärä, pH 5.0-7.8. NaOCl-konsentraation muutuessa reaktiutilavuuden mukaan, nähdään että konsentraatio ei vaikuta merkittävästi NaOCl:n tappotehoon. ■: taustareaktio 50 µl ●: taustareaktio 100 µl ▲: taustareaktio 200 µl ▼: taustareaktio 300 µl ◆: tapporeaktio 50 µl, NaOCl 4 µM ◀: tapporeaktio 100 µl, NaOCl 2 µM ▶: tapporeaktio 200 µl, NaOCl 1 µM ●: tapporeaktio 300 µl, NaOCl 0,67 µM. **B** Annosvaste. Tappoprosentti tilavuuden funktiona kussakin pH:ssa 20 minuutin kohdalla.



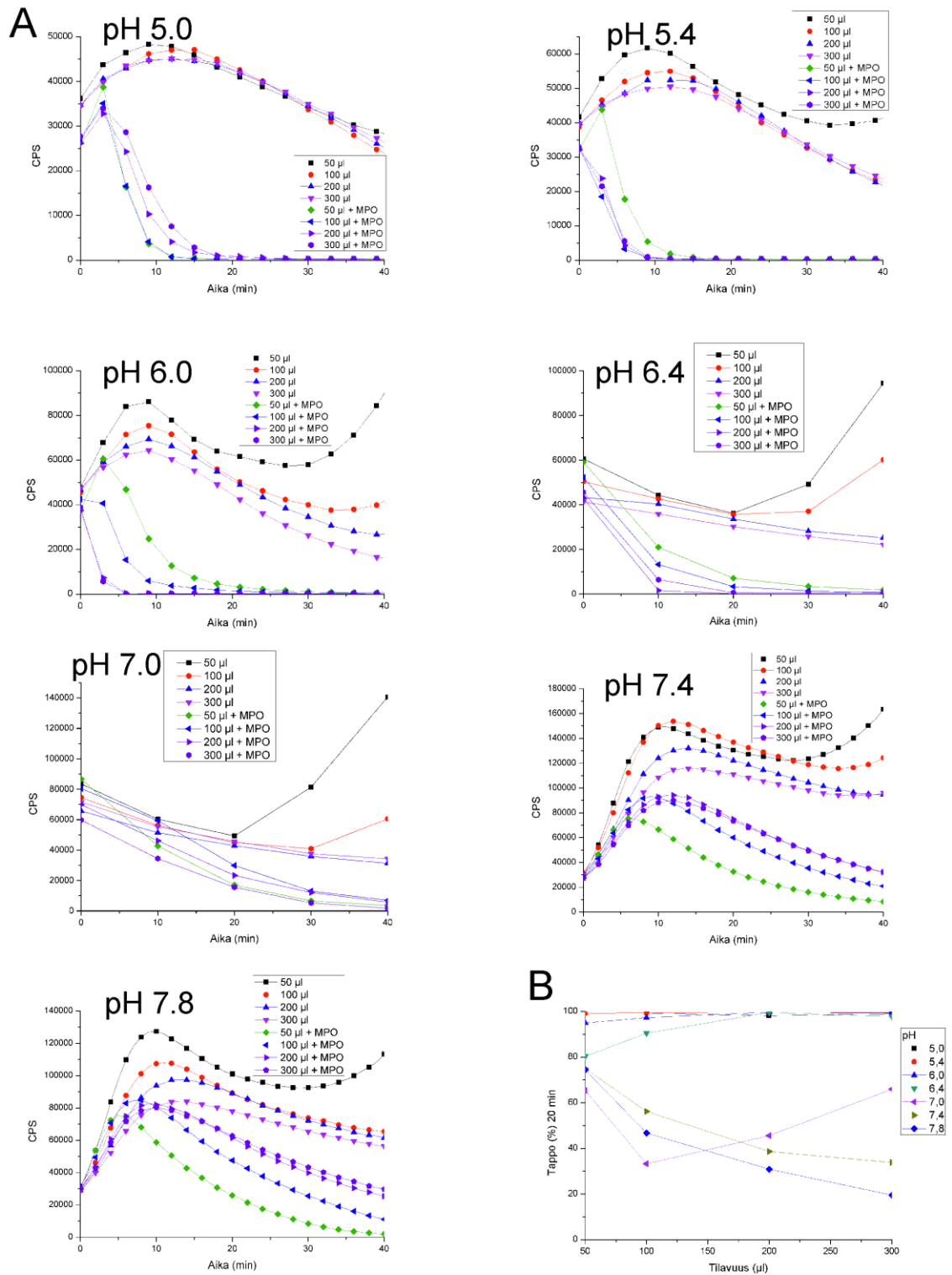
Kuva 9. **A** H₂O₂ vakiokonsentraatio, pH 5.0-7.8. Pidettäessä H₂O₂-konsentraatio vakiona bakteeripitoisuuden muuttuessa reaktiutilavuuden mukaan, nähdään että bakteeripitoisuus ei vaikuta merkittävästi H₂O₂:n tappotehoon. ■: taustareaktio 50 μl ●: taustareaktio 100 μl ▲: taustareaktio 200 μl ▼: taustareaktio 300 μl ◆: tapporeaktio 50 μl, H₂O₂ 100 μM ◀: tapporeaktio 100 μl, H₂O₂ 100 μM ▶: tapporeaktio 200 μl, H₂O₂ 100 μM ●: tapporeaktio 300 μl, H₂O₂ 100 μM. **B** Annosvaste. Tappoprosentti tilavuuden funktiona kussakin pH:ssa 20 minuutin kohdalla.



Kuva 10. **A** H_2O_2 vakioainemäärä, pH 5.0-7.8. H_2O_2 -konsentraation muuttuessa reaktiotilavuuden mukaan, nähdään että konsentraation nousu tehostaa H_2O_2 :n tappotehoa merkittävästi. ■: taustareaktio 50 μl ●: taustareaktio 100 μl ▲: taustareaktio 200 μl ▼: taustareaktio 300 μl ◆: tapporeaktio 50 μl , H_2O_2 200 μM ◀: tapporeaktio 100 μl , H_2O_2 100 μM ▶: tapporeaktio 200 μl , H_2O_2 50 μM ◆: tapporeaktio 300 μl , H_2O_2 33 μM . **B** Annosvaste. Tappoprosentti tilavuuden funktiona kussakin pH:ssa 20 minuutin kohdalla.



Kuva 11. **A** H_2O_2 vakiokonsentraatio, MPO vakiokonsentraatio, pH 5.0-7.8. Bakteripitoisuuden vaikutusta matalassa pH:ssa on vaikea arvioida, mutta korkeassa pH:ssa bakteripitoisuudella ei ole vaikutusta tappotettiin. ■: taustareaktio 50 µl ●: taustareaktio 100 µl ▲: taustareaktio 200 µl ▼: taustareaktio 300 µl ◆: tapporeaktio 50 µl, H_2O_2 100 µM, MPO 0,67 nM ◀: tapporeaktio 100 µl, H_2O_2 100 µM, MPO 0,67 nM ▶: tapporeaktio 200 µl, H_2O_2 100 µM, MPO 0,67 nM ●: tapporeaktio 300 µl, H_2O_2 100 µM, MPO 0,67 nM. **B** Annosvaste. Tappoprosentti tilavuuden funktiona kussakin pH:ssa 20 minuutin kohdalla.

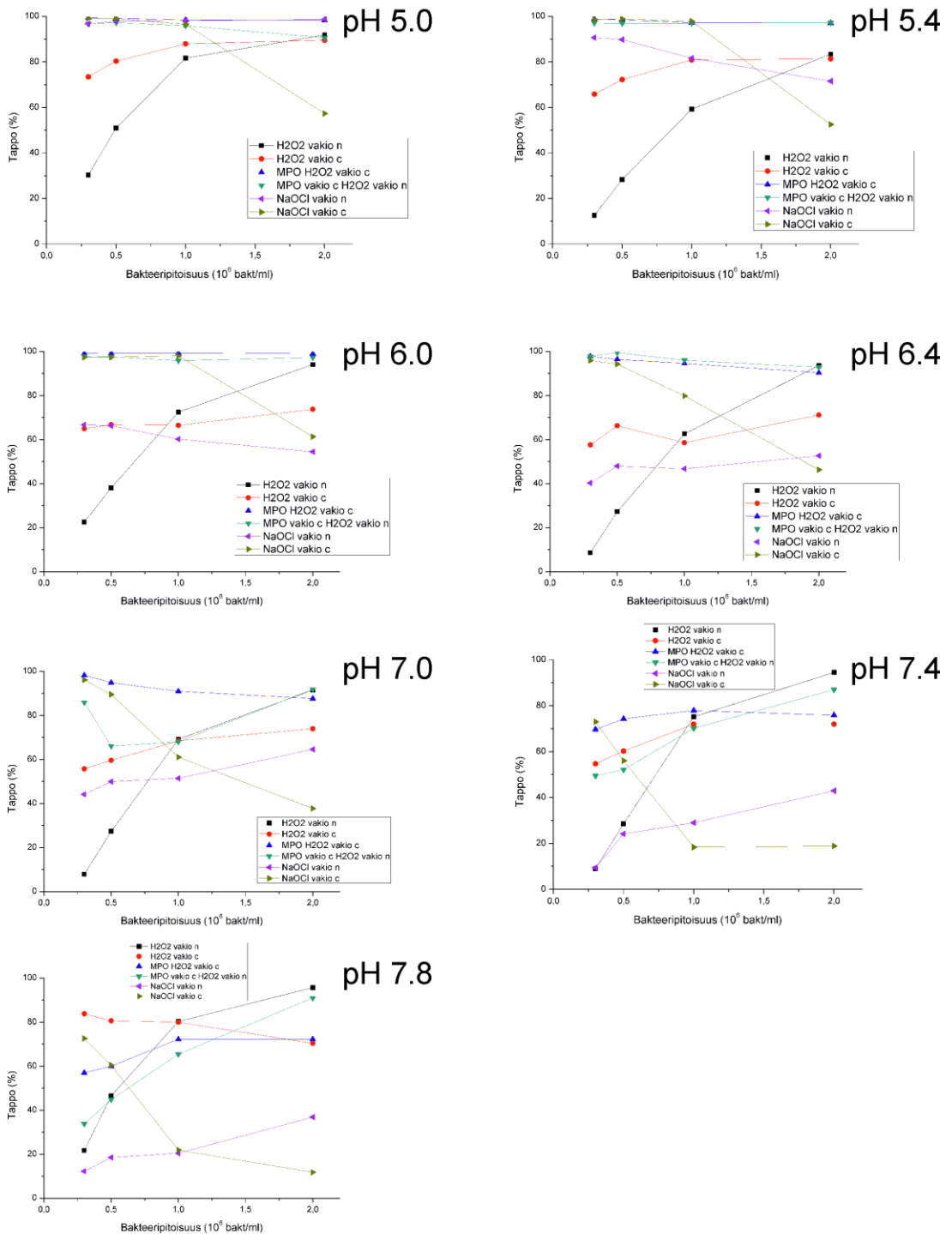


Kuva 12. **A** H_2O_2 vakioainemäärä, MPO vakiokonsentraatio, pH 5.0-7.8. pH 6.4 ja pH 7.0 tulokset korvattiin Hidex Triathler LSC:n vastaavilla mittauksilla huonon datan vuoksi, mikä todennäköisesti johtui reaktioiden pipetoinnissa tapahtuneista virheistä. H_2O_2 -konsentraation vaikutusta matalassa pH:ssa on vaikea arvioida, mutta korkeassa pH:ssa korkeampi H_2O_2 -pitoisuus parantaa tappoa. ■: taustareaktio 50 μl ●: taustareaktio 100 μl ▲: taustareaktio 200 μl ▼: taustareaktio 300 μl ◆: tapporeaktio 50 μl , H_2O_2 200 μM , MPO 0,67 nM ◀: tapporeaktio 100 μl , H_2O_2 100 μM , MPO 0,67 nM ▶: tapporeaktio 200 μl , H_2O_2 50 μM , MPO 0,67 nM ●: tapporeaktio 300 μl , H_2O_2 33 μM , MPO 0,67 nM. **B** Annosvaste. Tappoprosentti tilavuuden funktiona kussakin pH:ssa 20 minuutin kohdalla.

4.2 Tappo 30 minuutin kohdalla bakteeripitoisuuden funktiona

Konsentraation ja bakteeripitoisuuden vaikutusta eri aineiden tappotehoon on havainnollista vertailla kuvaamalla tappoprosentti bakteeripitoisuuden funktiona 30 minuutin kohdalla (kuva 13). MPO:ta vakiokonsentraation ja H_2O_2 :ta vakioainemäärän sisältävät reaktiot ovat pH 7:stä ylöspäin hyvin samankaltaisia pelkkää H_2O_2 :a vakioainemäärän sisältävien reaktioiden kanssa, erityisesti Hidex Triathler LSC:llä tehdyissä manuaalisissa mittauksissa (liite 2), kun taas happamassa pH:ssa MPO:ta sisältävä reaktio tehostuu huomattavasti. Tämä viittaisi siihen, että neutraalissa ja lievästi emäksisessä pH:ssa, eli neutrofiilin fagolysosomin fysiologisessa pH:ssa, MPO ei ole aktiivinen ja tappo on seurausta H_2O_2 :n vaikutuksesta. Samankaltainen ilmiö on havaittavissa vakiokonsentraation MPO:ta ja H_2O_2 :a sisältävien ja vakiokonsentraation pelkkää H_2O_2 :a sisältävien reaktioiden välillä.

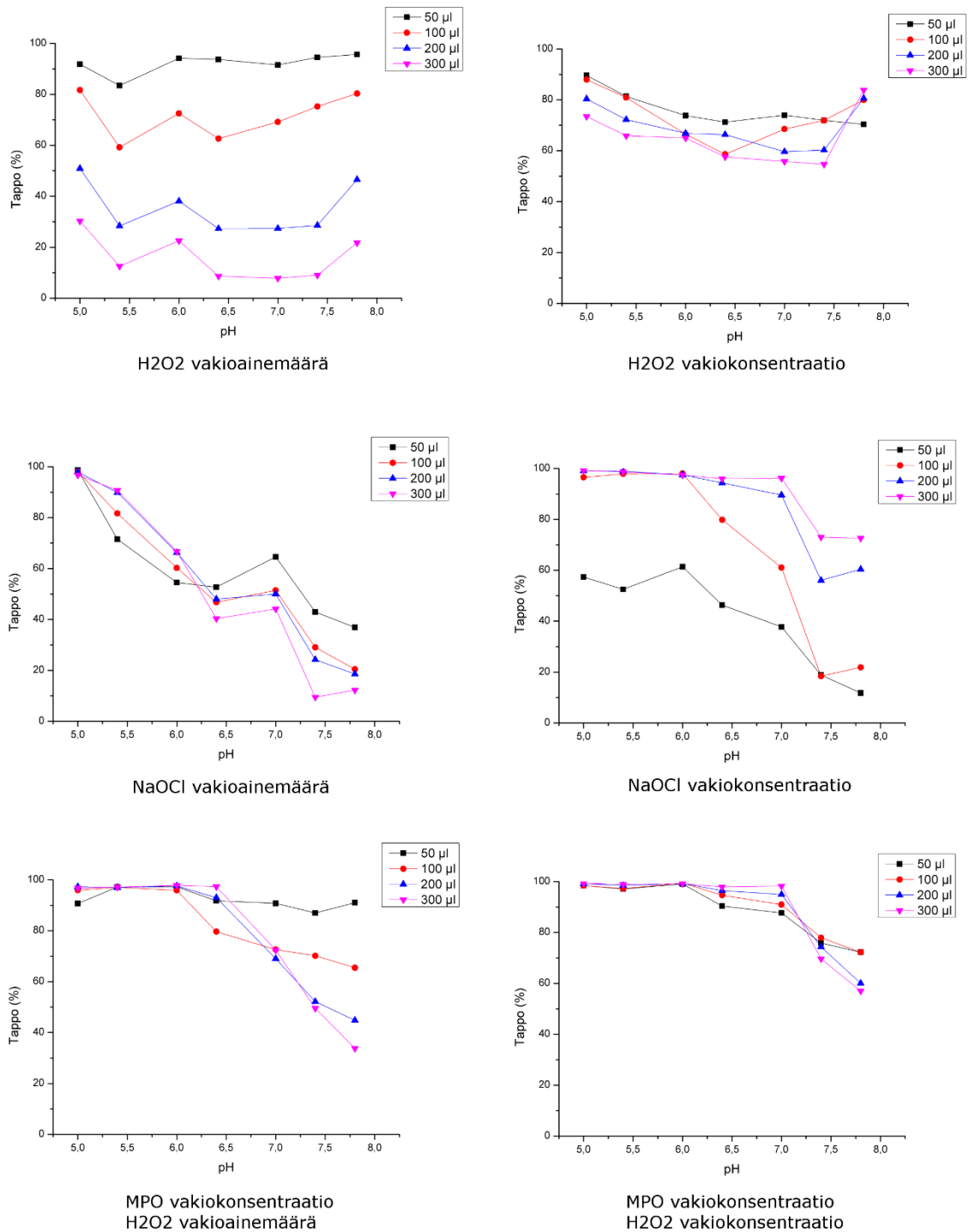
$NaOCl$:n ja H_2O_2 :n vakiokonsentraatioista nähdään, että bakteeripitoisuudella ei ole vaikutusta H_2O_2 :n tappotehoon, kun taas bakteeripitoisuuden nousu heikentää $NaOCl$:n tehoa merkittävästi. $NaOCl$:n ja H_2O_2 :n vakioainemääristä taas nähdään, että oikealle kasvava konsentraatio ei vaikuta merkittävästi $NaOCl$:n tappotehoon, kun taas H_2O_2 :n tappo moninkertaistuu.



Kuva 13. Tappoprosentti 30 min. kohdalla bakteeripitoisuuden funktiona, reaktiivilavuudet kasvavat vasemmalta oikealle 50 – 300 μl välillä. Vakioainemäärän käyrissä konsentraatio kasvaa oikealle, ja niistä on nähtävissä että konsentraatiolla on suuri vaikutus H₂O₂-tappoon, kun taas NaOCl-tappoon sillä ei ole merkittävää vaikutusta. Vakiokonsentraatiokäyristä nähdään, että bakteeripitoisuudella ei ole merkittävää vaikutusta H₂O₂-tappoon, kun taas NaOCl-tappoa korkeampi bakteeripitoisuus heikentää. MPO-reaktiot käyttäytyvät korkeammassa pH:ssa vastaavien pelkkää H₂O₂:ta sisältävien reaktioiden kaltaisesti, mikä viittaa siihen että korkeassa pH:ssa MPO ei ole aktiivinen ja tappo on H₂O₂:n aiheuttamaa. ■: H₂O₂ vakiokonsentraatio 10 nmol ●: H₂O₂ vakiokonsentraatio 100 μM ▲: MPO vakiokonsentraatio 0,67 nM, H₂O₂ vakiokonsentraatio 100 μM ▼: MPO vakiokonsentraatio 0,67 nM, H₂O₂ vakiokonsentraatio 10 nmol ◀: NaOCl vakiokonsentraatio 0,2 nmol ▶: NaOCl vakiokonsentraatio 2 μM.

4.3 Tappo pH:n funktiona

pH:n vaikutus tappoon näkyy kuvasta 14. H_2O_2 -tappo ei riipu pH:sta, kun taas NaOCl-tappo on merkittävästi suurempaa matalassa pH:ssa, kuten myös MPO-tappo.



Kuva 14. Tappo pH:n funktiona. H_2O_2 -tappo tappo ei ole riippuvaista pH:sta, kun taas NaOCl-tappo tehostuu merkittävästi pH:n alentuessa, kuten myös MPO-tappo. ■: reaktiivilavuus 50 µl ●: reaktiivilavuus 100 µl ▲: reaktiivilavuus 200 µl ▼: reaktiivilavuus 300 µl.

5 POHDINTA

Synnynnäisessä immuunivasteessa primäärisen solullisen vasteen muodostaa neutrofiili, joka fagosytoi ja tuhoaa infektiivisiä mikro-organismeja. Tuhoaminen tapahtuu altistamalla kohde erilaisille toksisille yhdisteille, jotka voivat saavuttaa korkeita pitoisuuksia pienessä fagolysosomissa. Tapporeaktiot jaetaan usein hapettaviin ja hapesta riippumattomiin, mikä ei kuitenkaan välttämättä ole neutrofiilin toiminnan todellisuuden kannalta mielekäs kahtiajako, sillä on ilmeistä että tappo perustuu useisiin yhtäaikaisiin reaktioihin, jotka tilanteesta ja infektiivästä organismista riippuen vaikuttavat eri määrin mutta todennäköisesti synergisesti (Nauseef 2007, Hurst 2012). Fagolysosomin ympäristö on kuitenkin hyvin monimutkainen ja käytettävissä olevat *in vivo*-menetelmät asettavat rajoituksia koeasetelmille, joten tapporeaktioiden tutkimus perustuu suurelta osin yksittäisillä aineilla tehtyihin kokeisiin ja näiden pohjalta tehtyihin mallinnuksiin. Päällekkäisistä järjestelmistä huolimatta synnynnäisen immuunivasteen hapettaviin reaktioihin perustuva tappo on kuitenkin välttämätöntä ihmisen pitkän aikavälin selviämisen kannalta, mistä kertoo esimerkiksi kroonisen granulomatoosin fataalisuus ilman hoitoa.

Neutrofiilin fagolysosomin hapettavan tapon paradigma on, että reseptorivälitteinen fagosytoosi johtaa hengitysyöpsähdykseen, jossa neutrofiilin hapen kulutus kasvaa dramaattisesti NADPH-oksidaasin aktivoituessa ja muodostaessa superoksidia O_2^- . Muodostunut superoksidi dismutoidaan vetyperoksidiksi H_2O_2 , joka edelleen toimii myeloperoksidaasin substraattina reaktiosarjassa, jossa muodostuu hypokloorihapoketta HOCl. Ketjun jokaisen välituotteen on mahdollista toimia hapettimena, ja ne pystyvät myös muodostamaan useita sekundaarisia hapettimia. Eri yhdisteiden rooli tapossa riippuu infektiivästä organismista, esimerkiksi MPO-vajailta soluilla on merkittävästi alentunut vaste *Candida albicansia* ja useita muita *Candida*-lajeja kohtaan, kun taas *Staphylococcus aureuksen* tappo on lähes häiriötöntä (Parry, Root et al. 1981). Neutrofiilit pystyvät tappamaan myös *E. coli* ilman NADPH-oksidaasista ja MPO:sta riippuvaa hapettavaa järjestelmää (Rosen, Michel 1997). Myös kohteen metabolinen tila vaikuttaa sen alttiuteen eri yhdisteiden aiheuttamalle vahingolle (Bortolussi, Vandenbroucke-Grauls et al. 1987, Lehrer, Ganz et al. 1988).

Tutkimuksen motivaationa oli tarkastella eroja neutrofiilin hapettavan tapon keskeisten yhdisteiden vetyperoksidin ja hypokloorihapokkeen välillä gram-negatiivisen malliorganismien *E. coli* tapossa. Tämä toteutettiin käyttämällä hyväksi *E. coli* K-12 -soluja, jotka on saatu tuottamaan valoa transformoimalla ne lusiferaasigeenejä sisältävällä plasmidilla ja tarkastelemalla muutoksia bioluminesenssissa altistettaessa soluja eri olosuhteille.

Aineiden välillä oli merkittäviä eroja. Vetyperoksidikonsentraation kasvu tehostaa tappoa, kun taas hypokloriitin konsentraatiolla ei ole merkittävää vaikutusta. Riippumattomuus konsentraatiosta noudattaa nollannen kertaluvun kinetiikkaa, mikä viittaa tapon perustuvan johonkin saturoituvan prosessiin. Vakiokonsentraatiomittausten perusteella bakteeripitoisuuden kasvu heikentää NaOCl-tappoa selvästi, kun taas H_2O_2 -tappoon bakteeripitoisuudella ei ole vaikutusta. Korkeamman bakteeripitoisuuden heikentävä vaikutus NaOCl-tappoon voisi selittyä esimerkiksi jollain bakteerien ryhmäviestintään perustuvalla tiheydestä riippuvaisella puolustusvasteella tai metabolisella tilalla. Ryhmäviestintä on mekanismi, jolla bakteerit voivat säädellä geeniekspressiotaan vasteena muutoksille niiden määrässä. Se perustuu solujen vapauttamaan kemialliseen signaaliin, jonka pitoisuus kasvaa bakteeripitoisuuden funktiona, ja joka raja-arvon

ylitettään saa aikaan muutoksen koko populaation geeniekspressiossa, mahdollistaen koordinoitua käytöksen. *E. coli* löytyviä ryhmäviestintäjärjestelmiä ovat ainakin LuxI/LuxR-homologeihin perustuva (Lee, Maeda et al. 2009), indolisignaalointiin perustuva (Wang, Ding et al. 2001), LuxS-entsyymien tuottamaan autoindusoija-2:een perustuva (Surette, Miller et al. 1999) ja mazEF-toksiini-antitoksiini-moduuliin perustuva (Kolodkin-Gal, Hazan et al. 2007). Eri järjestelmät säätelevät satojen eri geenien ekspressiota (Kalia 2015), jotka osallistuvat lukuisiin prosesseihin, kuten biofilmin muodostumiseen (Lee, Jayaraman et al. 2007, Li, Attila et al. 2007), lääkeresistenssiin (Wei, Lee et al. 2001, Rahmati, Yang et al. 2002, Hirakawa, Inazumi et al. 2005), solusyklin säätelyyn (Wang, de Boer et al. 1991) ja ohjelmoituun solukuolemaan (Kolodkin-Gal, Hazan et al. 2007). Jotkin näistä prosesseista saattavat edistää bakteerien selviämistä NaOCl-taposta mutta ei H₂O₂-taposta, mikä saattaisi osaltaan selittää erot bakteeripitoisuuden vaikutuksessa aineiden tehoon.

Ilmiötä, jossa korkeammalla lähtöbakteeripitoisuudella on heikentävä vaikutus joidenkin antimikrobiaalisten aineiden tehoon kutsutaan inokulaatiovaikutukseksi, ja ryhmäviestinnän lisäksi sille on ehdotettu muita selityksiä, kuten muutokset bakteerien metabolisessa tilassa, jokin toksisia aineita harmittomaksi tekevä entsyymivaste, tai sitoutumiskinetiikka. Monet antimikrobiaaliset aineet toimivat parhaiten logaritmisessa kasvuvaiheessa olevia bakteereja kohtaan (Eng, Padberg et al. 1991), ja on mahdollista että korkeampi lähtöpitoisuus nopeuttaa stationaariseen vaiheeseen siirtymistä (Stevens, Yan et al. 1993). Toisten tutkimusten mukaan lähtöpitoisuudella ei kuitenkaan ole vaikutusta kasvunopeuteen, vaan se vaikuttaa ainoastaan lag-vaiheen keston, korkeampien pitoisuuksien lyhentäessä sitä (Bidlas, Du et al. 2008). Entsyymivasteen osuutta inokulaatiovaikutukseen on tutkitty eniten β -laktamaaseja tuottavien bakteerilajien ja β -laktaamiantibioottien kohdalla (Sabath, Garner et al. 1975, Thomson, Moland 2001, Wu, Chen et al. 2014). Ilmiö ei kuitenkaan rajoitu β -laktameihin, eikä selitä tulosta HOCl:n kohdalla. Useimmilla mahdollisilla selityksillä on tämän tutkimuksen yhteydessä myös se ongelma, että niiden vaikutukset eivät näkyisi mittauksissa käytetyn 30 min sisällä. HOCl:n kohdalla parhaan selityksen tarjoaa sitoutumiskinetiikkaan perustuva teoria, jonka mukaan vaikutuksen heikkeneminen olisi seurausta vapaan HOCl:n määrän vähenemisestä sen sitoessa kohteitaan (Abel Zur Wiesch, Abel et al. 2015). Tämän puolesta puhuu myös se, että vastaavaa teho heikkenemistä ei ollut havaittavissa vakioainemäärämittauksissa, jossa hypokloriitti- ja bakteeripitoisuudet muuttuvat samassa suhteessa tilavuuden muuttuessa. Yksinkertainen bakteerikonsentraatio ei ole ratkaiseva tekijä, joten mahdollinen bakteerien ryhmäviestintään perustuva vaste ei selitä tulosta. Täten HOCl-tapossa HOCl/solu-suhde määrää tappotehon.

pH:lla on merkittävä vaikutus sekä MPO- että HOCl-tappoon, mutta ei H₂O₂-tappoon. Vaikutus MPO:sta riippuvaiseen järjestelmään on selitettävissä sekä MPO:n että HOCl:n ominaisuuksilla. Kloridi-ionin vuorovaikutus yhdiste I:n ferryylihapen kanssa edellyttää läheisen pK_a 4.0-4.6:n happo/emäs-ryhmän, todennäköisesti histidiinin, olevan protonoitunut, ja on edellytys kloridi-ionin tehokkaalle hapettamiselle. Täten pH:n noustessa tämä vuorovaikutus ja vastaavasti halogenaatioreaktio vähenee (Furtmuller, Burner et al. 1998). Toisaalta HOCl:n pK_a on 7.5 (Morris 1966) ja se läpäisee solukalvon vain protonoituneena, joten matalampi pH mahdollistaa intrasellulaaristen kohteiden tavoittamisen suuremmalla pitoisuudella. Vetyperoksidilla ei ole vastaavia rajoitteita sen tehon tai solukalvon läpäisyn suhteen.

Neutrofiilit ovat runsaslukuisin immuunisolu, ja ensimmäinen vaste infektiota kohtaan. Antimikrobiaalisen tehtävän lisäksi ne kuitenkin osallistuvat myös muihin prosesseihin

kuten krooniseen tulehdukseen, kudosisvaurioihin ja useisiin tautitiloihin kuten valtimonkovettumatautiin (Drechsler, Megens et al. 2010, Teng, Maghzal et al. 2017), haimatulehdukseen (Merza, Hartman et al. 2015, Yang, Meng et al. 2015) ja erityisesti syöpään (Sionov, Fridlender et al. 2015, Uribe-Querol, Rosales 2015). Pitkään ajateltiin neutrofiilin olevan yksinkertainen immuunisolu, joka infektion tapahtuessa aktivoituu, siirtyy kudokseen, ja tehtävänsä suoritettuaan se lyhyessä ajassa ajautuu apoptoosiin ja siivotaan pois makrofagien toimesta, mutta kuva neutrofiilin toiminnasta on muuttunut huomattavasti monimuotoisemmaksi. Ne ovat transkriptionaalisesti oletettua aktiivisempia, ja huolimatta yksittäisen solun matalasta sytokiiniinien erityksestä monosyytteihin, makrofageihin tai lymfosyytteihin verrattuna, neutrofiilien huomattavasti suurempi lukumäärä tekee niiden sytokiiniinierityksestä merkittävän (Cassatella 1999, Tecchio, Micheletti et al. 2014). Antimikrobiaalisen vasteen lisäksi ne kykenevät siirtymään myös terveisiin kudoksiin ja osallistumaan niiden ylläpitoon (Casanova-Acebes, Nicolas-Avila et al. 2018). Ne myös vuorovaikuttavat useiden synnyttämisen ja adaptiivisen immunitetin solujen kanssa, säädellessä positiivisesti tai negatiivisesti niiden selviytymistä, erilaistumista ja sytokiiniinieritystä, vahvistaen tai heikentäen immuuniprosesseja (Mocsai 2013, Scapini, Cassatella 2014). Parempi ymmärrys neutrofiilin fagosomin biokemiasta saattaa auttaa neutrofiilin monien patologisten ja fysiologisten toimintojen selvittämisessä ja haitallisten vaikutusten korjaamisessa.

6 KIRJALLISUUS

- ABEL ZUR WIESCH, P., ABEL, S., GKOTZIS, S., OCAMPO, P., ENGELSTADTER, J., HINKLEY, T., MAGNUS, C., WALDOR, M.K., UDEKWU, K. and COHEN, T., 2015. Classic reaction kinetics can explain complex patterns of antibiotic action. *Science translational medicine*, **7**(287), pp. 287ra73.
- ADEREM, A. and UNDERHILL, D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, **17**, pp. 593-623.
- ALLEN, L.A. and ADEREM, A., 1996. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *The Journal of experimental medicine*, **184**(2), pp. 627-637.
- ALLEN, R.C., STJERNHOLM, R.L. and STEELE, R.H., 1972. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochemical and biophysical research communications*, **47**(4), pp. 679-684.
- ATOSUO, J., LEHTINEN, J., VOJTEK, L. and LILIUS, E.M., 2013. Escherichia coli K-12 (pEGFPfluxABCDEamp): a tool for analysis of bacterial killing by antibacterial agents and human complement activities on a real-time basis. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*, **28**(5), pp. 771-779.
- BAINTON, D.F., ULLYOT, J.L. and FARQUHAR, M.G., 1971. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *The Journal of experimental medicine*, **134**(4), pp. 907-934.
- BANDO, Y. and AKI, K., 1990. Superoxide-mediated release of iron from ferritin by some flavoenzymes. *Biochemical and biophysical research communications*, **168**(2), pp. 389-395.
- BARGATZE, R.F., KURK, S., BUTCHER, E.C. and JUTILA, M.A., 1994. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *The Journal of experimental medicine*, **180**(5), pp. 1785-1792.
- BIDLAS, E., DU, T. and LAMBERT, R.J., 2008. An explanation for the effect of inoculum size on MIC and the growth/no growth interface. *International journal of food microbiology*, **126**(1-2), pp. 140-152.
- BIEMOND, P., SWAAK, A.J., VAN EIJK, H.G. and KOSTER, J.F., 1988. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free radical biology & medicine*, **4**(3), pp. 185-198.
- BIEMOND, P., VAN EIJK, H.G., SWAAK, A.J. and KOSTER, J.F., 1984. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Possible mechanism in inflammation diseases. *The Journal of clinical investigation*, **73**(6), pp. 1576-1579.
- BOLSCHER, B.G. and WEVER, R., 1984. A kinetic study of the reaction between human myeloperoxidase, hydroperoxides and cyanide. Inhibition by chloride and thiocyanate. *Biochimica et biophysica acta*, **788**(1), pp. 1-10.
- BORREGAARD, N., SEHESTED, M., NIELSEN, B.S., SENGELOV, H. and KJELDSSEN, L., 1995. Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood*, **85**(3), pp. 812-817.
- BORTOLUSSI, R., VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M., VAN ASBECK, B.S. and VERHOEF, J., 1987. Relationship of bacterial growth phase to killing of *Listeria monocytogenes* by oxidative agents generated by neutrophils and enzyme systems. *Infection and immunity*, **55**(12), pp. 3197-3203.
- BRANDI, G., FIORANI, M., PIEROTTI, C., ALBANO, A., CATTABENI, F. and CANTONI, O., 1989. Morphological changes in *Escherichia coli* cells exposed to low or high concentrations of hydrogen peroxide. *Microbiology and immunology*, **33**(12), pp. 991-1000.

- BUETTNER, G.R., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **300**(2), pp. 535-543.
- BURNS, A.R., WALKER, D.C., BROWN, E.S., THURMON, L.T., BOWDEN, R.A., KEESE, C.R., SIMON, S.I., ENTMAN, M.L. and SMITH, C.W., 1997. Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **159**(6), pp. 2893-2903.
- CACCAVO, D., PELLEGRINO, N.M., ALTAMURA, M., RIGON, A., AMATI, L., AMOROSO, A. and JIRILLO, E., 2002. Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. *Journal of endotoxin research*, **8**(6), pp. 403-417.
- CANDEIAS, L.P., PATEL, K.B., STRATFORD, M.R. and WARDMAN, P., 1993. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS letters*, **333**(1-2), pp. 151-153.
- CASANOVA-ACEBES, M., NICOLAS-AVILA, J.A., LI, J.L., GARCIA-SILVA, S., BALACHANDER, A., RUBIO-PONCE, A., WEISS, L.A., ADROVER, J.M., BURROWS, K., A-GONZALEZ, N., BALLESTEROS, I., DEVI, S., QUINTANA, J.A., CRAINICIUC, G., LEIVA, M., GUNZER, M., WEBER, C., NAGASAWA, T., SOEHNLEIN, O., MERAD, M., MORTHA, A., NG, L.G., PEINADO, H. and HIDALGO, A., 2018. Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissues. *The Journal of experimental medicine*, **215**(11), pp. 2778-2795.
- CASSATELLA, M.A., 1999. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Advances in Immunology*, **73**, pp. 369-509.
- CECH, P. and LEHRER, R.I., 1984. Phagolysosomal pH of human neutrophils. *Blood*, **63**(1), pp. 88-95.
- CHANG, Y.C., SEGAL, B.H., HOLLAND, S.M., MILLER, G.F. and KWON-CHUNG, K.J., 1998. Virulence of catalase-deficient aspergillus nidulans in p47(phox)^{-/-} mice. Implications for fungal pathogenicity and host defense in chronic granulomatous disease. *The Journal of clinical investigation*, **101**(9), pp. 1843-1850.
- CHEN, S.N. and HOFFMAN, M.Z., 1973. Rate constants for the reaction of the carbonate radical with compounds of biochemical interest in neutral aqueous solution. *Radiation research*, **56**(1), pp. 40-47.
- CHIRIACO, M., SALFA, I., MATTEO, G.D., ROSSI, P. and FINOCCHI, A., 2015. Chronic Granulomatous Disease: clinical, molecular and therapeutic aspects. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, .
- COICO, R. and SUNSHINE, G., 2015. *Immunology: a short course*. 7th edn. Chichester: Wiley Blackwell.
- CORBIN, B.D., SEELEY, E.H., RAAB, A., FELDMANN, J., MILLER, M.R., TORRES, V.J., ANDERSON, K.L., DATTILO, B.M., DUNMAN, P.M., GERADS, R., CAPRIOLI, R.M., NACKEN, W., CHAZIN, W.J. and SKAAR, E.P., 2008. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science (New York, N.Y.)*, **319**(5865), pp. 962-965.
- COWLAND, J.B. and BORREGAARD, N., 2016. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunological reviews*, **273**(1), pp. 11-28.
- COWLAND, J.B., JOHNSEN, A.H. and BORREGAARD, N., 1995. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS letters*, **368**(1), pp. 173-176.
- COX, D. and GREENBERG, S., 2001. Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Seminars in immunology*, **13**(6), pp. 339-345.

- CROSS, A.R. and CURNUTTE, J.T., 1995. The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry*, **270**(12), pp. 6543-6548.
- CROSS, A.R. and SEGAL, A.W., 2004. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et biophysica acta*, **1657**(1), pp. 1-22.
- CZAPSKI, G., 1984. On the Use of OH · Scavengers in Biological Systems. *Israel Journal of Chemistry*, **24**(1), pp. 29-32.
- DANGERFIELD, J., LARBI, K.Y., HUANG, M.T., DEWAR, A. and NOURSHARGH, S., 2002. PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *The Journal of experimental medicine*, **196**(9), pp. 1201-1211.
- DATHE, M. and WIEPRECHT, T., 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et biophysica acta*, **1462**(1-2), pp. 71-87.
- DE, Y., CHEN, Q., SCHMIDT, A.P., ANDERSON, G.M., WANG, J.M., WOOTERS, J., OPPENHEIM, J.J. and CHERTOV, O., 2000. 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. *The Journal of experimental medicine*, **192**(7), pp. 1069-1074.
- DECOURSEY, T.E., MORGAN, D. and CHERNY, V.V., 2003. The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. *Nature*, **422**(6931), pp. 531-534.
- DETMERS, P.A., ZHOU, D., POWELL, D., LICHENSTEIN, H., KELLEY, M. and PIRONKOVA, R., 1995. Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **155**(4), pp. 2085-2095.
- DEWALD, B., BRETZ, U. and BAGGIOLINI, M., 1982. Release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, **70**(3), pp. 518-525.
- DIEBOLD, B.A. and BOKOCH, G.M., 2001. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nature immunology*, **2**(3), pp. 211-215.
- DOGNIN, J. and CRICHTON, R.R., 1975. Mobilisation of iron from ferritin fractions of defined iron content by biological reductants. *FEBS letters*, **54**(2), pp. 234-236.
- DORFMAN, L.M. and ADAMS, G.E., 1973. *Reactivity of the hydroxyl radical in aqueous solutions*. Washington: U.S. National Bureau of Standards.
- DRECHSLER, M., MEGENS, R.T., VAN ZANDVOORT, M., WEBER, C. and SOEHNLEIN, O., 2010. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation*, **122**(18), pp. 1837-1845.
- EL CHEMALY, A., OKOCHI, Y., SASAKI, M., ARNAUDEAU, S., OKAMURA, Y. and DEMAUREX, N., 2010. VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification. *The Journal of experimental medicine*, **207**(1), pp. 129-139.
- ENG, R.H., PADBERG, F.T., SMITH, S.M., TAN, E.N. and CHERUBIN, C.E., 1991. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **35**(9), pp. 1824-1828.

- FATTAHI, F., BADALZADEH, M., SEDIGHIPOUR, L., MOVAHEDI, M., FAZLOLLAHI, M.R., MANSOURI, S.D., KHOTAEI, G.T., BEMANIAN, M.H., BEHMANESH, F., HAMIDIEH, A.A., BAZARGAN, N., MAMISHI, S., ZANDIEH, F., CHAVOSHZADEH, Z., MOHAMMADZADEH, I., MAHDAVIANI, S.A., TABATABAEI, S.A., KALANTARI, N., TAJIK, S., MADDAH, M., POURPAK, Z. and MOIN, M., 2011. Inheritance pattern and clinical aspects of 93 Iranian patients with chronic granulomatous disease. *Journal of clinical immunology*, **31**(5), pp. 792-801.
- FAURSCHOU, M. and BORREGAARD, N., 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **5**(14), pp. 1317-1327.
- FINKELSTEIN, E., ROSEN, G.M., RAUCKMAN, E.J. and PAXTON, J., 1979. Spin trapping of superoxide. *Molecular pharmacology*, **16**(2), pp. 676-685.
- FOOTE, C.S., GOYNE, T.E. and LEHRER, R.I., 1983. Assessment of chlorination by human neutrophils. *Nature*, **301**(5902), pp. 715-716.
- FOOTE, J.R., LEVINE, A.P., BEHE, P., DUCHEN, M.R. and SEGAL, A.W., 2017. Imaging the Neutrophil Phagosome and Cytoplasm Using a Ratiometric pH Indicator. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (122). doi(122), pp. 10.3791/55107.
- FOXMAN, E.F., CAMPBELL, J.J. and BUTCHER, E.C., 1997. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *The Journal of cell biology*, **139**(5), pp. 1349-1360.
- FURTMULLER, P.G., BURNER, U. and OBINGER, C., 1998. Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate. *Biochemistry*, **37**(51), pp. 17923-17930.
- FURTMULLER, P.G., ZEDERBAUER, M., JANTSCHKO, W., HELM, J., BOGNER, M., JAKOPITSCH, C. and OBINGER, C., 2006. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **445**(2), pp. 199-213.
- GANZ, T., 1999. Oxygen-independent microbicidal mechanisms of phagocytes. *Proceedings of the Association of American Physicians*, **111**(5), pp. 390-395.
- GANZ, T. and LEHRER, R.I., 1994. Defensins. *Current opinion in immunology*, **6**(4), pp. 584-589.
- GAZZANO-SANTORO, H., PARENT, J.B., GRINNA, L., HORWITZ, A., PARSONS, T., THEOFAN, G., ELSBACH, P., WEISS, J. and CONLON, P.J., 1992. High-affinity binding of the bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant amino-terminal fragment to the lipid A region of lipopolysaccharide. *Infection and immunity*, **60**(11), pp. 4754-4761.
- GERA, J.F. and LICHTENSTEIN, A., 1991. Human neutrophil peptide defensins induce single strand DNA breaks in target cells. *Cellular immunology*, **138**(1), pp. 108-120.
- GONZALEZ-FLECHA, B. and DEMPLE, B., 1997. Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **179**(2), pp. 382-388.
- GOTSCH, U., BORGES, E., BOSSE, R., BOGGEMEYER, E., SIMON, M., MOSSMANN, H. and VESTWEBER, D., 1997. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *Journal of cell science*, **110** (Pt 5)(Pt 5), pp. 583-588.
- GRIFFIN, F.M., Jr, GRIFFIN, J.A., LEIDER, J.E. and SILVERSTEIN, S.C., 1975. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *The Journal of experimental medicine*, **142**(5), pp. 1263-1282.
- HAMPTON, M.B., KETTLE, A.J. and WINTERBOURN, C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, **92**(9), pp. 3007-3017.

- HAN, C.H., FREEMAN, J.L., LEE, T., MOTALEBI, S.A. and LAMBETH, J.D., 1998. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *The Journal of biological chemistry*, **273**(27), pp. 16663-16668.
- HASSAN, H.M. and FRIDOVICH, I., 1979. Paraquat and Escherichia coli. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *The Journal of biological chemistry*, **254**(21), pp. 10846-10852.
- HASTY, K.A., POURMOTABBED, T.F., GOLDBERG, G.I., THOMPSON, J.P., SPINELLA, D.G., STEVENS, R.M. and MAINARDI, C.L., 1990. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry*, **265**(20), pp. 11421-11424.
- HEIT, B., TAVENER, S., RAHARJO, E. and KUBES, P., 2002. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *The Journal of cell biology*, **159**(1), pp. 91-102.
- HENLE, E.S., HAN, Z., TANG, N., RAI, P., LUO, Y. and LINN, S., 1999. Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated fenton reactions has possible biological implications. *The Journal of biological chemistry*, **274**(2), pp. 962-971.
- HENZLER-WILDMAN, K.A., MARTINEZ, G.V., BROWN, M.F. and RAMAMOORTHY, A., 2004. Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry*, **43**(26), pp. 8459-8469.
- HEYWORTH, P.G., BOHL, B.P., BOKOCH, G.M. and CURNUTTE, J.T., 1994. Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *The Journal of biological chemistry*, **269**(49), pp. 30749-30752.
- HEYWORTH, P.G., CURNUTTE, J.T., NAUSEEF, W.M., VOLPP, B.D., PEARSON, D.W., ROSEN, H. and CLARK, R.A., 1991. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *The Journal of clinical investigation*, **87**(1), pp. 352-356.
- HIRAKAWA, H., INAZUMI, Y., MASAKI, T., HIRATA, T. and YAMAGUCHI, A., 2005. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in Escherichia coli. *Molecular microbiology*, **55**(4), pp. 1113-1126.
- HURST, J.K., 2012. What really happens in the neutrophil phagosome? *Free radical biology & medicine*, **53**(3), pp. 508-520.
- HURST, J.K., ALBRICH, J.M., GREEN, T.R., ROSEN, H. and KLEBANOFF, S., 1984. Myeloperoxidase-dependent fluorescein chlorination by stimulated neutrophils. *The Journal of biological chemistry*, **259**(8), pp. 4812-4821.
- HURST, J.K. and BARRETTE, W.C., Jr, 1989. Leukocytic oxygen activation and microbicidal oxidative toxins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, **24**(4), pp. 271-328.
- HUYNH, K.K., KAY, J.G., STOW, J.L. and GRINSTEIN, S., 2007. Fusion, fission, and secretion during phagocytosis. *Physiology (Bethesda, Md.)*, **22**, pp. 366-372.
- IMLAY, J.A., 2014. The mismetallation of enzymes during oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, **289**(41), pp. 28121-28128.
- IMLAY, J.A., 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology*, **57**, pp. 395-418.
- IMLAY, J.A. and LINN, S., 1986. Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown Escherichia coli by hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, **166**(2), pp. 519-527.

- INT VELD, G., MANNION, B., WEISS, J. and ELSBACH, P., 1988. Effects of the bactericidal/permeability-increasing protein of polymorphonuclear leukocytes on isolated bacterial cytoplasmic membrane vesicles. *Infection and immunity*, **56**(5), pp. 1203-1208.
- IOVINE, N.M., ELSBACH, P. and WEISS, J., 1997. An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**(20), pp. 10973-10978.
- JACONI, M.E., LEW, D.P., CARPENTIER, J.L., MAGNUSSON, K.E., SJOGREN, M. and STENDAHL, O., 1990. Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *The Journal of cell biology*, **110**(5), pp. 1555-1564.
- JANG, S. and IMLAY, J.A., 2007. Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *The Journal of biological chemistry*, **282**(2), pp. 929-937.
- JANKOWSKI, A. and GRINSTEIN, S., 1999. A noninvasive fluorimetric procedure for measurement of membrane potential. Quantification of the NADPH oxidase-induced depolarization in activated neutrophils. *The Journal of biological chemistry*, **274**(37), pp. 26098-26104.
- JANKOWSKI, A., SCOTT, C.C. and GRINSTEIN, S., 2002. Determinants of the phagosomal pH in neutrophils. *The Journal of biological chemistry*, **277**(8), pp. 6059-6066.
- JIANG, Q., GRIFFIN, D.A., BAROFSKY, D.F. and HURST, J.K., 1997. Intraphagosomal chlorination dynamics and yields determined using unique fluorescent bacterial mimics. *Chemical research in toxicology*, **10**(10), pp. 1080-1089.
- KALIA, V.C., 2015. *Quorum sensing vs quorum quenching: a battle with no end in sight*. New Delhi: Springer.
- KANEKO, M., KODAMA, M. and INOUE, F., 1994. Bimodal pattern of killing of Chinese hamster V79 variant cells by hydrogen peroxide. *Free radical research*, **20**(4), pp. 229-239.
- KANOFSKY, J.R., 1989. Singlet oxygen production by biological systems. *Chemico-biological interactions*, **70**(1-2), pp. 1-28.
- KANOFSKY, J.R., WRIGHT, J., MILES-RICHARDSON, G.E. and TAUBER, A.I., 1984. Biochemical requirements for singlet oxygen production by purified human myeloperoxidase. *The Journal of clinical investigation*, **74**(4), pp. 1489-1495.
- KAPLAN, G., 1977. Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, **6**(8), pp. 797-807.
- KEARNS, D.R., 1971. Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen. *Chemical reviews*, **71**(4), pp. 395-427.
- KEYER, K. and IMLAY, J.A., 1996. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(24), pp. 13635-13640.
- KLEBANOFF, S.J., 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology*, **77**(5), pp. 598-625.
- KLEBANOFF, S.J., 1970. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science (New York, N.Y.)*, **169**(3950), pp. 1095-1097.
- KLEBANOFF, S.J., KETTLE, A.J., ROSEN, H., WINTERBOURN, C.C. and NAUSEEF, W.M., 2013. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *Journal of leukocyte biology*, **93**(2), pp. 185-198.

- KOKER, M.Y., CAMCIOGLU, Y., VAN LEEUWEN, K., KILIC, S.S., BARLAN, I., YILMAZ, M., METIN, A., DE BOER, M., AVCILAR, H., PATIROGLU, T., YILDIRAN, A., YEGIN, O., TEZCAN, I., SANAL, O. and ROOS, D., 2013. Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **132**(5), pp. 1156-1163.e5.
- KOLODKIN-GAL, I., HAZAN, R., GAATHON, A., CARMELI, S. and ENGELBERG-KULKA, H., 2007. A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, **318**(5850), pp. 652-655.
- KORKMAZ, B., MOREAU, T. and GAUTHIER, F., 2008. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*, **90**(2), pp. 227-242.
- KORSHUNOV, S.S. and IMLAY, J.A., 2002. A potential role for periplasmic superoxide dismutase in blocking the penetration of external superoxide into the cytosol of Gram-negative bacteria. *Molecular microbiology*, **43**(1), pp. 95-106.
- LANZA, F., 1998. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, **76**(10), pp. 676-681.
- LE CABEC, V., COWLAND, J.B., CALAFAT, J. and BORREGAARD, N., 1996. Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(13), pp. 6454-6457.
- LEE, J., JAYARAMAN, A. and WOOD, T.K., 2007. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC microbiology*, **7**, pp. 42-2180-7-42.
- LEE, J., MAEDA, T., HONG, S.H. and WOOD, T.K., 2009. Reconfiguring the quorum-sensing regulator SdiA of *Escherichia coli* to control biofilm formation via indole and N-acylhomoserine lactones. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(6), pp. 1703-1716.
- LEE, W.A., CALDERWOOD, T.S. and BRUICE, T.C., 1985. Stabilization of higher-valent states of iron porphyrin by hydroxide and methoxide ligands: electrochemical generation of iron(IV)-oxo porphyrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**(13), pp. 4301-4305.
- LEE, W.L., HARRISON, R.E. and GRINSTEIN, S., 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, **5**(14), pp. 1299-1306.
- LEHRER, R.I., GANZ, T., SZKLAREK, D. and SELSTED, M.E., 1988. Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *The Journal of clinical investigation*, **81**(6), pp. 1829-1835.
- LEHRER, R.I., LICHTENSTEIN, A.K. and GANZ, T., 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annual Review of Immunology*, **11**, pp. 105-128.
- LETO, T.L., ADAMS, A.G. and DE MENDEZ, I., 1994. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(22), pp. 10650-10654.
- LEVINE, A.P., DUCHEN, M.R., DE VILLIERS, S., RICH, P.R. and SEGAL, A.W., 2015. Alkalinity of neutrophil phagocytic vacuoles is modulated by HVCN1 and has consequences for myeloperoxidase activity. *PLoS one*, **10**(4), pp. e0125906.
- LEW, P.D., MONOD, A., WALDVOGEL, F.A., DEWALD, B., BAGGIOLINI, M. and POZZAN, T., 1986. Quantitative analysis of the cytosolic free calcium dependency of exocytosis from three subcellular compartments in intact human neutrophils. *The Journal of cell biology*, **102**(6), pp. 2197-2204.

- LI, J., ATTILA, C., WANG, L., WOOD, T.K., VALDES, J.J. and BENTLEY, W.E., 2007. Quorum sensing in *Escherichia coli* is signaled by AI-2/LsrR: effects on small RNA and biofilm architecture. *Journal of Bacteriology*, **189**(16), pp. 6011-6020.
- LIN, M., JACKSON, P., TESTER, A.M., DIACONU, E., OVERALL, C.M., BLALOCK, J.E. and PEARLMAN, E., 2008. Matrix Metalloproteinase-8 Facilitates Neutrophil Migration through the Corneal Stromal Matrix by Collagen Degradation and Production of the Chemotactic Peptide Pro-Gly-Pro. *The American Journal of Pathology*, **173**(1), pp. 144-153.
- LIU, L., ZHAO, C., HENG, H.H. and GANZ, T., 1997. The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics*, **43**(3), pp. 316-320.
- LOU, O., ALCAIDE, P., LUSCINSKAS, F.W. and MULLER, W.A., 2007. CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **178**(2), pp. 1136-1143.
- LUO, Y., HAN, Z., CHIN, S.M. and LINN, S., 1994. Three chemically distinct types of oxidants formed by iron-mediated Fenton reactions in the presence of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(26), pp. 12438-12442.
- MALY, F.E., QUILLIAM, L.A., DORSEUIL, O., DER, C.J. and BOKOCH, G.M., 1994. Activated or dominant inhibitory mutants of Rap1A decrease the oxidative burst of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*, **269**(29), pp. 18743-18746.
- MANNION, B.A., WEISS, J. and ELSBACH, P., 1990. Separation of sublethal and lethal effects of the bactericidal/permeability increasing protein on *Escherichia coli*. *The Journal of clinical investigation*, **85**(3), pp. 853-860.
- MARRA, M.N., WILDE, C.G., GRIFFITH, J.E., SNABLE, J.L. and SCOTT, R.W., 1990. Bactericidal/permeability-increasing protein has endotoxin-neutralizing activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **144**(2), pp. 662-666.
- MASSENA, S., CHRISTOFFERSSON, G., HJERTSTROM, E., ZCHARIA, E., VLODAVSKY, I., AUSMEES, N., ROLNY, C., LI, J.P. and PHILLIPSON, M., 2010. A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood*, **116**(11), pp. 1924-1931.
- MAY, R.C., CARON, E., HALL, A. and MACHESKY, L.M., 2000. Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nature cell biology*, **2**(4), pp. 246-248.
- MCEVER, R.P. and CUMMINGS, R.D., 1997. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *The Journal of clinical investigation*, **100**(11 Suppl), pp. S97-103.
- MERZA, M., HARTMAN, H., RAHMAN, M., HWAIZ, R., ZHANG, E., RENSTROM, E., LUO, L., MORGELIN, M., REGNER, S. and THORLACIUS, H., 2015. Neutrophil Extracellular Traps Induce Trypsin Activation, Inflammation, and Tissue Damage in Mice With Severe Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*, **149**(7), pp. 1920-1931.e8.
- MESSINA, C.G., REEVES, E.P., ROES, J. and SEGAL, A.W., 2002. Catalase negative *Staphylococcus aureus* retain virulence in mouse model of chronic granulomatous disease. *FEBS letters*, **518**(1-3), pp. 107-110.
- METCHNIKOFF, E., 1905. *Immunity in infective diseases*. Cambridge: Cambridge University Press.
- MIDDLETON, J., NEIL, S., WINTLE, J., CLARK-LEWIS, I., MOORE, H., LAM, C., AUER, M., HUB, E. and ROT, A., 1997. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell*, **91**(3), pp. 385-395.

- MILLER, R.A. and BRITIGAN, B.E., 1997. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clinical microbiology reviews*, **10**(1), pp. 1-18.
- MOCSAI, A., 2013. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of experimental medicine*, **210**(7), pp. 1283-1299.
- MOLLINEDO, F., NAKAJIMA, M., LLORENS, A., BARBOSA, E., CALLEJO, S., GAJATE, C. and FABRA, A., 1997. Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *The Biochemical journal*, **327** (Pt 3)(Pt 3), pp. 917-923.
- MORRIS, J.C., 1966. The Acid Ionization Constant of HOCl from 5 to 35°. *The Journal of Physical Chemistry*, **70**(12), pp. 3798.
- MULLER, W.A., 2013. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Veterinary pathology*, **50**(1), pp. 7-22.
- NAKAMURA, J., PURVIS, E.R. and SWENBERG, J.A., 2003. Micromolar concentrations of hydrogen peroxide induce oxidative DNA lesions more efficiently than millimolar concentrations in mammalian cells. *Nucleic acids research*, **31**(6), pp. 1790-1795.
- NAUSEEF, W.M., 2007. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological reviews*, **219**, pp. 88-102.
- NISIMOTO, Y., MOTALEBI, S., HAN, C.H. and LAMBETH, J.D., 1999. The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *The Journal of biological chemistry*, **274**(33), pp. 22999-23005.
- NORDENFELT, P., WINBERG, M.E., LONNBRO, P., RASMUSSEN, B. and TAPPER, H., 2009. Different requirements for early and late phases of azurophilic granule-phagosome fusion. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **10**(12), pp. 1881-1893.
- NOURSHARGH, S., KROMBACH, F. and DEJANA, E., 2006. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *Journal of leukocyte biology*, **80**(4), pp. 714-718.
- OHKUMA, S. and POOLE, B., 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **75**(7), pp. 3327-3331.
- OREN, Z., LERMAN, J.C., GUDMUNDSSON, G.H., AGERBERTH, B. and SHAI, Y., 1999. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *The Biochemical journal*, **341** (Pt 3)(Pt 3), pp. 501-513.
- ORTIZ DE MONTELLANO, P.R., DAVID, S.K., ATOR, M.A. and TEW, D., 1988. Mechanism-based inactivation of horseradish peroxidase by sodium azide. Formation of meso-azidoporphyrin IX. *Biochemistry*, **27**(15), pp. 5470-5476.
- OWEN, J.A., PUNT, J. and STRANFORD, S.A., 2013. *Kuby immunology*. 7th edn. Basingstoke: Macmillan Higher Education.
- PACELLI, R., WINK, D.A., COOK, J.A., KRISHNA, M.C., DEGRAFF, W., FRIEDMAN, N., TSOKOS, M., SAMUNI, A. and MITCHELL, J.B., 1995. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of Escherichia coli. *The Journal of experimental medicine*, **182**(5), pp. 1469-1479.
- PARK, S., YOU, X. and IMLAY, J.A., 2005. Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(26), pp. 9317-9322.

- PARRY, M.F., ROOT, R.K., METCALF, J.A., DELANEY, K.K., KAPLOW, L.S. and RICHA, W.J., 1981. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Annals of Internal Medicine*, **95**(3), pp. 293-301.
- PAUMANN-PAGE, M., FURTMULLER, P.G., HOFBAUER, S., PATON, L.N., OBINGER, C. and KETTLE, A.J., 2013. Inactivation of human myeloperoxidase by hydrogen peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **539**(1), pp. 51-62.
- PERERA, N.C., SCHILLING, O., KITTEL, H., BACK, W., KREMMER, E. and JENNE, D.E., 2012. NSP4, an elastase-related protease in human neutrophils with arginine specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**(16), pp. 6229-6234.
- PETRI, B., PHILLIPSON, M. and KUBES, P., 2008. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **180**(10), pp. 6439-6446.
- PHILLIPSON, M., HEIT, B., COLARUSSO, P., LIU, L., BALLANTYNE, C.M. and KUBES, P., 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of experimental medicine*, **203**(12), pp. 2569-2575.
- PROKOPOWICZ, Z., MARCINKIEWICZ, J., KATZ, D.R. and CHAIN, B.M., 2012. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, **60**(1), pp. 43-54.
- QUINN, M.T., MULLEN, M.L., JESAITIS, A.J. and LINNER, J.G., 1992. Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. *Blood*, **79**(6), pp. 1563-1573.
- RAGLAND, S.A. and CRISS, A.K., 2017. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS pathogens*, **13**(9), pp. e1006512.
- RAHMATI, S., YANG, S., DAVIDSON, A.L. and ZECHIEDRICH, E.L., 2002. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Molecular microbiology*, **43**(3), pp. 677-685.
- RAMOS, C.L., POU, S., BRITIGAN, B.E., COHEN, M.S. and ROSEN, G.M., 1992. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *The Journal of biological chemistry*, **267**(12), pp. 8307-8312.
- REICHEL, C.A., REHBERG, M., BIHARI, P., MOSER, C.M., LINDER, S., KHANDOGA, A. and KROMBACH, F., 2008. Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling. *Journal of leukocyte biology*, **83**(4), pp. 864-874.
- REIF, D.W., 1992. Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free radical biology & medicine*, **12**(5), pp. 417-427.
- RICE, W.G., GANZ, T., KINKADE, J.M., Jr, SELSTED, M.E., LEHRER, R.I. and PARMLEY, R.T., 1987. Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood*, **70**(3), pp. 757-765.
- ROOS, D., KUHNS, D.B., MADDALENA, A., BUSTAMANTE, J., KANNENGIESSER, C., DE BOER, M., VAN LEEUWEN, K., KOKER, M.Y., WOLACH, B., ROESLER, J., MALECH, H.L., HOLLAND, S.M., GALLIN, J.I. and STASIA, M.J., 2010a. Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (second update). *Blood cells, molecules & diseases*, **44**(4), pp. 291-299.
- ROOS, D., KUHNS, D.B., MADDALENA, A., ROESLER, J., LOPEZ, J.A., ARIGA, T., AVCIN, T., DE BOER, M., BUSTAMANTE, J., CONDINO-NETO, A., DI MATTEO, G., HE, J., HILL, H.R., HOLLAND, S.M., KANNENGIESSER, C., KOKER, M.Y., KONDRATENKO, I., VAN LEEUWEN, K., MALECH, H.L., MARODI, L., NUNOI, H., STASIA, M.J., VENTURA, A.M., WITWER, C.T., WOLACH, B. and GALLIN, J.I., 2010b. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood cells, molecules & diseases*, **45**(3), pp. 246-265.

- ROSEN, H. and MICHEL, B.R., 1997. Redundant contribution of myeloperoxidase-dependent systems to neutrophil-mediated killing of Escherichia coli. *Infection and immunity*, **65**(10), pp. 4173-4178.
- SABATH, L.D., GARNER, C., WILCOX, C. and FINLAND, M., 1975. Effect of inoculum and of beta-lactamase on the anti-staphylococcal activity of thirteen penicillins and cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **8**(3), pp. 344-349.
- SAMUNI, A., BLACK, C.D., KRISHNA, C.M., MALECH, H.L., BERNSTEIN, E.F. and RUSSO, A., 1988. Hydroxyl radical production by stimulated neutrophils reappraised. *The Journal of biological chemistry*, **263**(27), pp. 13797-13801.
- SCAPINI, P. and CASSATELLA, M.A., 2014. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, **124**(5), pp. 710-719.
- SEAVER, L.C. and IMLAY, J.A., 2001. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, **183**(24), pp. 7182-7189.
- SEGAL, A.W., GEISOW, M., GARCIA, R., HARPER, A. and MILLER, R., 1981. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature*, **290**(5805), pp. 406-409.
- SENGELOV, H., BOULAY, F., KJELDSEN, L. and BORREGAARD, N., 1994. Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *The Biochemical journal*, **299** (Pt 2)(Pt 2), pp. 473-479.
- SENGELOV, H., FOLLIN, P., KJELDSEN, L., LOLLIKE, K., DAHLGREN, C. and BORREGAARD, N., 1995. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **154**(8), pp. 4157-4165.
- SENGELOV, H., KJELDSEN, L. and BORREGAARD, N., 1993a. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **150**(4), pp. 1535-1543.
- SENGELOV, H., KJELDSEN, L., DIAMOND, M.S., SPRINGER, T.A. and BORREGAARD, N., 1993b. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, **92**(3), pp. 1467-1476.
- SENGELOV, H., KJELDSEN, L., KROEZE, W., BERGER, M. and BORREGAARD, N., 1994. Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **153**(2), pp. 804-810.
- SILVERSTEIN, A.M., 2009. *A history of immunology*. 2nd edn. London: Elsevier/Academic Press.
- SIONOV, R.V., FRIDLINDER, Z.G. and GRANOT, Z., 2015. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*, **8**(3), pp. 125-158.
- SMITH, K.A., 2012. Louis pasteur, the father of immunology? *Frontiers in immunology*, **3**, pp. 68.
- SMITH, K.A., 2011. Edward jenner and the small pox vaccine. *Frontiers in immunology*, **2**, pp. 21.
- SOEHNLEIN, O. and LINDBOM, L., 2009. Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system. *Journal of leukocyte biology*, **85**(3), pp. 344-351.
- SORENSEN, O.E., FOLLIN, P., JOHNSEN, A.H., CALAFAT, J., TJABRINGA, G.S., HIEMSTRA, P.S. and BORREGAARD, N., 2001. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*, **97**(12), pp. 3951-3959.
- STAPELS, D.A., GEISBRECHT, B.V. and ROOIJAKKERS, S.H., 2015. Neutrophil serine proteases in antibacterial defense. *Current opinion in microbiology*, **23**, pp. 42-48.

STEINBECK, M.J., KHAN, A.U. and KARNOVSKY, M.J., 1992. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *The Journal of biological chemistry*, **267**(19), pp. 13425-13433.

STEVENS, D.L., YAN, S. and BRYANT, A.E., 1993. Penicillin-binding protein expression at different growth stages determines penicillin efficacy in vitro and in vivo: an explanation for the inoculum effect. *The Journal of infectious diseases*, **167**(6), pp. 1401-1405.

SURETTE, M.G., MILLER, M.B. and BASSLER, B.L., 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(4), pp. 1639-1644.

TAPPER, H., FURUYA, W. and GRINSTEIN, S., 2002. Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules during phagocytosis: role of Ca²⁺-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **168**(10), pp. 5287-5296.

TECCHIO, C., MICHELETTI, A. and CASSATELLA, M.A., 2014. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Frontiers in immunology*, **5**, pp. 508.

TENG, N., MAGHZAL, G.J., TALIB, J., RASHID, I., LAU, A.K. and STOCKER, R., 2017. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox report : communications in free radical research*, **22**(2), pp. 51-73.

THOMSON, K.S. and MOLAND, E.S., 2001. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**(12), pp. 3548-3554.

URIBE-QUEROL, E. and ROSALES, C., 2015. Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *Journal of immunology research*, **2015**, pp. 983698.

VAN DALEN, C.J., WHITEHOUSE, M.W., WINTERBOURN, C.C. and KETTLE, A.J., 1997. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *The Biochemical journal*, **327** (Pt 2)(Pt 2), pp. 487-492.

VAPORCIYAN, A.A., DELISSER, H.M., YAN, H.C., MENDIGUREN, I.I., THOM, S.R., JONES, M.L., WARD, P.A. and ALBELDA, S.M., 1993. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, **262**(5139), pp. 1580-1582.

WANG, D., DING, X. and RATHER, P.N., 2001. Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **183**(14), pp. 4210-4216.

WANG, G., LI, X. and WANG, Z., 2016. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research*, **44**(D1), pp. D1087-93.

WANG, J.G., MAHMUD, S.A., NGUYEN, J. and SLUNGAARD, A., 2006. Thiocyanate-dependent induction of endothelial cell adhesion molecule expression by phagocyte peroxidases: a novel HOSCN-specific oxidant mechanism to amplify inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **177**(12), pp. 8714-8722.

WANG, S., VOISIN, M.B., LARBI, K.Y., DANGERFIELD, J., SCHEIERMANN, C., TRAN, M., MAXWELL, P.H., SOROKIN, L. and NOURSHARGH, S., 2006. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *The Journal of experimental medicine*, **203**(6), pp. 1519-1532.

WANG, X.D., DE BOER, P.A. and ROTHFIELD, L.I., 1991. A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of *Escherichia coli*. *The EMBO journal*, **10**(11), pp. 3363-3372.

WEGMANN, F., PETRI, B., KHANDOGA, A.G., MOSER, C., KHANDOGA, A., VOLKERY, S., LI, H., NASDALA, I., BRANDAU, O., FASSLER, R., BUTZ, S., KROMBACH, F. and VESTWEBER, D., 2006. ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. *The Journal of experimental medicine*, **203**(7), pp. 1671-1677.

WEI, Y., LEE, J.M., SMULSKI, D.R. and LAROSSA, R.A., 2001. Global impact of sdiA amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, **183**(7), pp. 2265-2272.

WEISS, J., ELSBACH, P., OLSSON, I. and ODEBERG, H., 1978. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of biological chemistry*, **253**(8), pp. 2664-2672.

WEISS, S.J., KLEIN, R., SLIVKA, A. and WEI, M., 1982. Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *The Journal of clinical investigation*, **70**(3), pp. 598-607.

WINKELSTEIN, J.A., MARINO, M.C., JOHNSTON, R.B., Jr, BOYLE, J., CURNUTTE, J., GALLIN, J.I., MALECH, H.L., HOLLAND, S.M., OCHS, H., QUIE, P., BUCKLEY, R.H., FOSTER, C.B., CHANOCK, S.J. and DICKLER, H., 2000. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine*, **79**(3), pp. 155-169.

WINTERBOURN, C.C., HAMPTON, M.B., LIVESSEY, J.H. and KETTLE, A.J., 2006. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *The Journal of biological chemistry*, **281**(52), pp. 39860-39869.

WOLCOTT, R.G., FRANKS, B.S., HANNUM, D.M. and HURST, J.K., 1994. Bactericidal potency of hydroxyl radical in physiological environments. *The Journal of biological chemistry*, **269**(13), pp. 9721-9728.

WOODMANSEE, A.N. and IMLAY, J.A., 2003. A mechanism by which nitric oxide accelerates the rate of oxidative DNA damage in Escherichia coli. *Molecular microbiology*, **49**(1), pp. 11-22.

WOODMANSEE, A.N. and IMLAY, J.A., 2002. Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring Escherichia coli by delivering electrons to intracellular free iron. *The Journal of biological chemistry*, **277**(37), pp. 34055-34066.

WRIGHT, S.D., CRAIGMYLE, L.S. and SILVERSTEIN, S.C., 1983. Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b- and C3bi-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *The Journal of experimental medicine*, **158**(4), pp. 1338-1343.

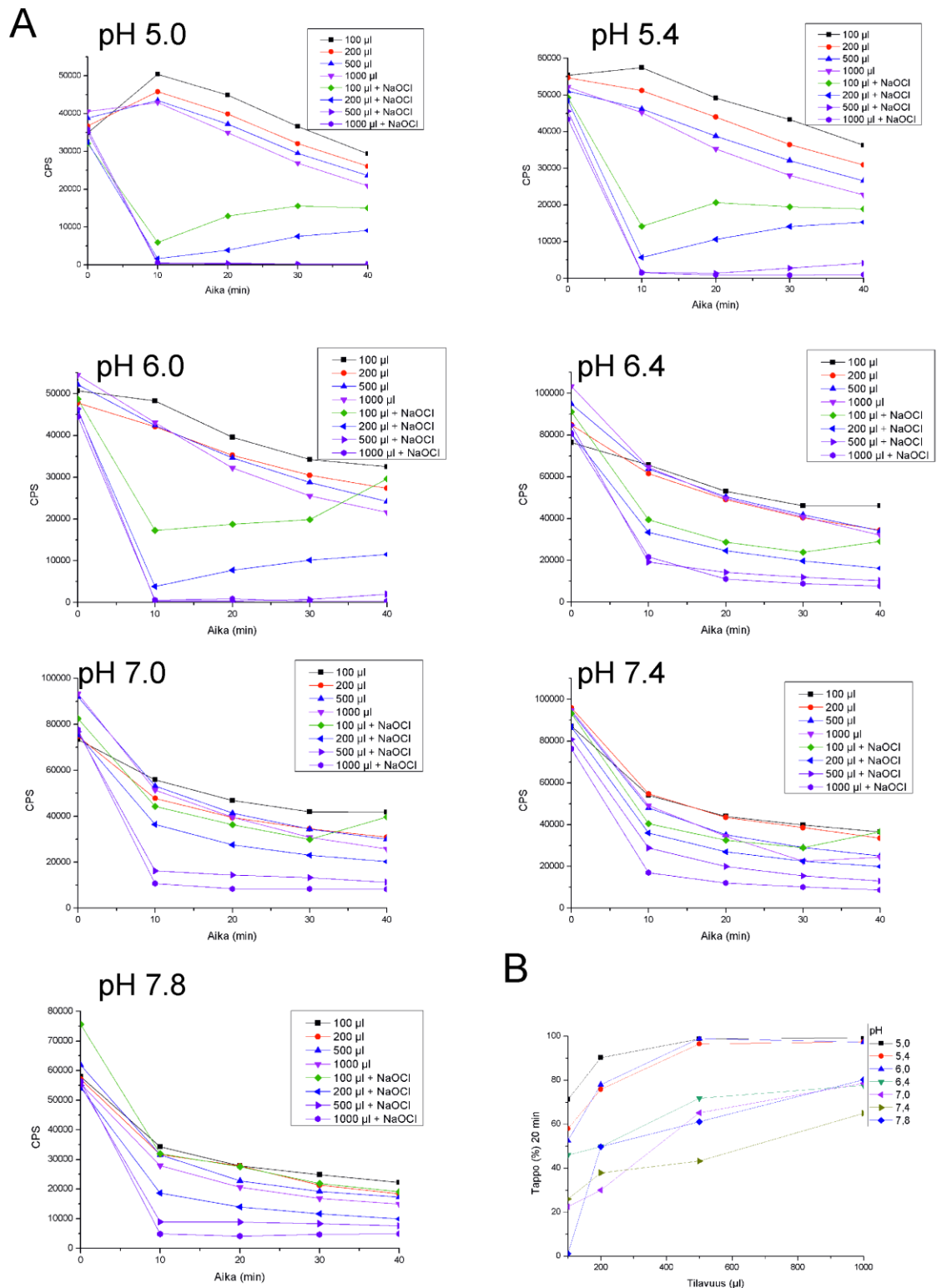
WRIGHT, S.D. and GRIFFIN, F.M., Jr, 1985. Activation of phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis. *Journal of leukocyte biology*, **38**(2), pp. 327-339.

WU, N., CHEN, B.Y., TIAN, S.F. and CHU, Y.Z., 2014. The inoculum effect of antibiotics against CTX-M-extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, **13**, pp. 45-014-0045-1.

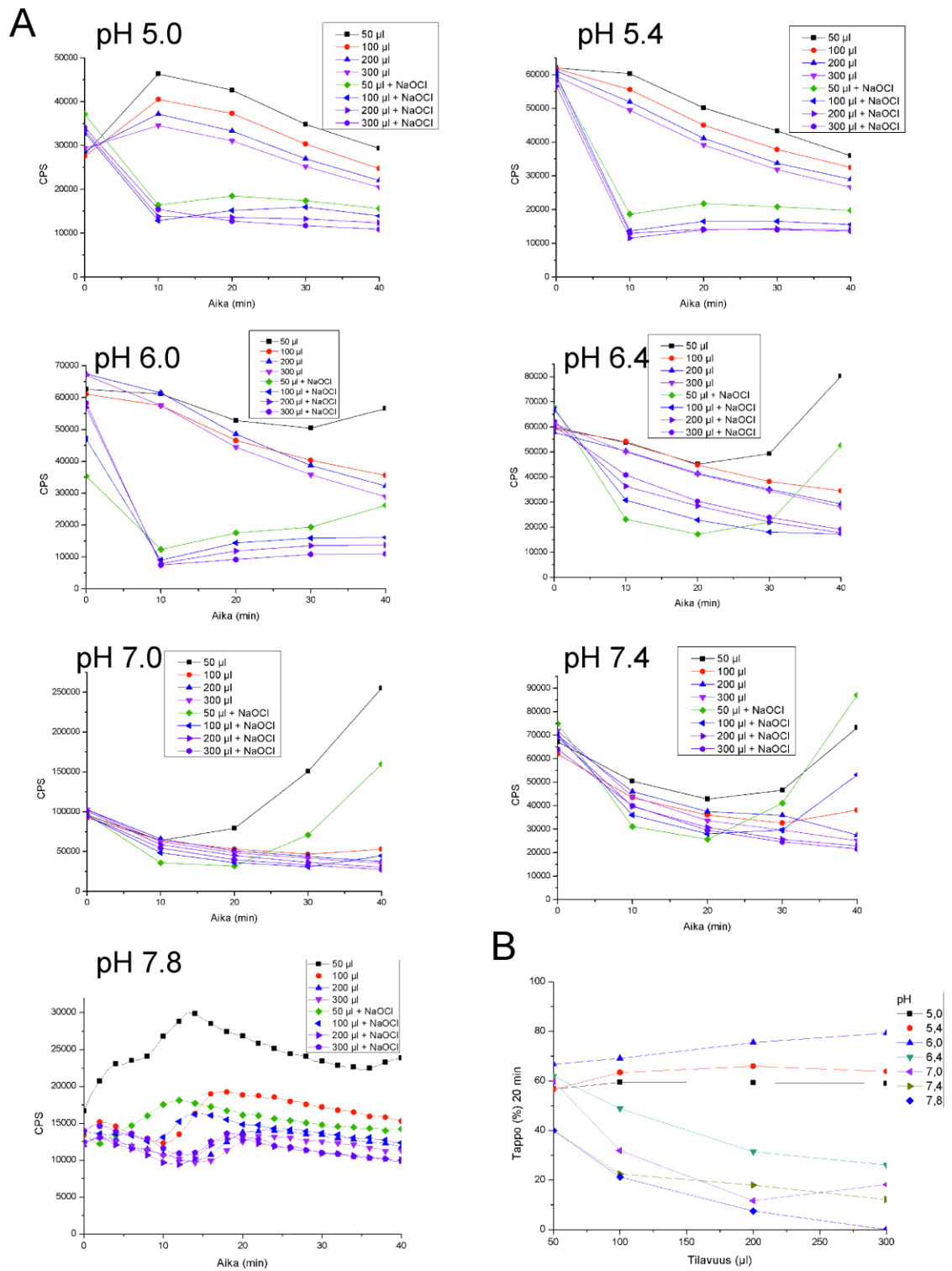
YANG, Z.W., MENG, X.X. and XU, P., 2015. Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **19**(11), pp. 2513-2520.

YEAMAN, M.R. and YOUNT, N.Y., 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, **55**(1), pp. 27-55.

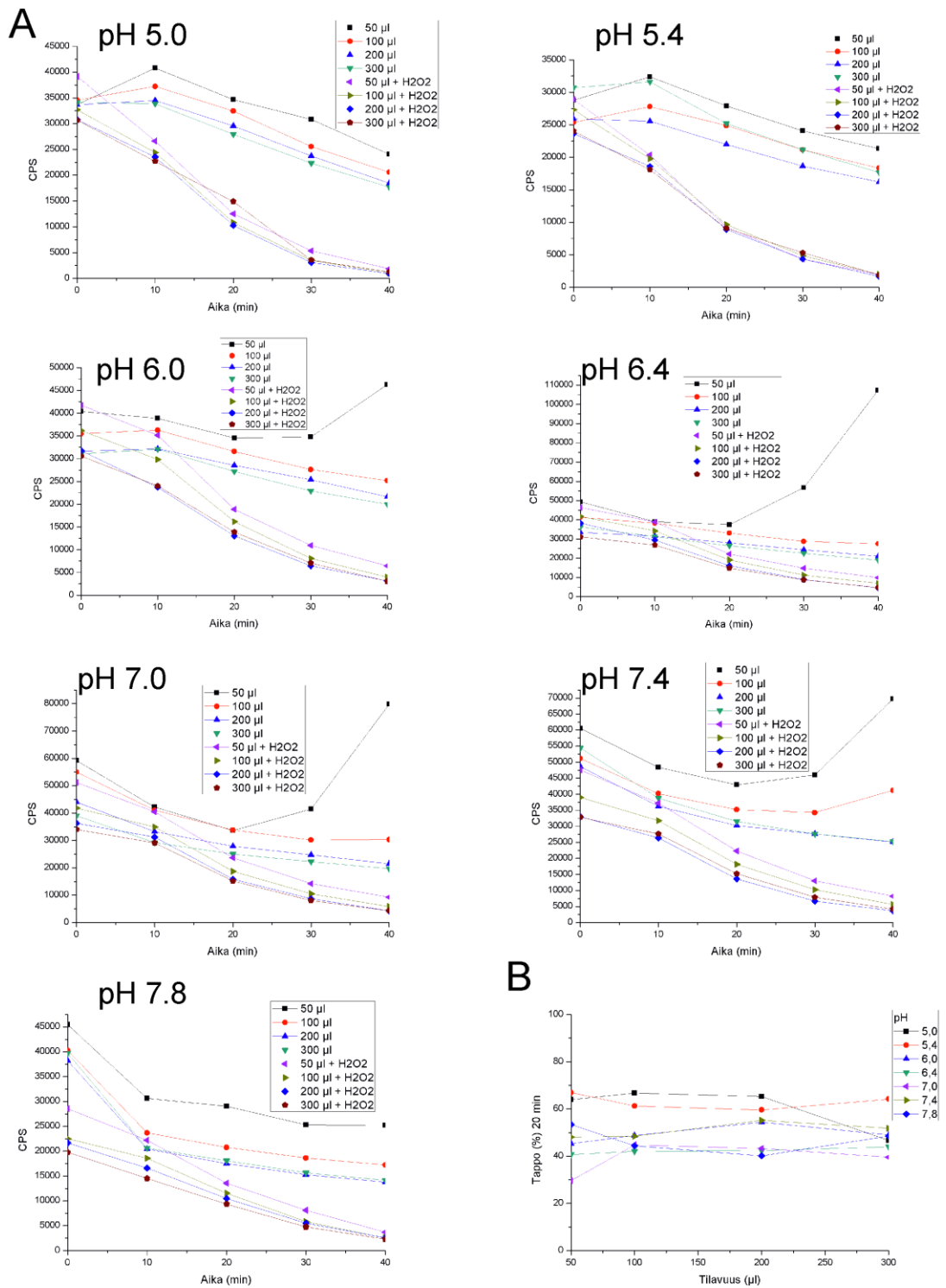
LIITE 1 LUMINESENSIMITTAUKSET HIDEX TRIATHLER LSC:LLÄ



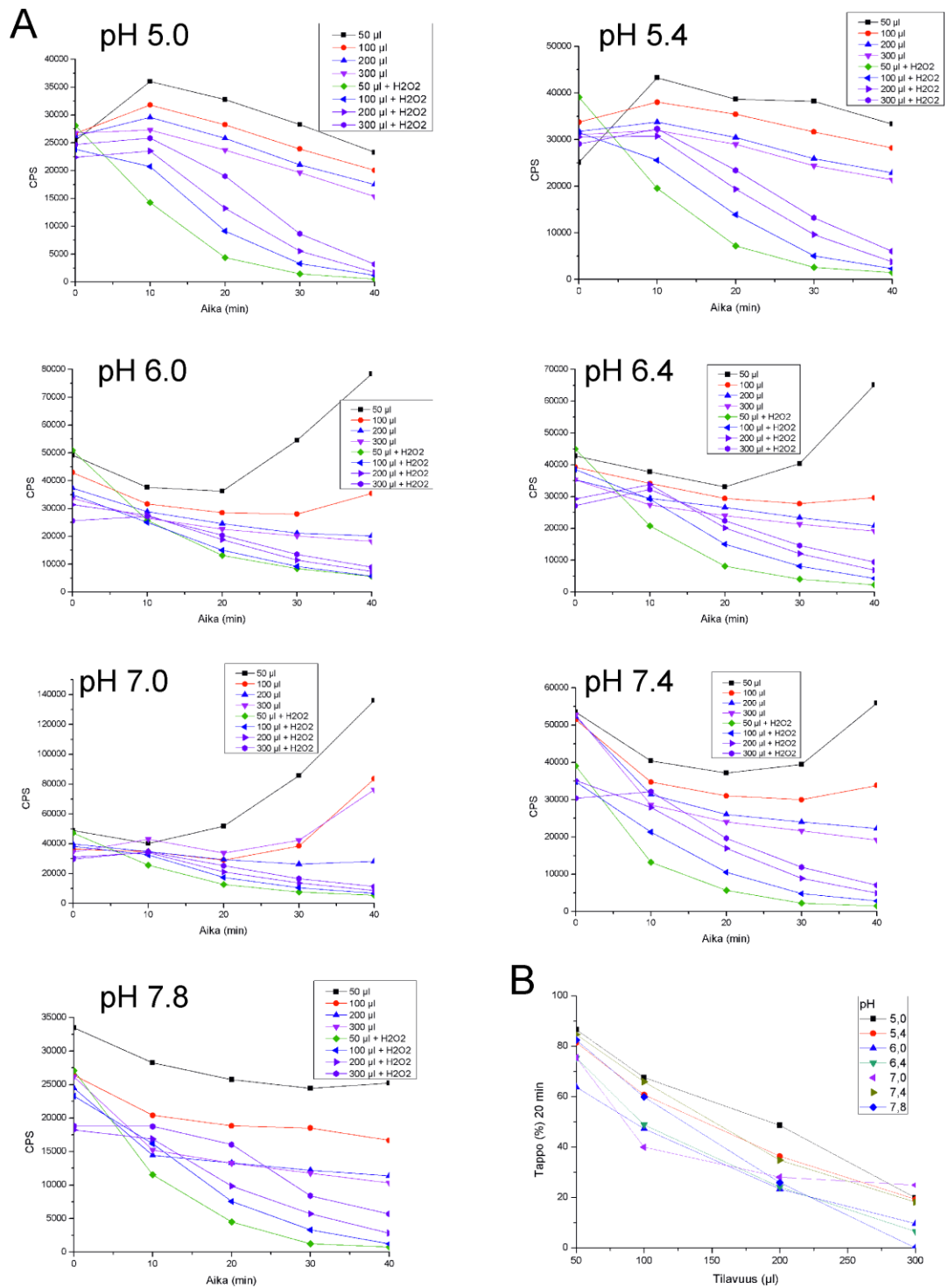
Kuva 1. **A** NaOCl vakiokonsentraatio, pH 5.0-7.8. ■: taustareaktio 100 µl ●: taustareaktio 200 µl ▲: taustareaktio 500 µl ▼: taustareaktio 1000 µl ◆: tapporeaktio 100 µl, NaOCl 0,2 µM ◀: tapporeaktio 200 µl, NaOCl 0,2 µM ▶: tapporeaktio 500 µl, NaOCl 0,2 µM ●: tapporeaktio 1000 µl, NaOCl 0,2 µM. **B** Annosvaste. Tappoprosentti tilavuuden funktiona kussakin pH:ssa 20 minuutin kohdalla.



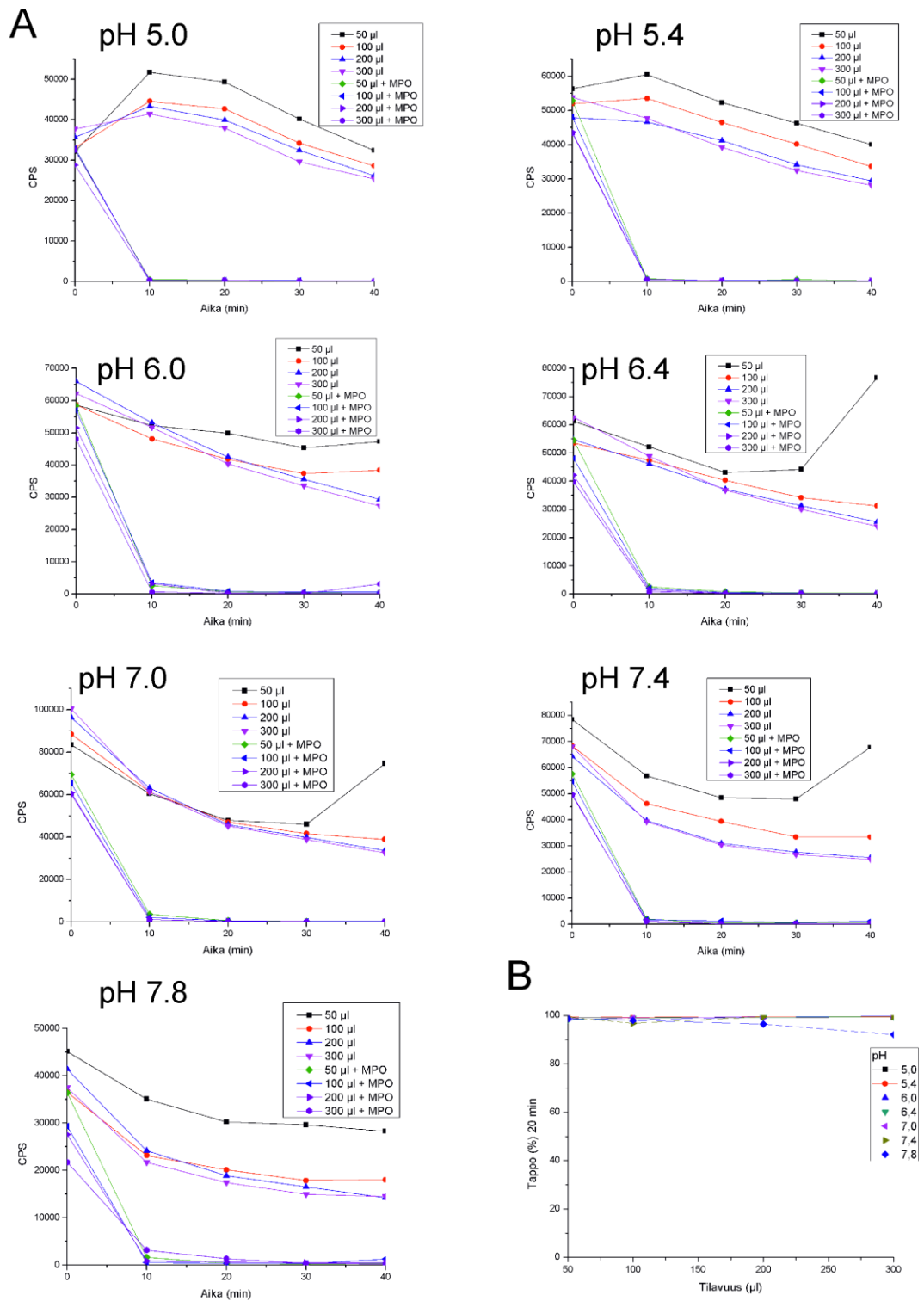
Kuva 2. **A** NaOCl vakioainemäärä, pH 5.0-7.8. pH 7.8:n tulokset korvattiin Hidex Chameleonilla saaduilla vastaavilla mittauksilla. ■: taustareaktio 50 µl ●: taustareaktio 100 µl ▲: taustareaktio 200 µl ▼: taustareaktio 300 µl ◆: tapporeaktio 50 µl, NaOCl 4 µM ◀: tapporeaktio 100 µl, NaOCl 2 µM ▶: tapporeaktio 200 µl, NaOCl 1 µM ●: tapporeaktio 300 µl, NaOCl 0,67 µM. **B** Annosvaste. Tappoprosentti tilavuuden funktiona kussakin pH:ssa 20 minuutin kohdalla.



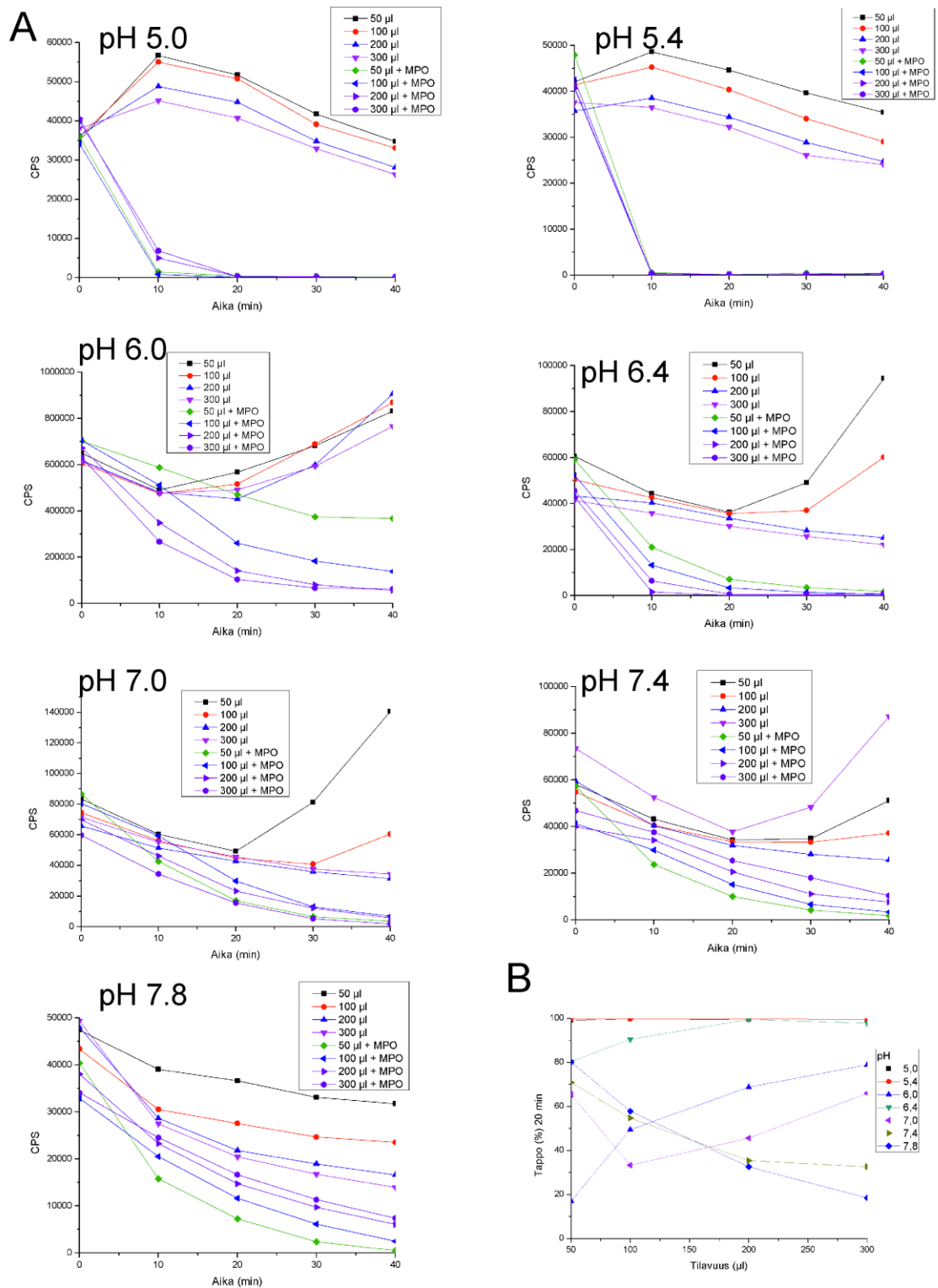
Kuva 3. A H_2O_2 vakiokonsentraatio, pH 5.0-7.8. ■: taustareaktio 50 μl ●: taustareaktio 100 μl ▲: taustareaktio 200 μl ▼: taustareaktio 300 μl ◆: tapporeaktio 50 μl , H_2O_2 100 μM ►: tapporeaktio 100 μl , H_2O_2 100 μM ◆: tapporeaktio 200 μl , H_2O_2 100 μM ◆: tapporeaktio 300 μl , H_2O_2 100 μM . B Annosvaste. Tappoprosentti tilavuuden funktiona kussakin pH:ssa 20 minuutin kohdalla.



Kuva 4. **A** H₂O₂ vakioainemäärä, pH 5.0-7.8. ■: taustareaktio 50 μl ●: taustareaktio 100 μl ▲: taustareaktio 200 μl ▼: taustareaktio 300 μl ◆: tapporeaktio 50 μl, H₂O₂ 200 μM ◀: tapporeaktio 100 μl, H₂O₂ 100 μM ▶: tapporeaktio 200 μl, H₂O₂ 50 μM ●: tapporeaktio 300 μl, H₂O₂ 33 μM. **B** Annosvaste. Tappoprosentti tilavuuden funktiona kussakin pH:ssa 20 minuutin kohdalla.

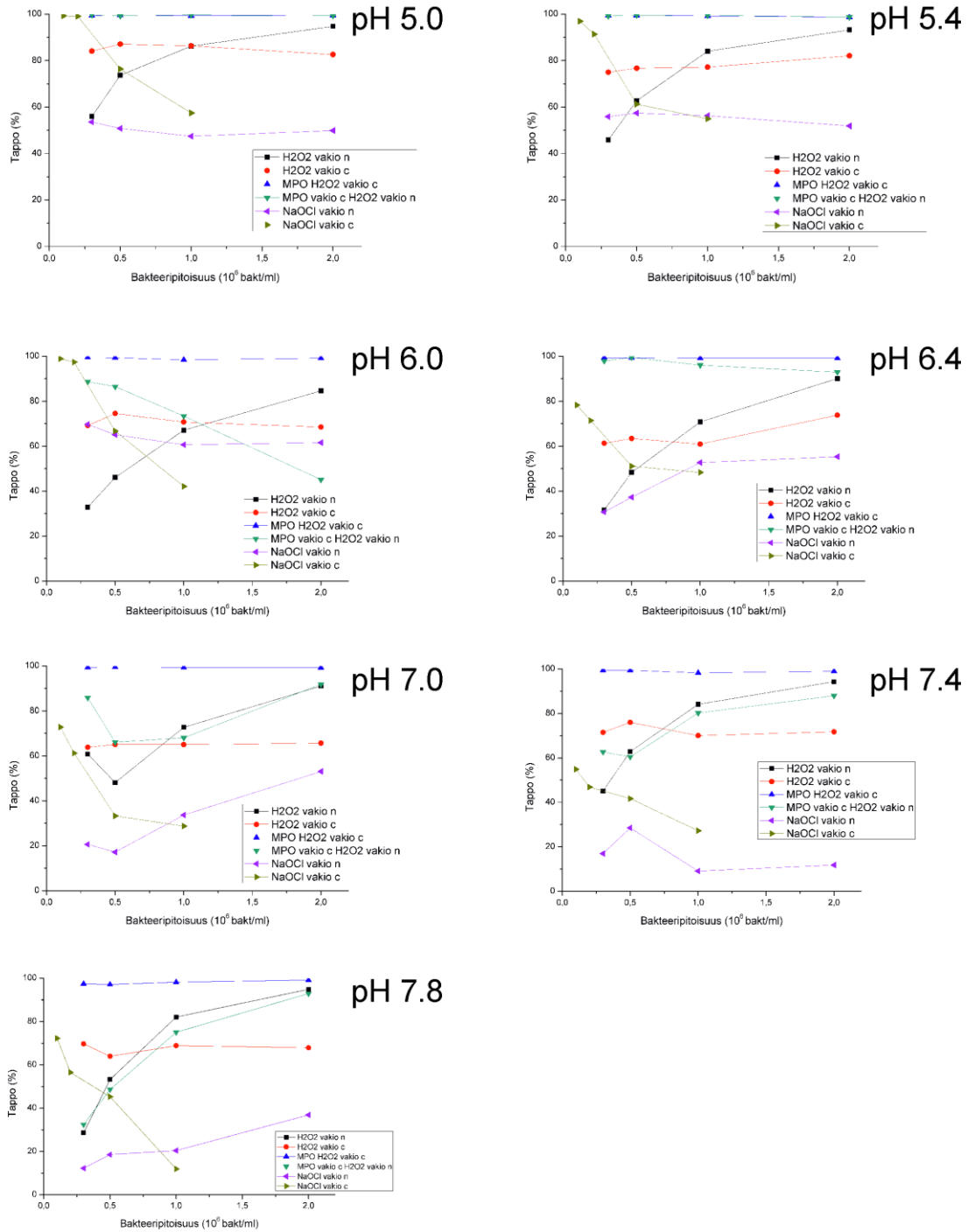


Kuva 5. **A** H_2O_2 vakiokonsentraatio, MPO vakiokonsentraatio, pH 5.0-7.8. **■**: taustareaktio 50 μ l **●**: taustareaktio 100 μ l **▲**: taustareaktio 200 μ l **▼**: taustareaktio 300 μ l **◆**: tapporeaktio 50 μ l, H_2O_2 100 μ M, MPO 0,67 nM **◀**: tapporeaktio 100 μ l, H_2O_2 100 μ M, MPO 0,67 nM **▶**: tapporeaktio 200 μ l, H_2O_2 100 μ M, MPO 0,67 nM **●**: tapporeaktio 300 μ l, H_2O_2 100 μ M, MPO 0,67 nM. **B** Annosvaste. Tappoprosentti tilavuuden funktiona kussakin pH:ssa 20 minuutin kohdalla.



Kuva 6. **A** H_2O_2 vakioainemäärä, MPO vakiokonsentraatio, pH 5.0-7.8. ■: taustareaktio 50 μl ●: taustareaktio 100 μl ▲: taustareaktio 200 μl ▼: taustareaktio 300 μl ◆: tapporeaktio 50 μl , H_2O_2 200 μM , MPO 0,67 nM ◀: tapporeaktio 100 μl , H_2O_2 100 μM , MPO 0,67 nM ▶: tapporeaktio 200 μl , H_2O_2 50 μM , MPO 0,67 nM ◆: tapporeaktio 300 μl , H_2O_2 33 μM , MPO 0,67 nM. **B** Annosvaste. Tappoprosentti tilavuuden funktiona kussakin pH:ssa 20 minuutin kohdalla.

LIITE 2 TAPPO 30 MINUUTIN KOHDALLA BAKTEERIPITOISUUDEN FUNKTIONA HIDEX TRIATHLER LSC:LLÄ



Kuva 1. Tappoprosentti 30 min. kohdalla bakteeripitoisuuden funktiona, reaktiivilavuudet kasvavat vasemmalta oikealle 50 – 300 μ l välillä. ■: H₂O₂ vakioainemäärä 10 nmol ●: H₂O₂ vakiokonsentraatio 100 μ M ▲: MPO vakiokonsentraatio 0,67 nM, H₂O₂ vakiokonsentraatio 100 μ M ▼: MPO vakiokonsentraatio 0,67 nM, H₂O₂ vakioainemäärä 10 nmol ◄: NaOCl vakioainemäärä 0,2 nmol ►: NaOCl vakiokonsentraatio 2 μ M.