

# Indice

	<b>Pag.</b>
<b>Introduzione</b>	<b>4</b>
-L'inflammatione	4
-Ruolo delle citochine e delle chemochine nell'inflammatione	8
-Funzioni delle chemochine	18
-D6: il recettore silente per CC-chemochine	23
-Tir8: il recettore per citochine atipico	29
-Formazione del granuloma nella tubercolosi	33
-Chemochine e tubercolosi	39
-Ruolo dei recettori D6 e Tir8 nell'inflammatione sistemica indotta dall'infezione con <i>M. tuberculosis</i>	42
<b>Materiali e Metodi</b>	<b>45</b>
-Generazione di topi D6 <sup>-/-</sup>	45
-Generazione di topi Tir8 <sup>-/-</sup>	46
-Infezione con <i>M. tuberculosis</i> bioluminescente e determinazione delle CFU nei vari organi	47
-Analisi citofluorimetrica dell'infiltrato cellulare negli organi dei topi infettati con <i>M. tuberculosis</i>	50
-Preparazione di cellule dendritiche	52

-ELISPOT per la determinazione delle cellule T secernenti IFN- $\gamma$	52
-ELISA per la determinazione dei livelli di citochine e chemochine	53
-Determinazione delle transaminasi sieriche, dell'azoto ureico ematico (BUN) e della proteinuria	54
-Neutralizzazione delle chemochine pro-infiammatorie <i>in vivo</i>	55
-Neutralizzazione delle citochine pro-infiammatorie <i>in vivo</i>	56
-Analisi istologica	57
-Analisi statistica	58
<b>Risultati</b>	<b>59</b>
-Elevata mortalità di topi D6 <sup>-/-</sup> e Tir8 <sup>-/-</sup> in seguito ad infezione con <i>M. tuberculosis</i>	59
-Infiltrazione leucocitaria nei tessuti di topi D6 <sup>-/-</sup> e Tir8 <sup>-/-</sup> infettati con <i>M. tuberculosis</i>	67
-Aumento dei livelli citochinici e chemochinici in topi D6 <sup>-/-</sup> e Tir8 <sup>-/-</sup> infettati con <i>M. tuberculosis</i>	71
-Effetti della neutralizzazione <i>in vivo</i> delle chemochine pro-infiammatorie	77
-Effetti della neutralizzazione <i>in vivo</i> delle citochine pro-infiammatorie	82
<b>Discussione</b>	<b>85</b>
-Ruolo del recettore D6 nel controllo della risposta immunitaria e/o infiammatoria in corso di tubercolosi	85
-Ruolo del recettore Tir8 nel controllo della risposta immunitaria e/o	

infiammatoria in corso di tubercolosi

92

**Bibliografia**

**100**

**Introduzione**

## **L'infiammazione**

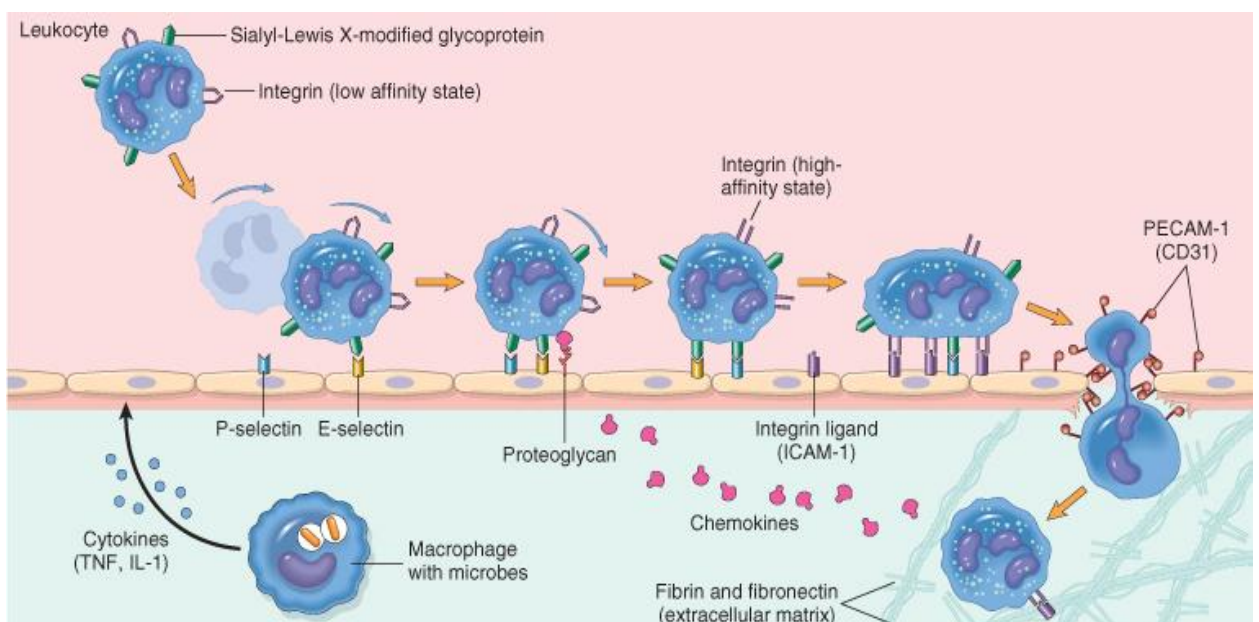
L'**infiammazione** o **flogosi** è un meccanismo difensivo che il nostro organismo mette in atto per proteggersi dall'azione nociva di agenti fisici, chimici e biologici e dalle loro conseguenze, quali cellule e tessuti necrotici.

La risposta infiammatoria consta di due componenti principali: **la reazione vascolare** e **la reazione cellulare**.

La **reazione vascolare** consiste in una sequenza dinamica di fenomeni indotti dalla liberazione di sostanze endogene, quali istamina, trombina, leucotrieni, citochine e chemochine, con caratteristiche relativamente costanti che culminano in una intensa reazione vascolare e più precisamente in vasodilatazione e aumento di permeabilità, che portano al passaggio di liquidi e proteine dal letto vascolare al tessuto lesa, con conseguente formazione di un essudato o edema. La **reazione cellulare** è data principalmente dall'infiltrazione leucocitaria nell'area della lesione.

Tale reazione può essere suddivisa in più fasi temporalmente consecutive: **la marginazione**, in cui un maggior numero di leucociti si posiziona lungo la parete del vaso poiché il flusso rallenta, **il rotolamento**, in cui i leucociti prima singolarmente poi in file intere, rotolano lungo l'endotelio aderendovi transitoriamente, e **l'adesione**, in cui i leucociti rotolano fino a quando non

aderiscono saldamente all'endotelio. Il movimento, o **diapedesi**, dei leucociti attraverso l'endotelio avviene in seguito all'inserimento degli pseudopodi leucocitari nelle giunzioni tra le cellule endoteliali. La diapedesi, che determina il passaggio dei leucociti dal circolo ematico al sito tissutale danneggiato, avviene grazie all'espressione di molecole di adesione, quali selectine, glicoproteine mucina-simile, immunoglobuline ed integrine, e alla chemiotassi dei leucociti presenti nello spazio interstiziale che vengono attirati dagli agenti chemiotattici, le chemochine, che li indirizzano verso la sede del danno dove svolgeranno le loro funzioni biologiche (Fig. 1).



**Figura 1: Adesione cellulare, diapedesi e chemiotassi.**

Da un punto di vista clinico, la vasodilatazione, l'aumento della permeabilità dei capillari, l'edema e l'infiltrazione leucocitaria si manifestano attraverso quelli

che sono i segni cardine dell'infiammazione: **RUBOR** (arrossamento), **TUMOR** (tumefazione), **CALOR** (calore), **DOLOR** (dolore), individuati nel I secolo d.C. da Celso, e **FUNCTIO LAESA** (alterazione funzionale), individuato nel 1844 da Virchow.

L'infiammazione, inoltre, viene classificata secondo un criterio temporale in **infiammazione acuta e infiammazione cronica**.

L'**infiammazione acuta** è caratterizzata da un esordio rapido (secondi o minuti), da una durata relativamente breve (da pochi minuti a diverse ore, fino ad alcuni giorni), dalla formazione dell'edema, dalla migrazione dei leucociti, soprattutto neutrofili, e dalla guarigione successiva all'infiammazione.

L'**infiammazione cronica** è invece caratterizzata da una maggiore durata (settimane, mesi), dalla presenza di linfociti e macrofagi, da angiogenesi, da infiammazione e tentativi di guarigione simultanei, da fibrosi e necrosi tissutale. Quest'ultima può poi essere distinta secondo un criterio spaziale in **diffusa** (infiammazione cronica interstiziale) oppure **circoscritta** (infiammazione cronica granulomatosa). Nella prima il quadro morfologico, rappresentato dall'infiltrato linfomonocitario, si presenta con prevalenza di linfociti e plasmacellule e mantiene le stesse caratteristiche qualunque sia l'agente eziologico responsabile del processo.

Le infiammazioni croniche granulomatose, invece, intervengono quando microrganismi di vario tipo sopravvivono nei fagolisosomi dei macrofagi o quando in questi rimangono loro prodotti, o anche materiali di natura organica o inorganica, indigeribili. Questo è il caso della tubercolosi, il cui agente eziologico, il *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), permane silente all'interno dei macrofagi, senza essere eliminato dall'organismo ospite.

L'infiammazione cronica è, quindi, un processo flogistico di lunga durata in cui coesistono l'infiammazione attiva, la distruzione tissutale e i tentativi di riparazione e può derivare da una persistenza degli antigeni flogogeni in seguito ad un'infiammazione acuta non completamente risolta, come nel caso di esposizione prolungata ad agenti tossici, quali silicosi, cirrosi ed aterosclerosi, o di malattie autoimmuni e di ipersensibilità o di infezioni persistenti, quali tubercolosi e sifilide. L'infiammazione serve, dunque, a distruggere, diluire e confinare l'agente lesivo, ma allo stesso tempo mette in moto una serie di meccanismi che favoriscono la riparazione o la sostituzione del tessuto danneggiato. Tuttavia infiammazione e riparazione, se non strettamente controllate, possono essere potenzialmente dannose per l'organismo stesso, determinando l'insorgenza di reazioni autoimmuni.

## **Ruolo delle citochine e delle chemochine nell'infiammazione**

Citochine e chemochine sono alcuni dei principali mediatori endogeni dei fenomeni infiammatori che si instaurano nel corso di risposte immunitarie evocate da microrganismi quali virus, batteri e funghi, da cellule tumorali e da antigeni self nelle risposte autoimmuni. Le **citochine** sono molecole biologiche che agiscono come mediatori solubili dell'immunità innata ed adattativa.

Costituiscono un gruppo di proteine o glicoproteine a basso peso molecolare (fino a 25 kD), prodotte dalle cellule immunocompetenti, costitutivamente ed in modo attivamente regolato, durante la fase effettrice dell'immunità innata e di quella specifica, per mediare e controllare la risposta immunitaria, la reazione infiammatoria e la fagocitosi. Attualmente, sono descritte come molecole multifunzionali, insieme alle **chemochine** ed alle **molecole di adesione**, quali selectine ed integrine, che svolgono importanti attività biologiche nell'ematopoiesi, nell'immunità, nelle malattie infettive, nella tumorigenesi, nell'omeostasi e nella riparazione dei tessuti, nella crescita e nello sviluppo cellulare (1, 2).

Le citochine, più propriamente dette interleuchine nel caso delle interazioni linfocitarie, condividono tre proprietà che rendono i loro effetti biologici molto complessi e più precisamente, **pleiotropici**, **ridondanti** e **sinergici**. Il **pleiotropismo** consiste nel fatto che le citochine svolgono differenti effetti su diversi tipi di cellule bersaglio, la **ridondanza** nel fatto che più citochine mediano



le stesse attività biologiche ed infine il **sinergismo** indica che l'effetto combinato di più citochine può risultare maggiore della somma degli effetti biologici delle singole citochine.

Presupposto essenziale per lo svolgimento delle attività biologiche delle interleuchine è quello di legarsi a specifici recettori presenti sulla membrana delle cellule bersaglio. La loro attività può essere ulteriormente distinta in **autocrina**, quando si legano a recettori presenti sulla membrana della stessa cellula che le secerne, **paracrina**, quando si legano a recettori presenti su cellule bersaglio situate in prossimità delle cellule che le producono ed **endocrina**, quando i recettori specifici ai quali si legano sono espressi da cellule e tessuti fisicamente distanti ed appartenenti a sistemi biologici complessi, sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

Il legame di una citochina alla sua cellula bersaglio può stimolare sia l'espressione di recettori per citochine, sia la produzione di altre citochine che a loro volta agiscono su altre cellule bersaglio con un effetto a cascata.

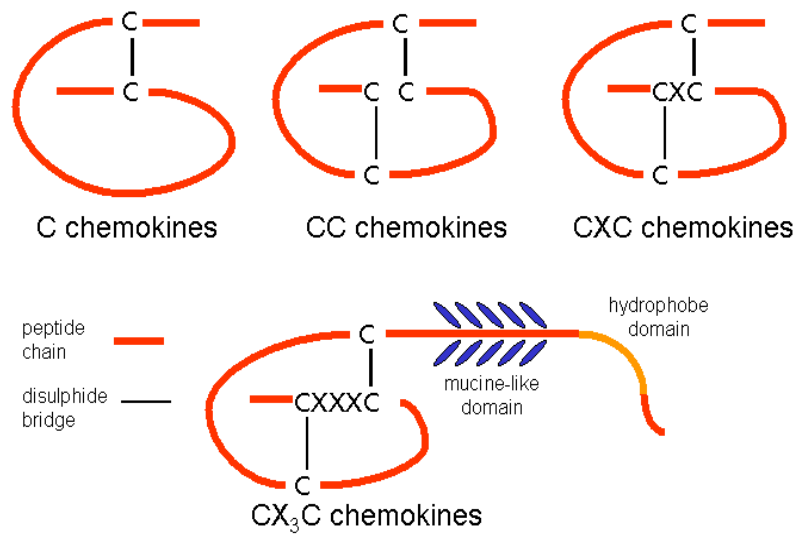
Il tipo e l'ampiezza della risposta immunitaria sono determinati e regolati, inizialmente, dal meccanismo di riconoscimento dell'antigene. A questo complesso fenomeno segue la modulazione della risposta stessa che è, per gran parte, determinata dalla produzione, dal rilascio nel mezzo-ambiente e dalla efficace attività biologica delle citochine. Questi fenomeni sono comuni sia alle

risposte fisiologiche e controllate, sia a quelle immunitarie patologiche ed alterate nella loro regolazione (3).

In relazione alla struttura ed all'attività biologica preponderante, nell'uomo vengono prodotti differenti tipi di molecole attive nel sistema immunitario: **interleuchine (IL)**, **tumor necrosis factors (TNF)**, **linfotossine (LT)**, **interferoni (IFN)**, **colony stimulating factors (CSF)**, **citochine regolatrici** e **chemochine** (4).

La famiglia delle chemochine può essere ulteriormente distinta in quattro sottofamiglie caratterizzate da due a quattro residui cisteinici altamente conservati nella sequenza della molecola.

Le due famiglie principali di chemochine sono rappresentate dalle  **$\alpha$ -chemochine**, o **CXC-chemochine**, che hanno i due residui cisteinici amino-terminali tra loro separati da un aminoacido non conservato (X), mentre la famiglia delle  **$\beta$ -chemochine**, o **CC-chemochine**, presenta due residui cisteinici giustapposti. La famiglia delle  **$\gamma$ -chemochine**, o **C-chemochine**, contiene un solo residuo cisteinico in posizione amino-terminale, mentre la famiglia delle  **$\delta$ -chemochine**, o **CX<sub>3</sub>C-chemochine**, mostra i due residui cisteinici tra loro separati da tre residui aminoacidici (5) (Fig. 2).



© Kohidai, L.

**Figura 2: Struttura delle chemochine e loro suddivisione in sottoclassi.**

La maggior parte delle chemochine umane appartiene alla famiglia delle CXC- e CC-chemochine, mentre solo due chemochine dell'uomo appartengono alle altre due famiglie (linfotattina, attiva su cellule T e NK e fractalchina, attiva su monociti e cellule NK, rispettivamente).

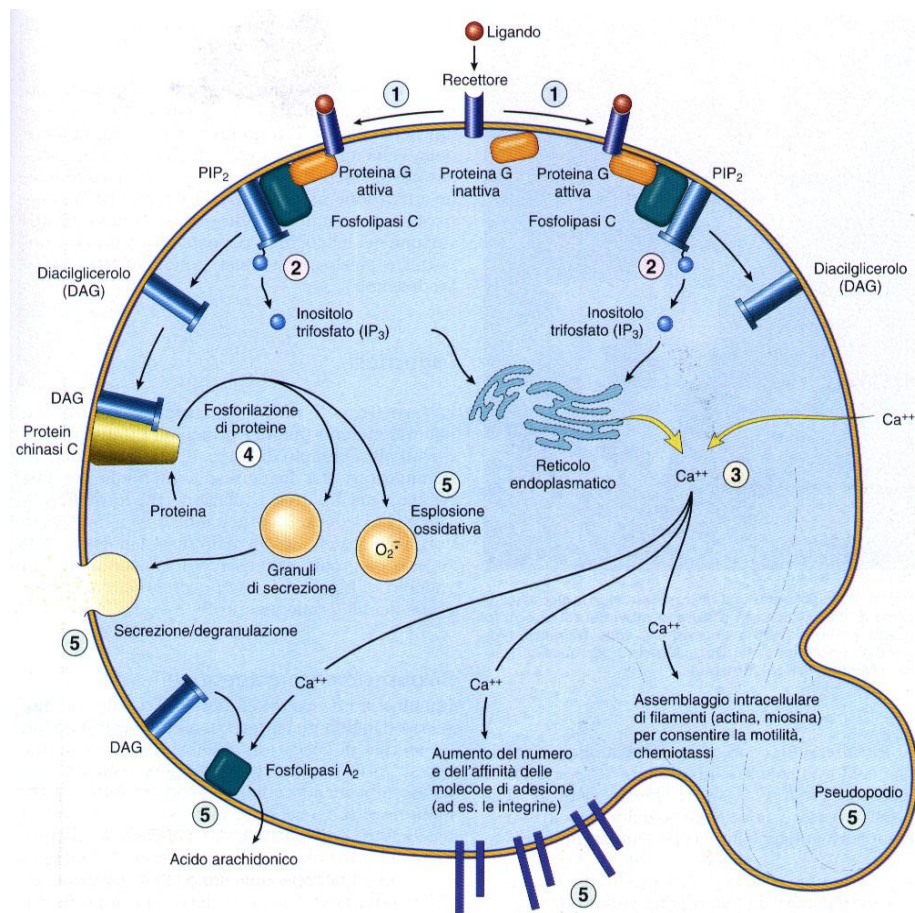
La divisione strutturale delle chemochine si rispecchia nella loro differente posizione nel genoma. La maggior parte delle chemochine CC sono infatti codificate da un grande gruppo multigenico localizzato sul cromosoma 17q11.2, mentre la maggior parte delle chemochine CXC sono codificate da due grandi gruppi multigenici localizzati sul cromosoma 4q21. Le chemochine C e CX<sub>3</sub>C sono codificate da singoli geni localizzati sui cromosomi 1q23 e 16q13, rispettivamente.

Le chemochine esercitano la loro funzione biologica interagendo ed attivando dei recettori specifici. I recettori delle chemochine appartengono alla famiglia della rodopsina, un gruppo di molecole recettoriali accoppiate alle proteine G, i cui membri sono caratterizzati dal possedere sette domini ad  $\alpha$ -elica che attraversano la membrana plasmatica (GCPRs). In particolare, gran parte di questi recettori interagisce con una proteina G di tipo inibitorio, causando quindi una diminuzione dei livelli intracellulari di AMP ciclico (cAMP), anche se alcune chemochine inducono l'attivazione della chinasi PI3K $\gamma$  (fosfatidil inositolo 3-chinasi) e agiscono anche sulla via delle MAP chinasi (6). Brevemente, l'attacco del ligando al dominio extracellulare di questi recettori induce una modificazione conformazionale che permette al dominio citosolico del recettore di legarsi ad una proteina G $\alpha\beta\gamma$  associata alla faccia interna della membrana ed in grado di legare il GTP e di catalizzarne l'idrolisi a GDP.

Questa interazione determina la dissociazione della subunità  $\alpha$  dalle subunità  $\beta$  e  $\gamma$ . Nel lasso di tempo che intercorre tra la dissociazione delle due porzioni della proteina e l'idrolisi del GTP da parte della subunità  $\alpha$ , queste sono in grado di interagire con i propri target molecolari ed innescare, all'interno della cellula, la cascata di trasduzione del segnale. Esistono diverse classi di proteine G, suddivise in base alla struttura e al loro bersaglio di attivazione. In particolare, le proteine G $s$  (stimolatorie) attivano l'adenilato ciclasi, enzima che fa aumentare i

livelli citoplasmatici del secondo messaggero cAMP, le proteine Gq attivano la fosfolipasi C, che taglia il PIP<sub>2</sub> (fosfatidil inositolo 4,5-difosfato) formando IP<sub>3</sub> (fosfatidil inositolo 1,4,5-trifosfato) e DAG (diacil glicerolo), due secondi messaggeri che portano ad un aumento dei livelli intracellulari di calcio.

Infine, le proteine Gi (inibitorie) hanno un'azione antagonista rispetto alle proteine Gs, determinando una caduta della concentrazione di AMP ciclico (7) (Fig. 3).



**Figura 3: Cascata di segnali ed attivazione di molecole effettrici.** Gli agenti chemiotattici si legano a recettori transmembrana accoppiati alle proteine G.

I recettori per le chemochine presentano tre *loops* extracellulari e un segmento amino-terminale che formano, nel loro complesso, una tasca di legame attraverso la quale il recettore interagisce con la propria chemochina-ligando. La stabilizzazione di questa tasca è facilitata dalla presenza di un ponte disolfuro tra il segmento amino-terminale e il terzo *loop* extracellulare. I tre *loops* intracitoplasmatici, invece, permettono l'associazione del recettore ad una proteina G. La coda carbossi-terminale è coinvolta nell'internalizzazione e nella regolazione dell'attività del recettore. Questa, infatti, è ricca di residui di serina e treonina, che probabilmente vengono fosforilati dalla protein kinasi C (PKC) in seguito al legame della chemochina al recettore. Questo porterebbe ad una rapida endocitosi del complesso ligando-recettore che, a sua volta, determinerebbe lo spegnimento del segnale. Questa serie di eventi causano un fenomeno meglio noto come desensibilizzazione recettoriale, ovvero la mancata risposta della cellula in seguito ad una risomministrazione della chemochina legata (8).

I recettori per le chemochine mancano di un unico carattere distintivo che permette di distinguerli dagli altri membri della famiglia delle GPCRs. Possiedono però un'omologia di sequenza variabile tra il 25 e l'80% e una serie di caratteristiche che, se vengono considerate congiuntamente, consentono di

raggruppare questi recettori in un'unica grande sottofamiglia distinta dagli altri recettori accoppiati alle proteine G. Tra queste troviamo:

- la lunghezza variabile tra 340 e 370 amminoacidi;
- un segmento amino-terminale ricco di residui acidi;
- la sequenza DRYLAIVHA (o una variante di questa) all'interno della seconda ansa citoplasmatica;
- residui basici nella terza breve ansa intracellulare;
- un residuo di cisteina in ciascuna delle quattro anse extracellulari.

Uno dei problemi nella comprensione della fisiologia delle chemochine sta nel fatto che una chemochina può legare diversi recettori, così come un recettore può legare diverse chemochine.

Questa **promiscuità** è stata valutata sperimentalmente tramite saggi di cross-desensibilizzazione recettoriale ovvero, trattando, ad esempio, neutrofili con IL-8 si può notare un aumento di calcio intracellulare che testimonia la risposta di questa cellula al legame della chemochina. Questa pre-incubazione previene l'attivazione cellulare da parte di GRO $\alpha$  (Growth regulated oncogene-alpha), una citochina chemiotattica strutturalmente correlata all'IL-8 ed un potente attivatore dei neutrofili, ma non il contrario. Questo suggerisce la presenza di due recettori per IL-8, uno dei quali lega anche GRO $\alpha$  con la medesima affinità (9).

Come già accennato, la maggior parte di questi recettori possono legare più chemochine, appartenenti però tutte alla stessa classe. Fa eccezione il caso del recettore **DARC** o **Duffy blood group antigen**, che lega con alta affinità chemochine sia della famiglia  $\alpha$  che della famiglia  $\beta$ . In base a queste osservazioni, si è proposto di dividere anche queste molecole in gruppi o sottofamiglie che ricalcano quelle delle chemochine. Come stabilito nel 1996, i recettori che legano chemochine appartenenti alla sottofamiglia CXC vengono chiamati CXCRs, mentre quelli leganti chemochine CC prendono il nome di CCRs. Finora, nei mammiferi, sono stati descritti 18 recettori, 10 per le chemochine CC (CCR1-10), 6 per le chemochine CXC (CXCR1-6), 1 per le chemochine C e le chemochine CX<sub>3</sub>C (XCR1 e CX<sub>3</sub>CR1, rispettivamente) (5).

Le differenti sottofamiglie di chemochine agiscono sui loro specifici recettori espressi su differenti sottotipi di cellule. Il sistema delle chemochine è altamente promiscuo, presumibilmente per fornire flessibilità e specificità nel traffico leucocitario, e pleiotropico, dal momento che le chemochine agiscono contemporaneamente su differenti, anche se funzionalmente correlate, popolazioni leucocitarie, al fine di coordinarne il reclutamento. In generale, i neutrofili sono il principale target delle chemochine CXC, che agiscono attivando i recettori CXCR1 e CXCR2.



I monociti, invece, sono principalmente reclutati dalle chemochine CC, che agiscono attivando i recettori CCR1, CCR2 e CCR5. I linfociti Th1 e le cellule NK, principali operatori della risposta infiammatoria di tipo I, sono principalmente reclutati dalle chemochine CXC e CX<sub>3</sub>C che attivano i recettori CXCR3 e CX<sub>3</sub>CR1. Infine, i linfociti Th2 e gli eosinofili, associati alle risposte infiammatorie di tipo II, sono reclutati attraverso l'azione degli agonisti CCR3 e CCR4.

Dal punto di vista strutturale le chemochine presentano delle sequenze aminoacidiche e una struttura secondaria e terziaria molto simili tra loro.

Queste proteine sono dei multimeri (dimeri o tetrameri), la cui struttura è comunque diversa tra CC e CXC chemochine. La dimerizzazione è importante nella funzione di queste molecole, sia perchè questa è necessaria per il legame funzionale con il recettore, ma anche in quanto il legame con molecole complesse *in vivo*, quali i glicosaminoglicani, è favorito e stabilizzato da questa particolare struttura.

In base alla loro regolazione e produzione, le chemochine possono essere distinte in **chemochine omeostatiche**, le quali controllano il rientro dei leucociti e il ricircolo dei linfociti in condizioni normali, e in **chemochine infiammatorie**, le quali vengono prodotte in risposta a stimoli infiammatori, come il Fattore di Necrosi Tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o l'Interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), al fine di reclutare linfociti durante l'infiammazione (5). Le chemochine giocano un ruolo nella

polarizzazione delle risposte immunitarie, supportando il reclutamento selettivo di cellule T polarizzate e specifiche di tipo I e II, cellule effettrici che esprimono distinti recettori chemochinici.

Le chemochine possono inoltre essere considerate markers molecolari di differenti tipi di macrofagi infiammatori: tra questi un differente pannello di recettori chemochinici caratterizza i macrofagi M1 e M2, che evolvono rispettivamente in macrofagi di tipo I e II (9).

## **Funzioni delle chemochine**

Le chemochine esprimono svariate funzioni, molte delle quali largamente sovrapposte, e sono prodotte da una grande varietà di tipi cellulari generalmente coinvolti nelle risposte flogistiche. Le chemochine agiscono su più tipi cellulari svolgendo un gran numero di azioni descritte *in vitro* quali la chemiotassi, il rilascio di enzimi da depositi intracellulari, la formazione di radicali dell'ossigeno, l'induzione di modifiche al citoscheletro, la formazione di mediatori lipidici e l'induzione della adesione all'endotelio o alla matrice extracellulare. La coordinata espressione di chemochine e di molecole di adesione regola il traffico linfocitario dal compartimento intravascolare a quello extravascolare.

Inoltre, è stato dimostrato il loro coinvolgimento nella regolazione dell'angiogenesi, nella regolazione neuronale e nella morfogenesi.

La **chemiotassi** è stimolata dalla regolazione dell'espressione di molecole di adesione sulla superficie cellulare, ad esempio selectine ed integrine, in modo che le cellule possano aderire alle cellule endoteliali dopo la fase di rotolamento e quindi extravasare.

Gli effetti delle chemochine sulla produzione di elementi cellulari del sangue sono duplici. In presenza di G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) o GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), GRO- $\alpha$ , MIP (Macrophage Inflammatory Protein)-1 $\alpha$  e -1 $\beta$  stimolano la maturazione delle cellule staminali verso la linea monocitaria-macrofagica. Le stesse molecole sono tuttavia anche in grado di sopprimere la proliferazione e, probabilmente, anche la differenziazione di alcuni precursori midollari. Analoghi effetti sono svolti anche da GRO- $\beta$ , PF4 (Platelet Factor), IL-8, MCP (Monocyte Chemotactic Protein)-1, IP (Interferon gamma-Induced Protein)-10, mentre altre chemochine (RANTES, NAP-2) non sembrano svolgere alcuna attività emopoietica. La diversa capacità delle chemochine nello stimolare o inibire la differenziazione delle cellule staminali emopoietiche non sembra dipendere dalla loro struttura chimica ma piuttosto dal diverso grado di espressione dei recettori per tali chemochine da parte dei precursori midollari.

Una delle principali attività delle chemochine è rappresentata dal richiamo delle cellule immunocompetenti a livello degli organi linfoidi, un ruolo di fondamentale importanza nello sviluppo della risposta immune. I progenitori comuni linfoidi lasciano il midollo osseo e circolano per raggiungere gli organi linfoidi primari guidati da chemochine, specie di tipo CXC. Alcune chemochine espresse a livello midollare sono responsabili del richiamo dei progenitori midollari B verso zone del midollo particolarmente ricche di fattori di crescita e differenziazione per i linfociti B, quali ad esempio l'IL-7. Una volta avvenuto l'incontro con l'antigene a livello degli organi linfoidi secondari, i linfociti effettori migrano nuovamente nel torrente circolatorio per localizzarsi nelle sedi di infiammazione.

Contemporaneamente si vengono a formare le cellule della memoria immunologica, sia T che B, che possiedono diverse capacità migratorie verso i tessuti linfoidi terziari, quali cute, intestino ed altri, oltre a potersi localizzare in tessuti non linfoidi dove si trovano gli antigeni che li hanno attivati e che sono stati responsabili della loro espansione. L'attivazione linfocitaria è responsabile dell'aumentata espressione di numerosi recettori di superficie, compresi i recettori per le chemochine, con conseguente aumento della suscettibilità delle cellule all'azione chemiotattica di queste proteine.

Le chemochine guidano la migrazione cellulare mediante l'attivazione, finemente regolata, di diversi processi biochimici che si realizzano all'interno del leucocita in seguito al legame della chemochina al suo recettore specifico ed al rilascio di un secondo messaggero intracellulare.

Lo stato di attivazione del leucocita gioca un ruolo cruciale nella definizione dell'attività di segnale dei recettori chemochinici.

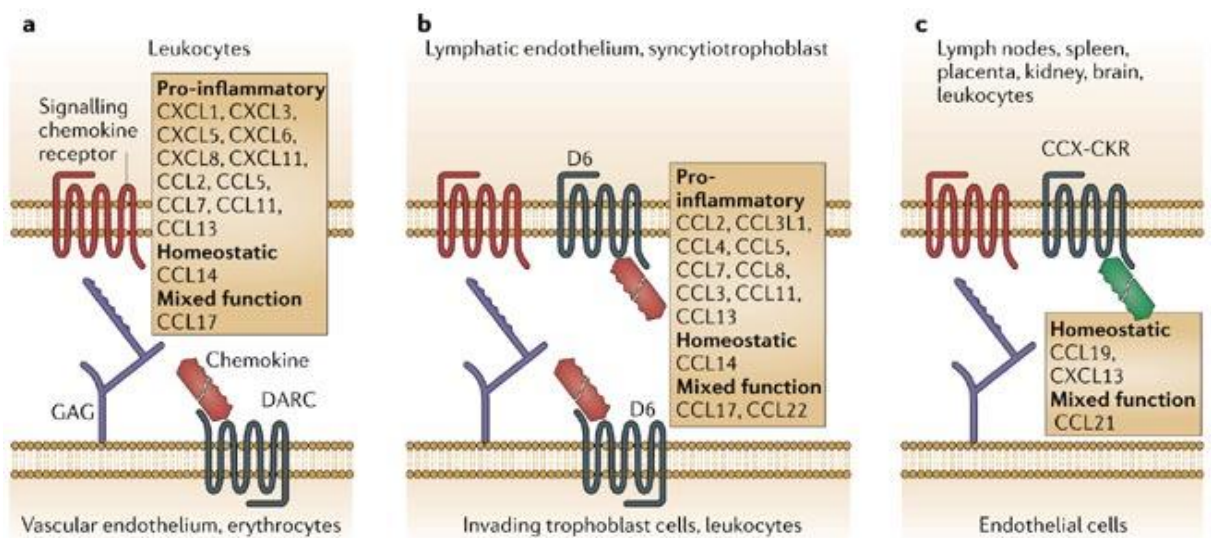
In alcune condizioni però i recettori chemochinici possono non attivare alcun meccanismo di segnale intracellulare (10).

Difatti, accanto ai 'canonici' recettori chemochinici, i quali sono di solito accoppiati a segnali intracellulari che dominano la migrazione cellulare, è stato descritto un separato gruppo di recettori 'atipici' il quale lega il loro ligando con alta affinità e specificità ma, diversamente dai recettori chemochinici 'canonici', sembrano essere strutturalmente non accoppiati alle proteine G, e non inducono alcun segnale intracellulare rilevabile dopo il legame chemochinico. Contrariamente, in alcuni casi il ligando è trasportato dall'altro lato del citoplasma e rilasciato dall'altra parte della cellula, **transcitosi**, mentre in altri casi è internalizzato e degradato.

Recenti studi *in vivo* indicano chiaramente che la funzione biologica di questa classe di recettori atipici è quella di competere con i recettori canonici per le

chemochine infiammatorie, di sequestrarle e portarle alla degradazione, agendo, quindi, da regolatori negativi dell' infiammazione.

Per questa ragione questi sono stati descritti in precedenza come recettori 'silenti', rinominati recettori chemochinici "esca" (11-13) ed includono, ad oggi, la molecola **DARC** (Duffy Antigen Receptor for Chemokines), un recettore promiscuo per le chemochine CXC e CC, **D6**, un recettore esca selettivo per le chemochine CC infiammatorie e **CCX-CKR**, il cui ruolo biologico di recettore esca per chemochine omeostatiche deve essere ancora chiarito nel dettaglio (Fig.4).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Immunology

Figura 4: Decoy receptors per chemochine DARC, D6 e CCX-CKR

## **D6: il recettore silente per CC-chemochine**

Il recettore D6 fu scoperto per la prima volta nel topo, da alcuni ricercatori di Glasgow, Nibbs, Wylie, Praguell e Graham (14) che, cercando recettori per la chemochina murina MIP-1 $\alpha$ , clonarono una nuova proteina in grado di legare ad altissima affinità tale molecola. Poco tempo dopo, sempre questo gruppo di ricercatori riuscì ad isolare e caratterizzare l'analogo nell'uomo, servendosi della sequenza dell' mD6 (D6 murino) per disegnare *primers* umani specifici. Questa proteina, che loro stessi chiamarono D6 umano (hD6), è un recettore promiscuo per CC-chemochine, che sembra essere in grado di legare la maggior parte dei membri di questa sottofamiglia di ligandi (14).

Il gene monoesonico, mappa nel cromosoma 3 a livello di un cluster genico di diversi recettori per chemochine (3p21.1) (15). L'RNA messaggero dell' hD6, costituito da un unico ORF (Open Reading Frame) di 1152 paia di basi, codifica per una proteina di 384 aminoacidi che presenta la classica sequenza dei GPCRs.

Possiede, inoltre, i quattro residui altamente conservati di cisteina, fondamentali per il mantenimento della struttura terziaria della proteina.

Nella sequenza dell' hD6 è presente, nella porzione amino-terminale, un singolo sito di N-glicosilazione ed in quella carbossi-terminale, invece, numerosi potenziali siti di fosforilazione (porzione ricca di residui di serina e treonina).

Il cDNA dell'hD6 presenta il 71% di identità e l'86% di similarità con il D6 murino. In comune con questa proteina possiede una variazione nel motivo altamente conservato **DRYLAIVHA**, presente in moltissimi recettori per chemochine, modificato in **DKYLEIVHA** nel D6 umano e murino. Questa particolare variazione non è mai stata osservata in alcun recettore a 7 eliche transmembrana (tm) accoppiato alle proteine G (14).

Il D6 umano presenta solamente il 40% di identità e il 50% di similarità con gli altri recettori per CC-chemochine noti null'uomo, e questa bassa omologia lo porta ad essere il membro più divergente della famiglia. La porzione aminoterminale dell'hD6, una regione ritenuta importante per il legame con il ligando, contiene un numero di tirosine e residui acidi simile alla maggior parte dei recettori per CC-chemochine.

Un'altra differenza potenzialmente importante tra il D6 e gli altri GPCRs è l'alterazione, nel secondo dominio tm, di un residuo di acido aspartico, altamente conservato, in asparagina.

Quando questo residuo viene mutato nel recettore CCR5 o in altri recettori a 7 eliche tm, questi non sono più in grado, se stimolati, di determinare l'ingresso di calcio all'interno della cellula, sebbene il legame con il ligando avvenga regolarmente (16, 17).



I primi studi di espressione, condotti investigando sulla presenza dell'mRNA del D6 in vari tessuti umani, indicarono la sua maggiore espressione sulla superficie di cellule linfo-endoteliali drenanti lo strato sincizio-trofoblastico della placenta, dove svolge il compito importante di rimuovere le chemochine infiammatorie, proteggendo così il feto da un'eventuale dannosa risposta immunitaria e/o infiammatoria (18).

Secondo questi studi il recettore D6 è espresso in misura minore, anche nel fegato, nel polmone, nella tiroide, nell'intestino e nella cute ma sorprendentemente, non è presente in cellule di derivazione ematopoietica del sangue periferico e del midollo osseo (14).

Gli studi preliminari di "*Ligand Binding Profile*" condotti utilizzando linee cellulari CHO che esprimono stabilmente D6, identificarono questa proteina come un recettore per CC-chemochine che mostrava alta affinità per i principali membri di questa sottofamiglia. Il ligando con maggiore affinità per il D6 risultò essere MIP-1 $\alpha$  murino, seguito da MIP-1 $\beta$  umano (hMIP-1 $\beta$ ) e hMCP (Monocyte Chemotactic Protein)-2. Il legame di hD6 fu osservato anche con altre chemochine CC infiammatorie umane come RANTES, MCP-1, MCP-3, MCP-4 e HCC (Hemofiltrate CC Chemokine)-1. La specificità del D6 per CC-chemochine fu confermata dall'osservazione dell'incapacità di questo recettore di legare varie CXC-chemochine come IL-8, GRO $\gamma$ , IP-10 e MIP-2 (19). La natura unica della

porzione amino-terminale del recettore D6 suggerisce che sia proprio questa la responsabile della promiscuità del recettore.

Una delle scoperte più interessanti che spinse diversi gruppi di ricercatori ad approfondire gli studi su questa proteina fu che il recettore D6 non è in grado di trasdurre segnali all'interno della cellula. La natura divergente della regione amino-terminale, l'alterazione nel motivo DRYLAIVHA, come recentemente dimostrato da Nibbs e Graham (12) reintroducendo il motivo DRYLAIVHA nella molecola se ne ripristina la funzione segnalatoria, e l'assenza del residuo di aspartico nel secondo dominio tm, assieme ad altre peculiarità presenti nella sequenza del recettore D6, potrebbero concorrere alla spiegazione di tale fenomeno.

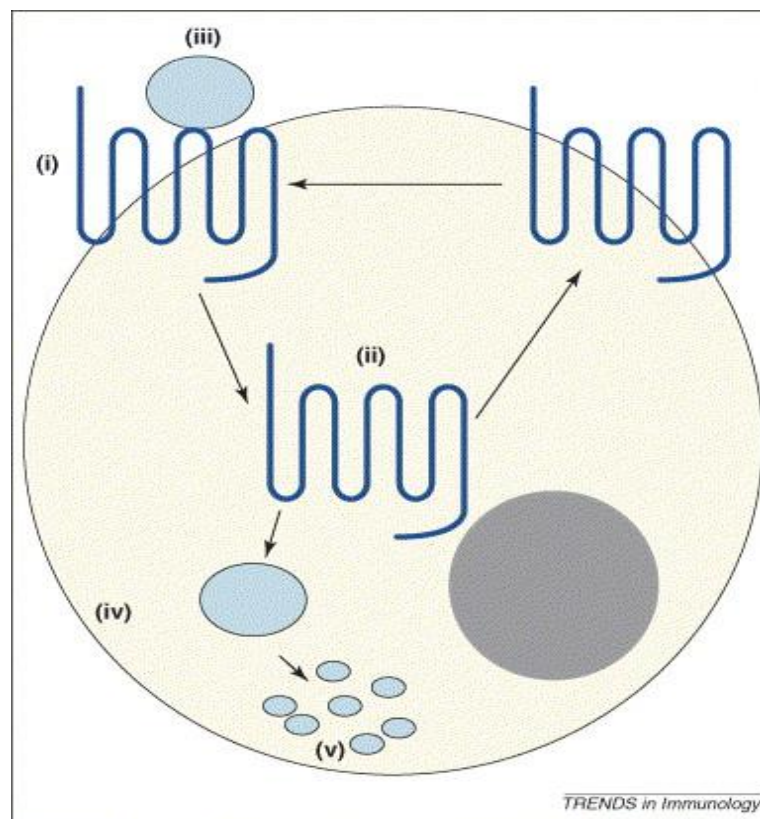
L'assenza di capacità segnalatorie portò il recettore D6 a far parte, assieme al recettore DARC, di un gruppo separato di recettori per chemochine: i cosiddetti "recettori silenti" (20).

Queste molecole hanno sempre 7 domini tm ma, a differenza dei classici recettori per chemochine, sembrano non essere accoppiati alle proteine G e quindi sono privi di ogni funzione segnalatoria (14, 21).

Proprio in virtù delle sue caratteristiche del tutto particolari, ad oggi il recettore D6 è oggetto di intensi studi soprattutto nel campo dell'infiammazione, dal momento che esso lega molte CC-chemochine infiammatorie (CCLs 2, 3L1, 4,

5, 7, 8, 11, 14, 22 e debolmente CCL17), senza innescare alcuna risposta all'interno della cellula bersaglio (14) ma internalizzandole e avviandole verso la degradazione (22).

Al contrario del suo ligando, però, il recettore D6 ritorna ad essere espresso sulla superficie cellulare (Fig.5).



**Figura 5: Internalizzazione costitutiva e riesposizione in superficie del recettore D6 (i).** D6 è un recettore con 7 domini transmembrana localizzato transientemente sulla superficie cellulare (ii), soggetto ad internalizzazione ligando-indipendente e riesposizione sulla superficie. Quando D6 incontra il suo ligando, sottoforma di chemochine CC infiammatorie (iii), lo lega con alta affinità e lo internalizza (iv), etichettandolo per la degradazione cellulare (v), presumibilmente all'interno dei lisosomi.

I meccanismi molecolari alla base del “recycling” del recettore D6 sono ancora poco chiari, anche se si ritiene che D6 sia soggetto a fosforilazione costitutiva ligando-indipendente (23) che ne media l'esocitosi e che la  $\beta$ -arrestina non sia necessaria per l'internalizzazione di D6. Altri lavori, invece, riportano che D6 non sia fosforilato e che la sua internalizzazione sia  $\beta$ -arrestina-dipendente (20).

Contrariamente ai dati riportati in letteratura che suggeriscono per il recettore D6 un ruolo di mediatore negativo dell'infiammazione grazie alla sua capacità di internalizzare nelle cellule su cui è espresso, le CC-chemochine pro-infiammatorie, studi condotti su un modello murino di sclerosi multipla, l'Encefalomielite Autoimmune Sperimentale (EAE), hanno suggerito come le funzioni di D6 possano essere variabili e dipendenti dalle condizioni infiammatorie stesse. In questo modello murino di sclerosi multipla, topi D6-deficienti mostrano una risposta immunitaria significativamente più bassa con una ridotta infiltrazione leucocitaria nel midollo spinale e, conseguentemente, una minore demielinizzazione, se paragonati a topi con EAE ma normali livelli di D6 (24).

A conferma del ruolo anti-infiammatorio di D6, invece, la sua over-espressione nel cancro alla mammella sembra inibire la proliferazione *in vitro*, la tumorigenesi e la metastatizzazione ai polmoni ed ai linfonodi *in vivo* (25) ed indurre una riduzione delle chemochine circolanti, come CCL2 e CCL5, della

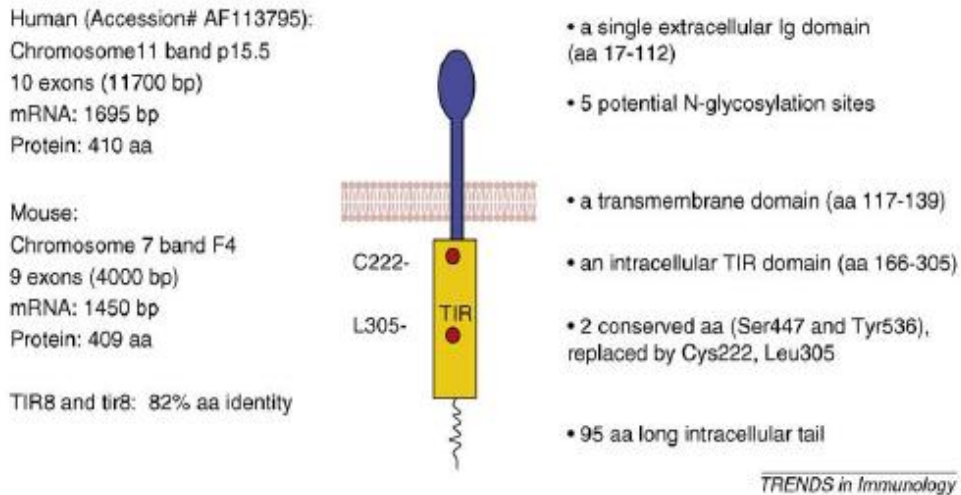
densità del sangue all'interno dei vasi e dell'infiltrazione dei macrofagi associati al tumore (TAMs). L'espressione di D6 sembra, quindi, essere correlata positivamente alla sopravvivenza delle donne con cancro alla mammella, che vivono più a lungo libere dalla malattia.

### **Tir8: il recettore "atipico" per citochine**

Oltre ai "decoy receptors" per chemochine, esistono parecchi recettori per citochine in grado di generare dei meccanismi molecolari che attuano uno stretto controllo sulle risposte immunitarie, come Toll/IL-1R 8 (Tir8), anche conosciuto come SIGIRR (single Ig IL-1-related receptor), clonato per la prima volta dal Prof. Mantovani e dal suo gruppo di ricerca (26).

Tir8 è un membro della superfamiglia dei Toll-like receptors (TLRs) ed è un decoy receptor intracellulare per i componenti del "TLR-signaling pathway". Ha un piccolo e singolo dominio extracellulare Ig, un dominio TIR intracellulare ed una coda citosolica formata da 95 amminoacidi (27) (Fig.6).

Tir8 agisce inibendo l'attivazione di NFkB indotta dai membri della famiglia dei recettori TLR/IL-1R, grazie al suo dominio TIR intracellulare altamente conservato e privo di due aminoacidi essenziali, la Serina 447 e la Tirosina 536 sostituiti dalla Cisteina 222 e dalla Leucina 305, ed intrappolando TRAF6 (TNFR-associated Factor 6) e IRAK1 (IL-1R-associated kinase 1) (27).



**Figura 6: Struttura del recettore TIR8.** Il gene TIR8 umano codifica un prodotto proteico di 410 amminoacidi costituito da un singolo dominio Ig extracellulare (amminoacidi 17-112), un dominio transmembrana (amminoacidi 117-139), un dominio TIR intracellulare altamente conservato (amminoacidi 166-305), e una coda intracellulare lunga 95 amminoacidi.

Così, Tir8 agisce sequestrando i complessi che si formano nel “TLR-signaling pathway”, regolando l’azione delle citochine e delle chemochine infiammatorie attraverso l’inibizione del “signaling pathway” di IL-1R e TLR4 (28). Per questa ragione, Tir8 è considerato un membro della superfamiglia dei recettori TLR/IL-1R con uniche proprietà anti-infiammatorie.

La molecola Tir8 è espressa sulla superficie cellulare delle cellule epiteliali e delle cellule dendritiche (DCs).

Come recentemente riportato in letteratura, topi Tir8-deficienti mostrano un’aumentata suscettibilità alla tossicità sistemica indotta dal lipopolisaccaride

batterico (LPS) e all'infiammazione intestinale indotta dal destrano solfato sodico (DSS).

Queste evidenze sperimentali confermano un ruolo cruciale per Tir8 nel limitare l'infiammazione, soprattutto nel tratto gastro-intestinale (29). Tir8 sembra, inoltre, regolare negativamente la risposta infiammatoria anche durante le infezioni (29,30), anche se il suo ruolo nelle condizioni infiammatorie associate alle infezioni fungine è ancora poco chiaro.

Sebbene l'infiammazione sia ritenuta cruciale nella risposta immune adattativa che si instaura nei confronti dei funghi, la sua deregolazione potrebbe essere più pericolosa per l'ospite che utile a combattere l'infezione stessa (31).

Alcuni dati riportati in letteratura dimostrano come Tir8 sia richiesto per la resistenza dell'ospite all'infezione fungina poiché downregola l'attivazione della risposta dei Th17, dipendente dal segnale indotto da IL-1, come recentemente dimostrato dall'infezione con *Candida albicans* (32).

E' noto, inoltre, il ruolo di Tir8 nel sopprimere l'immunità antimicrobica (31,32), anche se alcuni dati recenti ne identificano una nuova funzione nel controllo dell'autoimmunità (33).

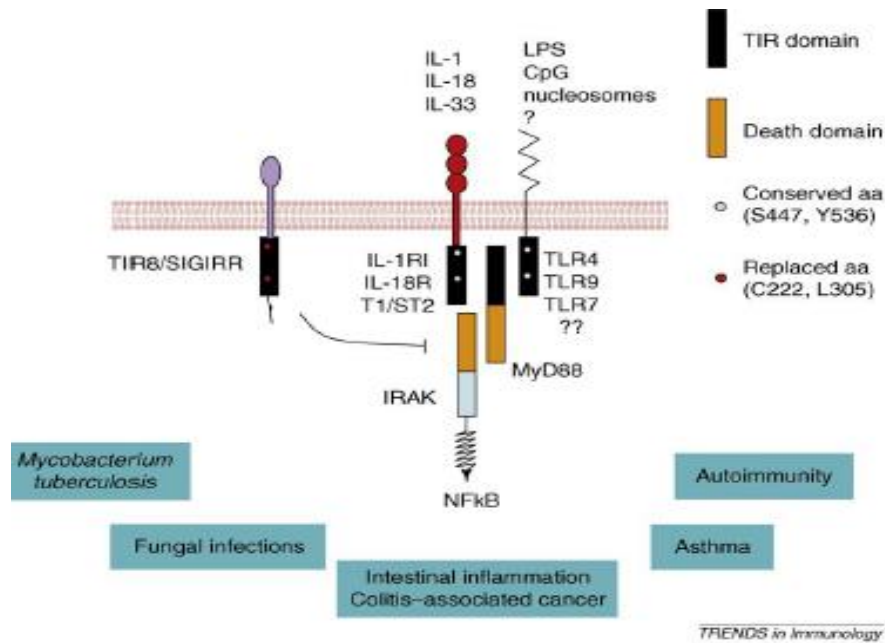
Tir8 potrebbe contribuire al controllo dell'autoimmunità sopprimendo il segnale innescato dai TLR nelle DCs e nelle cellule B autoreattive (34), quest'ultime attivate *in vitro* attraverso il TLR7 e il TLR9 dagli immunocomplessi

caratteristici del lupus e contenenti gli autoantigeni U1snRNP o i nucleosomi, rispettivamente (35, 36).

Studi effettuati *in vivo* con gli antagonisti di TLR7 (37) e con topi Tlr-deficienti (38) o overesprimenti TLR7 hanno, difatti, confermato un ruolo predisponente all'autoimmunità per TLR7 (39) mentre i risultati ottenuti da studi condotti con gli antagonisti di TLR9 e con topi Tlr9-deficienti sono ancora da chiarire (40).

In conclusione, data la loro capacità di legare chemochine e citochine pro-infiammatorie senza innescare alcun segnale, il ruolo proposto per i “decoy receptors” è quello di limitare gli effetti negativi e dannosi dell' infiammazione causati dalle risposte evocate dagli antigeni self nelle risposte autoimmuni, dalle cellule tumorali o dai microrganismi, come nel caso dell' Mtb, agente eziologico della tubercolosi (Fig.7).





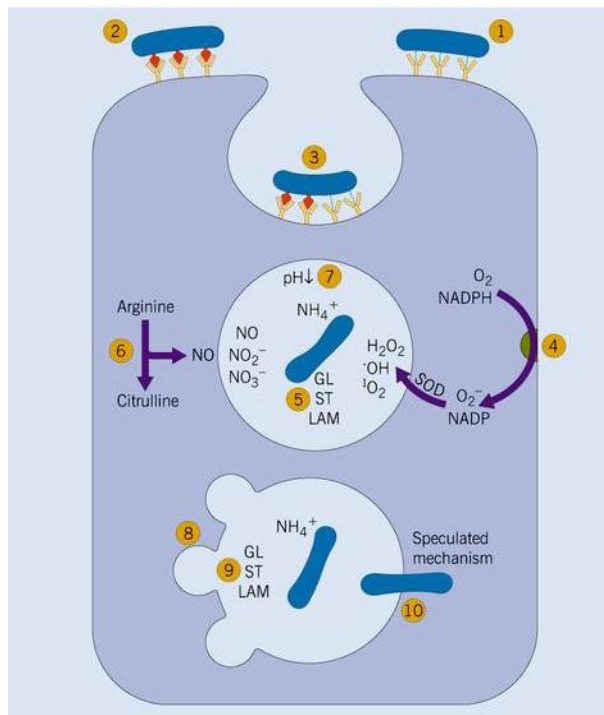
**Figura 7. Funzioni regolatorie di TIR8/SIGIRR in differenti patologie.** Studi condotti su topi geneticamente modificati hanno dimostrato che TIR8 agisce *in vivo* da regolatore negativo in numerose condizioni infiammatorie dipendenti dall'attivazione di ILR e TLR, tra cui l'infiammazione intestinale e il carcinoma associato alla colite, infezioni micobatteriche e fungine, malattie autoimmuni e reazioni allergiche.

## Formazione del granuloma nella tubercolosi

La formazione del granuloma nel sito dell'infezione micobatterica è una componente essenziale dell'immunità dell'ospite nel controllo dell'infezione.

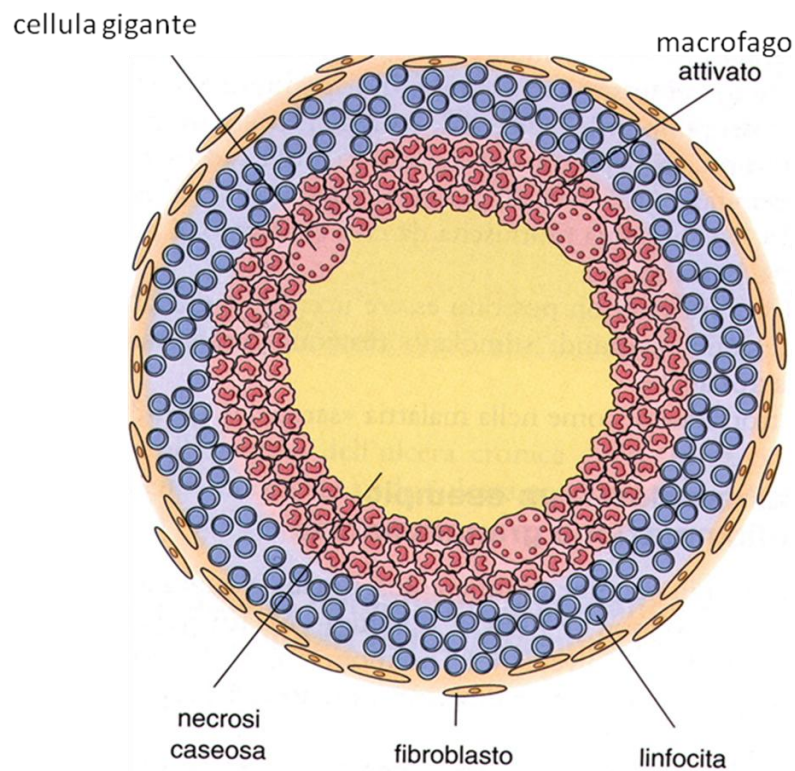
Detto anche "granuloma settico", è tipicamente indotto dalla persistenza dell'organismo infettante, o di sue parti non digerite, e da una risposta immunitaria mediata dai linfociti T, come nel caso di infezione da Mtb.

L'Mtb, grazie alla sua spessa parete cellulare, è in grado di sfuggire ai meccanismi di killing intracellulare dei macrofagi, mediato dagli intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) e dell'azoto (RNI), di inibire l'accumulo della NO sintetasi inducibile (iNOs) nel fagosoma, di interferire con l'acidificazione del fagosoma attraverso la produzione di ioni ammonio e l'esclusione della pompa protonica vescicolare, di inibire la maturazione del fagosoma e la sua fusione con il lisosoma e, infine, di provocare la lisi dei fagociti stessi (Fig. 8).



**Figura 8: Meccanismi di evasione dell' MTb.** La particolare composizione chimica della parete rende il batterio resistente al killing intracellulare.

L'attivazione macrofagica e le sostanze citosoliche che vengono liberate nell'alveolo polmonare dopo la lisi della cellula, forniscono un fortissimo richiamo chemiotattico per i linfociti T, che giungono *in loco* causando lo sviluppo del granuloma (Fig. 9).



**Figura 9: Struttura di un granuloma.** Focolaio di infiammazione cronica costituito da un aggregato microscopico di macrofagi, morfologicamente trasformati in cellule epitelioide, circondato da leucociti mononucleati, soprattutto linfociti e occasionalmente plasmacellule. Una parete di fibroblasti e tessuto connettivo circonda i granulomi più vecchi.

Le caratteristiche morfologiche del granuloma sono:

- una parte centrale in necrosi caseosa, costituita da quel che rimane dei macrofagi lisati e da micobatteri;
- un anello più esterno di cellule epitelioidi e cellule giganti di Langhans;
- un ultimo anello di linfociti e plasmacellule. Più esternamente si può talvolta riscontrare la presenza di una capsula connettivale secreta dai fibroblasti attivati dall'infiammazione.

L'aspetto morfologico non segue sempre questi canoni e, pertanto, può essere necessaria l'identificazione dell'agente eziologico mediante esami di laboratorio ai fini di una corretta diagnosi (Fig. 9).

Il granuloma può rimanere silente per molti anni, ma può riattivarsi immediatamente in conseguenza di fenomeni di immunodepressione anche lievi, estendendosi sempre più nel parenchima polmonare e causando la comparsa di grosse caverne.

L'evoluzione più frequente è verso la necrosi, mentre la guarigione comporta sclerosi con formazione di cicatrici deturpanti. La formazione del granuloma dipende dall'attivazione dei linfociti T CD4 e T CD8, secernenti IFN- $\gamma$  e reattivi verso l'Mtb (41, 42).

Esso comunque, è un processo complesso che richiede non soltanto l'attivazione dei linfociti ed il loro reclutamento nel sito dell'infezione ma anche

quello dei monociti, la loro migrazione nei tessuti e la giustapposizione attorno ai macrofagi infettati dal micobatterio (41). Questa co-localizzazione rende più facile l'attivazione dei meccanismi battericidi nei macrofagi infettati da parte delle citochine prodotte dalle cellule T (41).

Alcuni micobatteri, infatti, sopravvivono all'interno dei macrofagi e la persistente stimolazione antigenica perpetua il processo, portando alla formazione di un granuloma cronico, caratterizzato dall'accumulo di macrofagi infettati, di cellule epitelioidi e di linfociti T (41).

I granulomi, quindi, se da una parte servono a contenere l'infezione micobatterica e a prevenire la sua disseminazione negli altri organi, sono al tempo stesso responsabili dei fenomeni immunopatologici che avvengono nei polmoni poiché distruggono il tessuto parenchimale, prendendone il posto (43).

La funzione principale del granuloma è quella di localizzare e contenere non soltanto i batteri ma anche la risposta infiammatoria al batterio stesso.

Difatti, se l'attività delle cellule immunocompetenti nei polmoni non è strettamente regolata, ciò può portare ad un'eccessiva infiammazione.

Così, il controllo rigoroso effettuato all'interno del granuloma è necessario a prevenire lo sviluppo della malattia.

Nella maggior parte dei casi, dopo il riparo di un tessuto infiammato o danneggiato, l'infiammazione scompare ed il tessuto ritorna al suo stato normale

(44). Se, invece, la risoluzione della fase infiammatoria è inefficace, si instaura la patologia infiammatoria cronica (44).

Il fallimento della risoluzione della fase infiammatoria è una caratteristica tipica ed invariabile di patologie che sono accomunate da alti livelli di espressione di citochine e chemochine infiammatorie (45).

Il TNF- $\alpha$  e la citochina correlata linfotossina (46) sono potenti citochine pro-infiammatorie con un'ampia gamma di attività sia nelle risposte immuni che infiammatorie e giocano un ruolo essenziale nella resistenza dell'ospite contro l'Mtb ed altri micobatteri (47). Topi TNF- $\alpha$ -deficienti, infettati via aerosol con Mtb, sviluppano normali risposte cellulo-mediate agli antigeni micobatterici ma, poiché non riescono a risolvere l'infiammazione negli organi infettati, essi sono profondamente suscettibili all'infezione, morendo con estesa necrosi del tessuto polmonare e degli altri organi infettati (47).

Oltre al TNF- $\alpha$ , il ruolo degli altri mediatori solubili nel regolare la formazione e la persistenza del granuloma è ancora poco chiaro.

In conclusione, citochine, chemochine e loro recettori sono sicuramente coinvolti nella migrazione delle cellule ne sito di infezione e sono ottimi candidati per un ruolo nella formazione del granuloma, sebbene la loro espressione sembra essere limitata durante l'infezione da micobatterio (48).

## Chemochine e tubercolosi

Una migliore comprensione dei meccanismi immunologici alla base della patogenesi e della protezione è essenziale per la creazione di nuovi vaccini ed immunoterapie contro l'Mtb. E' risaputo che la risposta protettiva nei confronti dell'Mtb richiede linfociti T CD4 e CD8, citochine di tipo Th1, come IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e macrofagi attivati (49).

La cooperazione tra cellule e citochine richiede una stretta interazione che viene raggiunta dopo la migrazione delle cellule e la formazione del granuloma nei polmoni. La formazione del granuloma è caratteristica dell'infezione nei polmoni, serve a contenere i micobatteri e a creare un microambiente per l'interazione delle cellule immunocompetenti, limitando la crescita e la disseminazione dell'Mtb.

Le chemochine sono potenti attivatori dei leucociti e chemoattraenti, aiutano la formazione del granuloma e sono fondamentali nella risposta immunitaria all'Mtb (48). Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato come l'infezione con Mtb di macrofagi murini derivati dal midollo osseo determini l'espressione di TNF- $\alpha$ , così come di parecchie chemochine, inclusi i ligandi per i recettori delle chemochine CXCR3, CCR5 e CCR2.

L'utilizzo di anticorpi neutralizzanti il TNF- $\alpha$  o di macrofagi TNFR1-deficienti ha dimostrato che l'espressione di alcune chemochine, quali CXCL9, CXCL10,

CXCL11, CCL5/RANTES e CCL2/MCP-1, dopo l'infezione con Mtb, dipende, almeno in parte, dall'espressione di TNF- $\alpha$ .

Comunque, la mancata produzione del TNF- $\alpha$  non porta alla completa assenza dell'espressione delle chemochine, confermando che altri fattori, indotti dall'infezione, stimolano la produzione delle chemochine (50).

In alcuni modelli murini, l'espressione genica delle chemochine CXC e CC è stata trovata nei polmoni dopo l'infezione con Mtb (50). Topi CXCR3-deficienti (51) non riescono a formare i granulomi nei polmoni dopo l'infezione con Mtb, sebbene questo effetto sia transiente ed avvenga negli stadi più precoci dell'infezione.

Topi CCR2-deficienti sono straordinariamente suscettibili a moderate o alte dosi di Mtb somministrate per endovena (52), ma non a basse dosi somministrate per aerosol, e la suscettibilità di questi topi sembra essere dose-dipendente (53). Al contrario, CCR5 (54) potrebbe essere non essenziale per lo sviluppo di una risposta protettiva all'Mtb.

Topi CCL2/MCP-1-deficienti non sembrano essere maggiormente suscettibili all'Mtb, anche se, ad oggi, non è stata riscontrata alcuna infiltrazione delle cellule immuni a livello tissutale e la conseguente necrosi. Al contrario, topi transgenici overesprimenti CCL2/MCP-1 sono maggiormente suscettibili alla



tubercolosi (55). I ligandi di CCR5, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1b e CCL5/RANTES, possono attrarre ed attivare i macrofagi e i linfociti Th1.

Comunque, studi condotti su topi CCR5-deficienti hanno messo in luce che CCR5, sebbene giochi un ruolo nella migrazione delle DCs ai e dai linfonodi (54), non è indispensabile per la formazione del granuloma e per la risposta immune protettiva nei confronti dell'Mtb.

CCL5/RANTES è stato associato, invece, alla generazione di granulomi secernenti citochine di tipo 1 (56).

Questi risultati confermano ulteriormente che gli effetti biologici delle chemochine sono estremamente ridondanti e pleiotropici.

Difatti, le chemochine CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  e CCL5/RANTES sono ligandi di CCR5, ma CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL5/RANTES possono interagire ed attivare anche CCR1 e CCR3.

In conclusione, queste evidenze sperimentali fanno comprendere come sia molto difficile individuare il ruolo preciso di ciascuna chemochina e dei loro recettori, suggerendo che vi sono dei fattori aggiuntivi che devono essere indotti o potenziati per aumentare la capacità dell'ospite di eliminare il micobatterio.

## **Ruolo dei recettori D6 e Tir8 nell'infiammazione sistemica indotta dall'infezione con *M. tuberculosis***

Parecchi studi sulla funzione non segnalatoria di D6 sono stati rivolti soprattutto alla molecola umana (14), sebbene il recettore D6 murino abbia le stesse caratteristiche strutturali e funzionali del suo ortologo umano, agendo da recettore silente ed efficiente spazzino delle chemochine infiammatorie CC (57).

Il ruolo di questo recettore nella risoluzione dei processi infiammatori nel modello murino è stato approfondito iniettando in topi D6<sup>-/-</sup> per via sottocutanea l'adiuvante completo di Freund (CFA) (57), un'emulsione di acqua in olio con micobatteri inattivati dal calore, solitamente Mtb, o valutando la risposta degli stessi a ripetute applicazioni di TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate), un potente cancerogeno in modelli murini di tumori cutanei (58).

Il primo modello di infiammazione locale è stato valutato tramite analisi istologiche effettuate nel sito dell'iniezione precocemente, a 3 giorni dall'iniezione con CFA, e tardivamente, a 21 giorni dall'iniezione con CFA.

A 3 giorni dall'iniezione, i topi D6<sup>-/-</sup> sono più suscettibili alla necrosi, all'angiogenesi e all'infiltrazione leucocitaria se paragonati a topi C57BL/6 wild-type (WT), mentre a 21 giorni non ci sono differenze significative fra i due gruppi di topi, entrambi caratterizzati da strutture simil-granulomatose, eccetto che per una più intensa necrosi tissutale riscontrata nei topi D6<sup>-/-</sup>.

Anche l'agente irritante TPA è stato usato per valutare l'aumentata suscettibilità dei topi D6<sup>-/-</sup> rispetto a topi WT B6/129 e FVB/N nello sviluppare tumori cutanei (58).

Ripetute applicazioni di TPA causano, infatti, un'aumentata infiammazione della pelle, meglio controllata dai topi WT B6/129 rispetto ai topi D6<sup>-/-</sup>, dimostrando che il recettore D6 limita la biodisponibilità delle citochine nella pelle, essendo cruciale per la risoluzione delle risposte infiammatorie che, in alcuni casi, potrebbero essere tumorigeniche o implicate nella progressione tumorale.

In aggiunta, studi sulle risposte infiammatorie effettuati su topi Tir8-deficienti (26) hanno riportato un'aumentata suscettibilità alla tossicità sistemica indotta dall'LPS, all'infiammazione intestinale indotta dal DSS e al cancro associato alla colite (27).

Dunque, nonostante vi siano in letteratura parecchi dati riguardanti i meccanismi di de-regolazione dei fenomeni infiammatori e l'eventuale correlazione con l'insorgenza di patologie tumorali ed autoimmuni, dal momento che ancora non si sa molto riguardo una possibile influenza negativa dei "decoy receptors" D6 e Tir8 sullo svolgimento delle risposte immunitarie infiammatorie indotte dall'infezione con microrganismi vivi, ci è sembrato interessante seguire il decorso dell'infezione da *M. tuberculosis* in topi D6<sup>-/-</sup> e Tir8-

/-, gentilmente fornitici dal Prof. Mantovani e dal suo gruppo di ricerca, per valutare gli effetti della mancanza di tali molecole sull'andamento di tale patologia cronica-infiammatoria.

I risultati da noi ottenuti, e di seguito riportati, ci hanno permesso di confermare, anche nel nostro modello murino, i dati già presenti in letteratura riguardanti un ruolo inibitorio per tali molecole, cruciali nel tenere a freno l'evolversi di risposte immunitarie ed infiammatorie in patologiche e pericolose più per l'ospite che per il microrganismo infettante.

# Materiali e Metodi

## Generazione di topi D6<sup>-/-</sup>

Popolazioni omogenee di topi D6<sup>-/-</sup> sono state generate (59) incrociando topi eterozigoti per la mutazione a topi WT C57BL/6J per più di otto generazioni. I topi risultanti sono stati allevati per ottenere topi D6<sup>-/-</sup> omozigoti.

Topi WT e D6<sup>-/-</sup> C57BL/6J sono stati allevati in condizioni di assoluta sterilità ed acquistati dalla “Charles River Laboratories”.

Maschi e femmine di 8-14 settimane d'età sono stati usati seguendo le linee guida istituzionali in accordo con le leggi nazionali (D.L. N.116, Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, supplemento 40, 18-2-1992) ed internazionali (European Economic Community Council, 1987, Directive 86/609, Official Journal of European Communities L 358,1; and Institute of Laboratory Animal Resources, Committee on Life Sciences, National Research Council, 1996, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

Per ciascun gruppo sperimentale sono stati utilizzati 10 topi. Tutti i topi infettati sono stati da noi mantenuti in condizioni di sterilità e periodicamente monitorati per l'eventuale presenza di patogeni.

## **Generazione di topi Tir8<sup>-/-</sup>**

Popolazioni omogenee di topi Tir8<sup>-/-</sup> sono state generate incrociando topi eterozigoti per la mutazione a topi con un background genetico misto 129/Sv e C57BL/6 (Tir8<sup>+/+</sup>) per più di otto generazioni (60). I topi risultanti sono stati allevati per ottenere topi Tir8<sup>-/-</sup> omozigoti.

I topi incrociati sono stati analizzati fenotipicamente e periodicamente genotipizzati attraverso esperimenti di PCR con 2 set di primers per valutare la presenza dell'allele wild-type e di quello mutato.

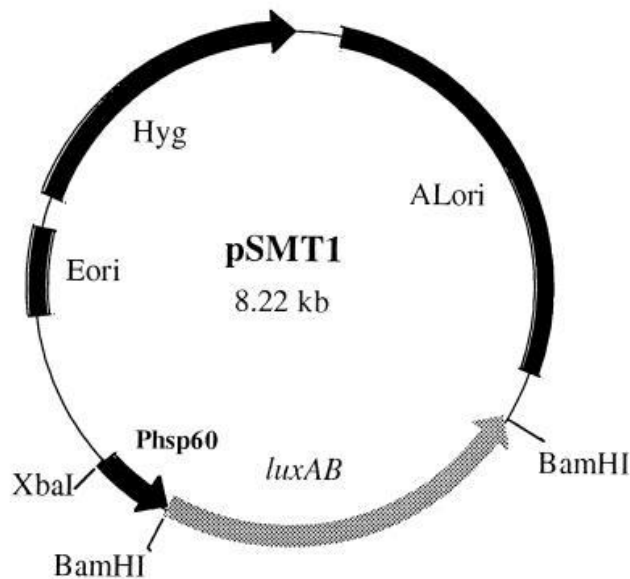
Per ciascun gruppo sperimentale sono stati utilizzati da 5 a 8 topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> di 8-14 settimane d'età. Come per i D6<sup>-/-</sup>, i topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> sono stati allevati in condizioni di assoluta sterilità ed acquistati dalla "Charles River Laboratories". Tutti i topi infettati sono stati da noi mantenuti in condizioni di sterilità, periodicamente monitorati per l'eventuale presenza di patogeni ed usati seguendo le linee guida istituzionali in accordo con le leggi nazionali ed internazionali.

## **Infezione con *M. tuberculosis* bioluminescente e determinazione delle CFU nei vari organi**

I topi WT C57BL/6J, D6<sup>-/-</sup>, Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> sono stati infettati per via intranasale con *M. tuberculosis* H37Rv bioluminescente ( $2 \times 10^3$  CFU in 20  $\mu$ l). Questo inoculo determina il rilascio riproducibile di circa 50-100 CFU vitali, come confermato dalla determinazione delle CFU nei polmoni dei topi dopo 1 giorno di infezione.

La quantità di CFU presente nei vari organi dei topi infettati al 1° giorno e a 2, 4, 8 e 12 settimane è stata quantizzata in termini di produzione di luce con un luminometro grazie all'utilizzo di un ceppo di *M. Tuberculosis* (H37Rv) bioluminescente, gentilmente fornitoci dalla Dr.ssa Kris Huygen (Mycobacterial Immunology, Pasteur Institute Brussels, Scientific Institute for Public Health, Brussels, Belgium). Nello specifico, è stato da noi utilizzato un ceppo di micobatteri trasfettati con i geni della luciferasi batterica (LuxA e LuxB), mediante l'utilizzo del plasmide pSMT1 come vettore di inserzione (61) (Fig. 10).

I bacilli sono stati fatti crescere per 2-6 settimane a 37°C su piastre agar 7H10 (Difco Laboratories). Al momento opportuno, alla coltura sono stati addizionati 50  $\mu$ g di Igromicina B (Sigma-Aldrich), utilizzata per selezionare i micobatteri trasfettati che al contempo esprimono il gene per la resistenza all'antibiotico.



**Figura 10: Il costrutto pSMT1.** La produzione di luce è correlata alle CFU. Il plasmide reporter pSMT1 è un vettore contenente sia l'origine di replicazione per micobatteri (ALori) che un'origine di replicazione per *E. coli* (Eori). L'Igromicina è impiegata (Hyg) per selezionare i micobatteri trasfettati, che risultano al contempo resistenti all'antibiotico. I geni di *V. harveyi luxAB* sono sotto il controllo del promotore del BCG *hsp60* (Phsp60). *XbaI* and *BamHI* sono i siti enzimatici di clivaggio.

Il numero di CFU presenti nella soluzione madre di micobatterio è stato quantizzato tramite conta su piastra agar Middlebrook 7H10. Una volta raccolti, i bacilli sono stati risospesi in terreno liquido Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories) contenente il 10% di glicerolo (Sigma-Aldrich), aliquotati e conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

La carica batterica negli omogenati dei vari organi è stata quantizzata dopo aver dispensato in ciascuno di essi 20 µl di decanal, nome commerciale del substrato della luciferasi batterica, un'aldeide a lunga catena, 8-14 atomi di



carbonio, in grado di sviluppare una reazione luminescente rilevabile al luminometro.

Brevemente, a vari tempi di infezione, da 0, a 2, 4, 8 e 12 settimane dall'inoculo intranasale di *M. tuberculosis*, polmoni, milza e fegato sono stati prelevati e digeriti meccanicamente attraverso pestellamento su un filtro di nylon, o cell-strainer, con pori da 45  $\mu\text{m}$  (BD Biosciences).

Le sospensioni cellulari così ottenute sono state centrifugate e risospese in PBS o RPMI privo di rosso fenolo (Euroclone), per evitare delle interferenze aspecifiche date dal colorante nella lettura del segnale luminoso.

Quindi, i campioni così ottenuti sono stati sottoposti alla lisi dei globuli rossi mediante aggiunta di 15  $\mu\text{l/ml}$  di Zap-oglobin II lytic Reagent (Beckman Coulter) e, dopo agitazione su vortex, sono stati centrifugati per 5 minuti a 4000 rpm. Rimosso il sovrantante, il pellet è stato risospeso in 1 ml di RPMI e nuovamente agitato al vortex.

Nel frattempo, si è proceduto alla preparazione del substrato, costituito da una soluzione di etanolo assoluto (Carlo Erba Reagents) all'1% di decanal (Sigma-Aldrich).

In apposite piastre per luminometria black and white a 96 pozzetti a fondo piatto (Perkin Elmer), sono stati dispensati in un volume finale di 200  $\mu\text{l}$ /pozzetto gli omogenati, preparati come precedentemente descritto, ed una

curva standard di riferimento, costituita da concentrazioni note di micobatterio luminescente.

Infine, subito dopo aver dispensato con l'iniettore automatico 20  $\mu$ l/pozzetto di decanal precedentemente diluita in etanolo, si è proceduto alla rilevazione del segnale luminoso emesso dai campioni in esame grazie ad un apposito luminometro per piastre (Veritas Microplare Luminometer, Promega)

### **Analisi citofluorimetrica dell'infiltrato cellulare negli organi dei topi infettati con *M. tuberculosis***

Per la fenotipizzazione dell'infiltrato cellulare, polmoni, fegato e linfonodi mediastinici di topi WT e D6<sup>-/-</sup> e polmoni di topi Tir 8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> sono stati rimossi a differenti settimane dall'infezione e digeriti meccanicamente attraverso pestellamento su cell-strainer, come precedentemente descritto.

Le cellule mononucleate sono state poi ottenute centrifugando i digesti per 20 minuti a 2000 rpm in un gradiente di densità creato con il Lympholyte M (Cederlane Laboratories).

La vitalità delle cellule, valutata attraverso conta cellulare con il colorante vitale Trypan blue, è risultata maggiore del 90%. In alcuni esperimenti gli infiltrati polmonari sono stati arricchiti di cellule CD4 o CD8 attraverso l'utilizzo

di biglie immunomagnetiche rivestite di anti-CD4 o anti-CD8 (Miltenyi Biotec) (62).

Le cellule ottenute dopo la separazione sono state quindi incubate per 24 h a 37°C in terreno con siero fetale bovino, per permettere alle cellule e alle biglie di dissociarsi.

Le cellule risospese in FACS buffer (0.1% Na azide, 0.1% BSA, and 20% siero murino) sono state contate e marcate in triplicato con anticorpi coniugati con differenti fluorocromi, quali: anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD44, -CD62L, -CD25, -CD11c e -F4/80 per gli esperimenti con i topi D6<sup>-/-</sup> con anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44, anti-CD62L, anti-CD25, anti-pan  $\gamma\delta$ , anti-Gr1, anti-CD11c, anti-F4/80, and anti-NK1.1 per gli esperimenti con i topi Tir8<sup>-/-</sup>. Come controlli isotipici sono state usate immunoglobuline purificate o coniugate con PE, FITC, CyChrome o alloficocianina.

Dopo i lavaggi, le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% in PBS per 1 h e poi acquisite al FACSCalibur (BD Biosciences).

L'analisi è stata eseguita utilizzando l'apposito programma CellQuest (BD Biosciences).

## **Preparazione di cellule dendritiche**

Cellule dendritiche (DCs) murine sono state generate da un pool di cellule CD34<sup>+</sup> prelevate dal midollo osseo femorale di topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> e messe in coltura con GM-CSF (40 ng/ml) e con l' Flt3 ligando (100 ng/ml). Al 7° giorno, le DCs sono state piastrate alla concentrazione di 1 x10<sup>6</sup>/ml in 0.5 ml di RPMI 1640 più FCS all' 1% e all' 8° giorno, le cellule sono state stimulate con LPS (1-100 ng/ml), con BCG (1:1 and 5:1, multiplicity of infection (MOI)) e con *M. tuberculosis* (1:1 and 5:1 MOI).

24 e 48 h più tardi, i sovranatanti sono stati raccolti e il contenuto citochinico è stato valutato attraverso saggi ELISA disponibili in commercio (R&D System).

## **ELISPOT per la determinazione delle cellule T secernenti IFN- $\gamma$**

Il saggio ELISPOT (63) è stato usato per valutare il numero di cellule T CD4 e CD8 secernenti IFN- $\gamma$  in topi D6<sup>-/-</sup> infettati, dopo stimolazione *in vitro* con DCs, generate come precedentemente descritto (64), da topi WT infettati con BCG. In breve, piastre ELISPOT (BD Biosciences) sono state rivestite con l' anticorpo di cattura anti-IFN- $\gamma$  per tutta la notte a 4° C.

Il giorno dopo, l' anticorpo di cattura è stato rimosso e le piastre sono state lavate e saturate con terreno contenente siero fetale bovino per 2 h a temperatura ambiente.

Cellule T CD4 o CD8 purificate ( $15 \times 10^4$ /pozzetto) sono state coltivate con DCs irradiate ottenute da topi WT e infettate con BCG per 36-40 h a 37°C. Le cellule sono state allontanate e le piastre sono state lavate con acqua deionizzata e PBS/Tween20.

L'anticorpo secondario biotinilato è stato quindi aggiunto ed incubato per 2 h a temperatura ambiente. Dopo aver effettuato i lavaggi con PBS/Tween 20, la streptavidina-fosfatasi alcalina è stata aggiunta alle piastre ed incubata per 1 h. L'incubazione è stata seguita da altri lavaggi.

Lo sviluppo della reazione colorimetrica è stato effettuato utilizzando il substrato AEC (BD Biosciences). La reazione è stata bloccata quando gli spots risultavano ben evidenti, mettendo le piastre sotto il getto d'acqua corrente. Gli spots sono stati, quindi, contati utilizzando un lettore ELISPOT (Bioreader 3000; BioSys).

### **ELISA per la determinazione dei livelli di citochine e chemochine**

I lavaggi bronco-alveolari (BAL) sono stati ottenuti spruzzando 2 ml di PBS nei polmoni dei topi WT e D6<sup>-/-</sup> sacrificati dopo 12 settimane di infezione (65).

La concentrazione delle chemochine CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL11/eotassina e CCL22/MDC e delle

citochine TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , è stata quantificata attraverso saggi ELISA nei BAL e nei sieri usando degli appositi kit disponibili in commercio (R&D Systems).

Tramite saggi ELISA (R&D Systems) è stato, inoltre, quantizzato il contenuto delle citochine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  nei sieri e nei sovranatanti delle cellule mononucleate infiltranti i polmoni dei topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> e delle chemochine CCL2, CCL3 e KC rilasciate nei sovranatanti dalle cellule dendritiche generate a partire da cellule del midollo osseo CD34<sup>+</sup>, come sopra descritto, e stimulate con BCG (MOI di 1:1 and 5:1) per 48 h.

I risultati di seguito riportati sono i valori medi  $\pm$  DS ottenuti da campioni in duplicato e in triplicato.

### **Determinazione delle transaminasi sieriche, dell'azoto ureico ematico (BUN) e della proteinuria**

I livelli sierici di alanina amino transferasi (ALT; EC 2.6.1.2) e di aspartato aminotransferasi (AST; EC 2.6.1.1) sono stati misurati in topi WT, D6<sup>-/-</sup>, Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> attraverso il metodo fotometrico standard con un analizzatore automatico (type 7350; Hitachi Chemical Diagnostics) e kit disponibili in commercio (Sigma-Aldrich), adattati a campioni dai piccoli volumi, come precedentemente descritto (66).

I livelli normali di ALT e AST sono stati ottenuti testando il siero di 10 topi misti per età e sesso (66).

La proteinuria è stata misurata utilizzando delle striscette colorimetriche (66) per l'albumina (Albustix; Bayer) con una scala di valori da 0 a 4+: 0= assente; 1+= ≤ 30 mg/100 ml (lieve); 2+= 100 mg/100 ml (moderata); 3+= 300 mg/100 ml (severa); and 4+= > 2000 mg/100 ml (severa).

I livelli di BUN sono stati misurati impregnando le striscette Azostix (Bayer) con una goccia di sangue fresco (66) ed usando la seguente scala: 1+= 5 - 15 mg/100 ml (normale), 2+= 15 - 26 mg/100 ml (lieve) e 3+= ≥ 30 mg/100 ml (severa).

### **Neutralizzazione delle chemochine pro-infiammatorie *in vivo***

Per valutare gli effetti della neutralizzazione delle chemochine infiammatorie, topi WT e D6<sup>-/-</sup> sono stati trattati con anticorpi policlonali liofilizzati (goat anti-mouse) rivolti verso le CC-chemochine CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL4/MIP-1 $\beta$  e con un anticorpo monoclonale rivolto verso CCL5/RANTES (R&D Systems) risospesi in PBS sterile e miscelati (67, 68).

Ai topi sono stati iniettati intraperitonealmente 200  $\mu$ l di questa miscela, equivalenti a 100  $\mu$ g di ciascun anticorpo. In alternativa, i topi sono stati trattati con 400  $\mu$ g di anticorpi specifici rivolti verso ciascuna singola chemochina CC.

Negli stessi giorni del trattamento, topi controllo hanno ricevuto 400 µg di anticorpi irrilevanti (normal goat IgG) (Sigma-Aldrich) in 200 µl di PBS. I topi sono stati iniettati settimanalmente, a partire dalla terza settimana dall'infezione con *M. tuberculosis*.

### **Neutralizzazione delle citochine pro-infiammatorie *in vivo***

Per valutare gli effetti della neutralizzazione delle citochine infiammatorie *in vivo*, ai topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> è stata iniettata settimanalmente nel peritoneo una miscela di anticorpi neutralizzanti le citochine IL-1β (hamster IgG1; BD Pharmingen) e TNF-α (rat IgG1; BD Pharmingen), o in alternativa una miscela di hamster IgG1 e rat IgG1 come controllo, a partire dalla seconda settimana dall'infezione con *M. tuberculosis* (69). Ai topi sono stati somministrati intraperitonealmente 200 µl della miscela di anticorpi diluita in PBS sterile, equivalente a 100 µg di ciascun anticorpo.

### **Analisi istologica**

Per gli studi di istologia, i campioni di tessuto provenienti da topi WT, D6<sup>-/-</sup>, Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> infettati con micobatterio per 4 e 12 settimane sono stati fissati in



formalina al 10% e inclusi in paraffina. Sezioni dello spessore di 5–6  $\mu\text{m}$  sono state sottoposte a colorazione con ematossilina ed eosina e fotografate agli ingrandimenti 10 e 40x usando un microscopio stereoscopico (SMZ800; Nikon) ed una camera digitale (Coolpix 990; Nikon).

Per ciascun caso sono stati presi in esame sezioni di almeno 8 lobi polmonari.

Per determinare il rapporto tra l'area di ciascuna singola lesione e l'area tissutale totale sui microfotogrammi a ciascun tempo sono stati usati vari programmi di elaborazione dell'immagine (Scion Image [Scion Corporation]; Photoshop 5.0 [Adobe Systems Inc.]). I dati riportati in questa tesi sono le percentuali ottenute dividendo l'area coinvolta dal granuloma per l'area tissutale globale e moltiplicando per 100.

## **Analisi statistica**

Il test t di Student a due code è stato usato per paragonare la significatività delle differenze tra i gruppi di topi.

L'analisi di Kaplan-Meier è stata usata per determinare la significatività delle differenze nei tempi di sopravvivenza di topi WT *versus* topi D6<sup>-/-</sup> e dei topi Tir8<sup>+/+</sup> *versus* topi Tir8<sup>-/-</sup>.

La significatività delle differenze tra le conte delle CFU tra i gruppi è stata determinata usando l'analisi della varianza (ANOVA) con test di Scheffè per confronti individuali post-ANOVA.

P < 0.05 è stata considerata significativa.

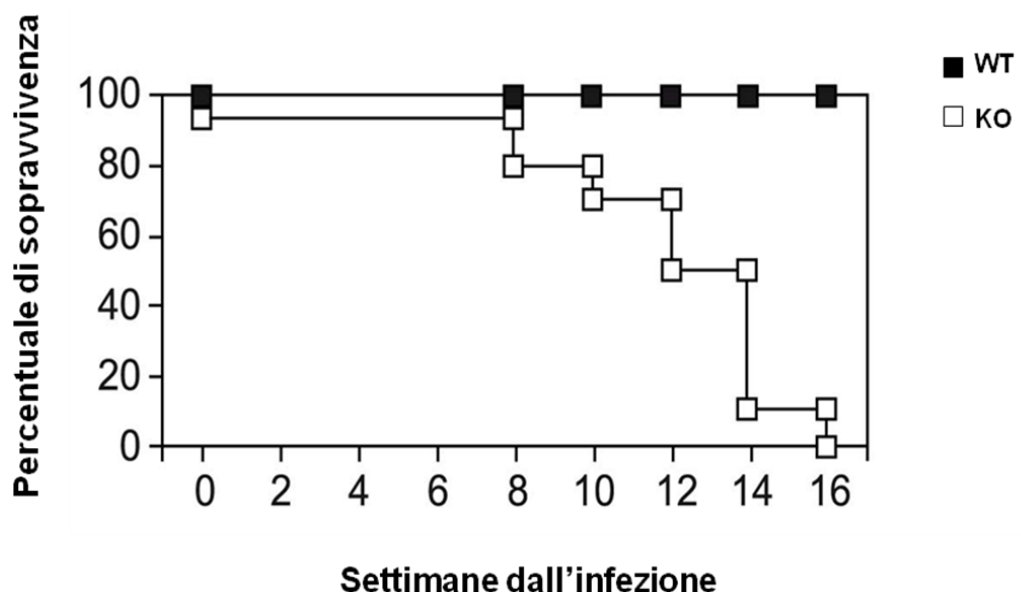
## **Risultati**

## **Elevata mortalità di topi D6<sup>-/-</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> in seguito ad infezione con *M. tuberculosis***

La mancanza di conoscenze specifiche sul ruolo biologico dei recettori silenti per chemochine e citochine nella risoluzione delle risposte infiammatorie indotte dalle infezioni ci ha spinto a focalizzare i nostri studi sul ruolo dei recettori D6 e Tir8 in modelli murini di infezione intranasale con *M. tuberculosis*, agente noto per la sua capacità di indurre risposte infiammatorie croniche granulomatose (70).

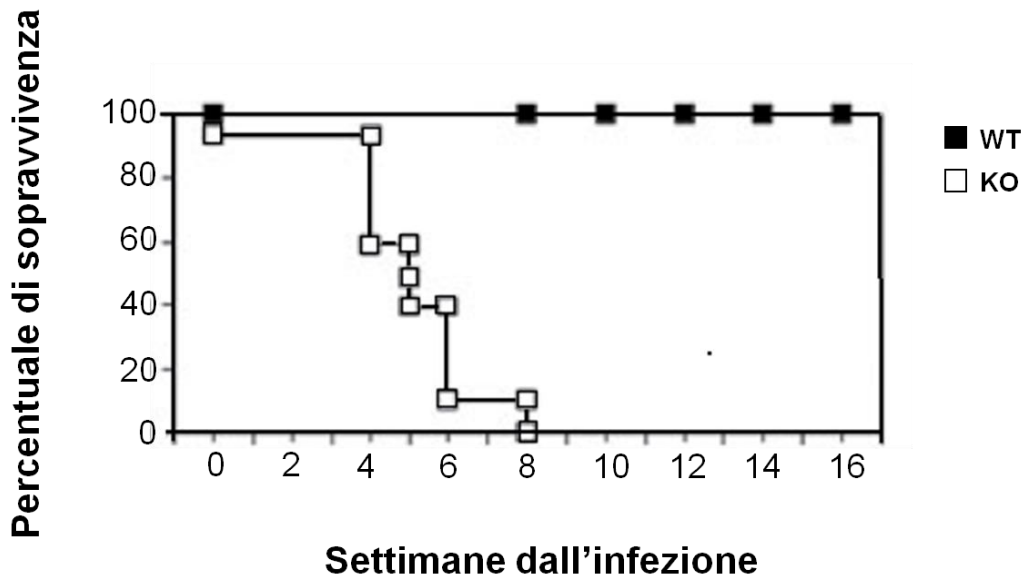
I livelli di espressione del recettore D6, soprattutto di quello localizzato sulla superficie delle cellule endoteliali, non sono modificati nei polmoni umani e nei linfonodi di individui infettati con Mtb (70), così come nei polmoni, nel fegato e nella milza di topi infettati con Mtb (70).

I topi D6<sup>-/-</sup> sono più suscettibili ad inoculi intranasali di basse dosi di Mtb H37Rv ( $2 \times 10^3$  CFU) rispetto a topi WT con una percentuale di sopravvivenza di circa l'80% dopo 8 settimane di infezione e del 50% dopo 12 settimane di infezione, diventando pari a zero dopo sedici settimane dall'infezione (Fig.11).



**Figura 11: Curva di sopravvivenza di topi WT and D6<sup>-/-</sup> infettati intranasalmente con  $2 \times 10^3$  CFU di *Mycobacterium tuberculosis*. I dati indicano la percentuale di sopravvivenza dei topi nel tempo. La differenza tra le percentuali di sopravvivenza dei topi WT e D6<sup>-/-</sup> è risultata statisticamente significativa ( $P < 0.001$ ).**

Ancora più grave sembra essere l'effetto del micobatterio in topi Tir8<sup>-/-</sup>, se paragonati a topi Tir8<sup>+/+</sup>, i quali muoiono più precocemente alla stessa dose di Mtb, con un 60% di topi morti già dopo 6 settimane di infezione ed il 100% dopo 8 settimane (Fig.12).



**Figura 12:** Curva di sopravvivenza di topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> infettati intranasalmente con 2x 10<sup>3</sup> CFU di *Mycobacterium tuberculosis*. I dati indicano la percentuale di sopravvivenza dei topi nel tempo. La differenza tra le percentuali di sopravvivenza dei due gruppi di topi è risultata statisticamente significativa (P < 0.001).

Nonostante l'aumentata mortalità, in entrambi i ceppi geneticamente modificati la carica batterica nei polmoni, fegato e milza non è differente da quella presente nella controparte dei topi WT, indicando chiaramente che la ridotta sopravvivenza dei topi D6<sup>-/-</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> al micobatterio non è dovuta al mancato controllo della moltiplicazione batterica e all'espandersi dell'infezione (Fig. 13 e 14).

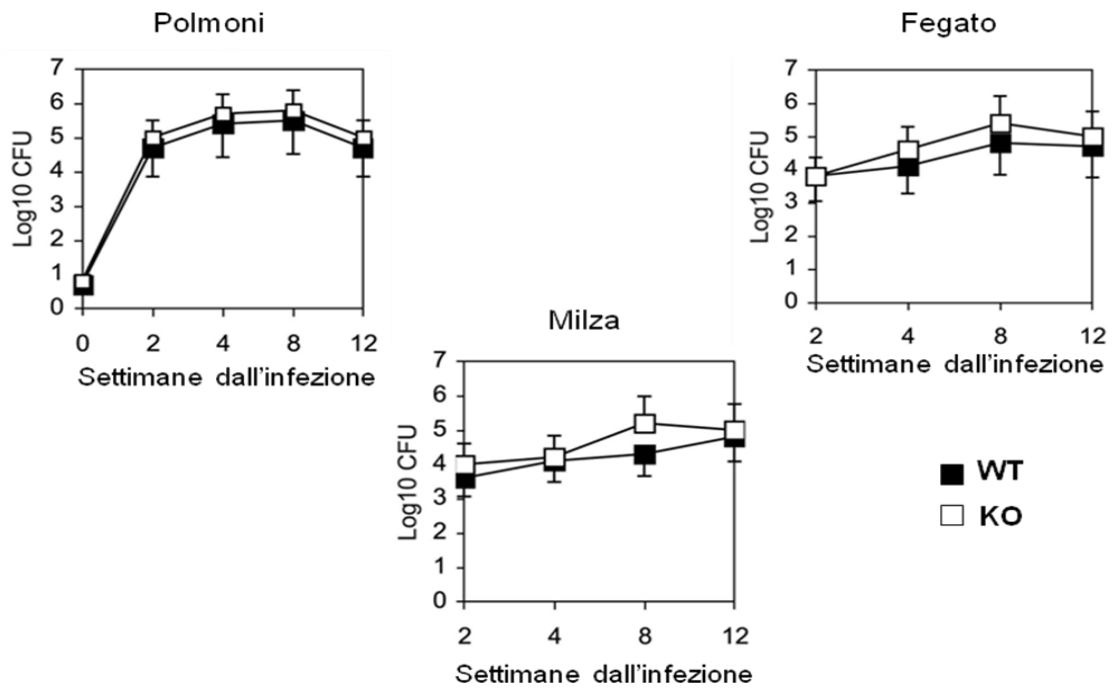


Figura 13: Il decorso dell'infezione con *M. tuberculosis* in topi WT e D6<sup>-/-</sup> infettati intranasalmente con  $2 \times 10^3$  CFU di micobatterio e seguita nel tempo nei polmoni, fegato e milza. I dati mostrati sono le medie delle conte batteriche  $\pm$  DS. Le differenze tra topi WT e D6<sup>-/-</sup> non sono risultate statisticamente significative a ciascun tempo esaminato.

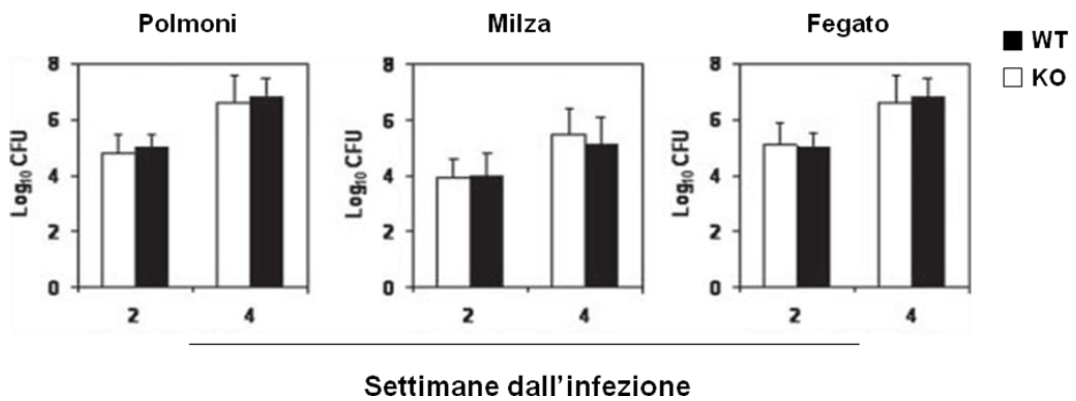
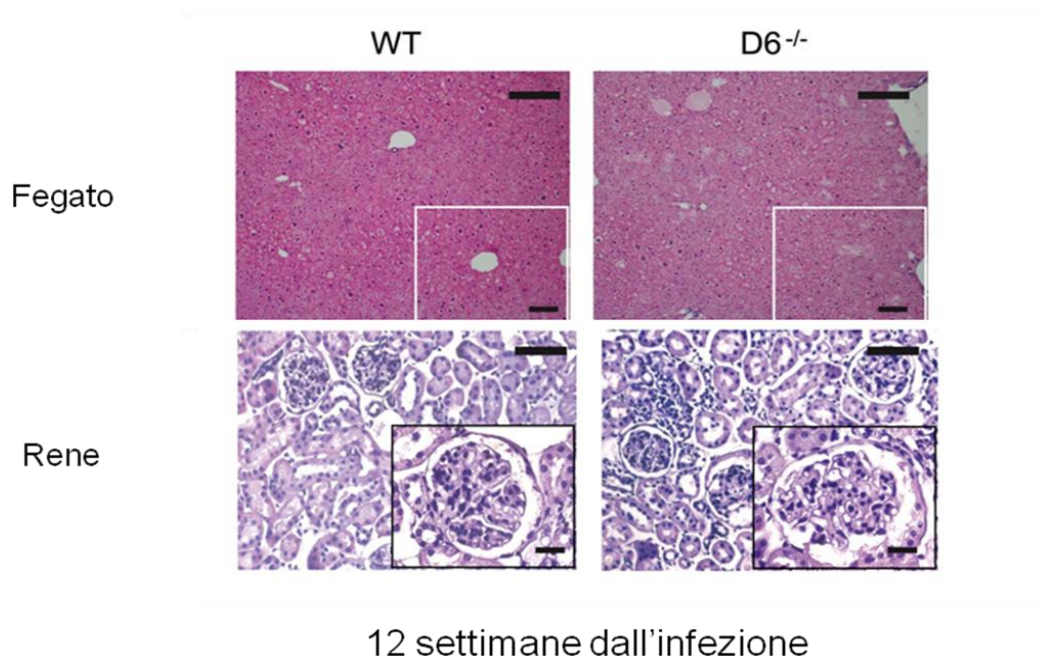
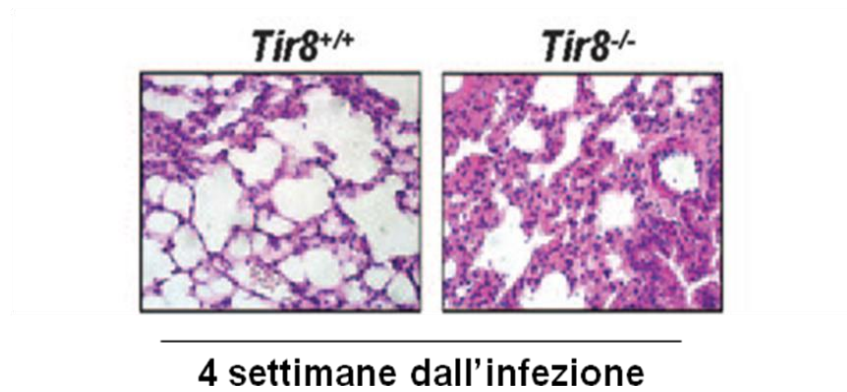


Figura 14: Il decorso dell'infezione con *M. tuberculosis* in topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> infettati intranasalmente con  $2 \times 10^3$  CFU di micobatterio e seguita nel tempo nei polmoni, milza e fegato. I dati mostrati sono le medie delle conte batteriche  $\pm$  DS.

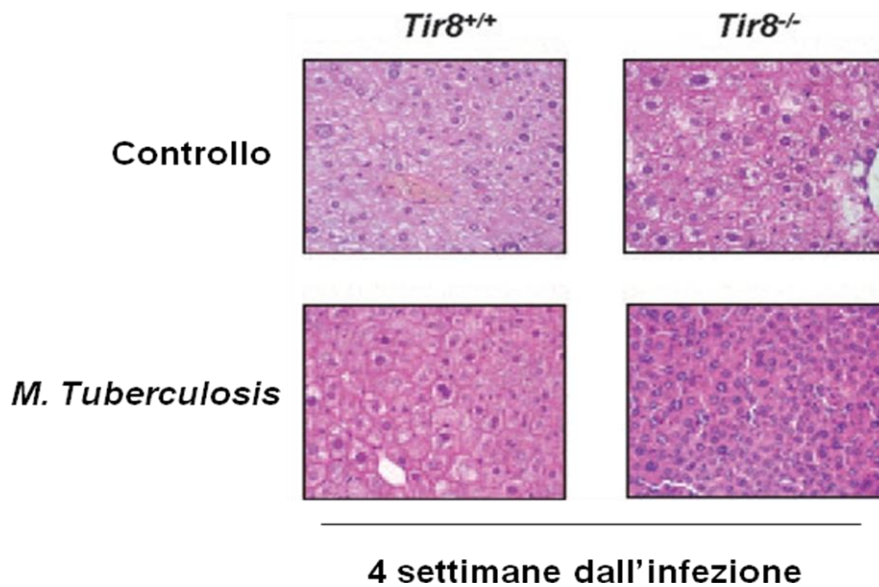
Analisi istologiche rivelano, invece, una severa infiammazione polmonare con edema e necrosi tissutale ed una diffusa necrosi epatica e renale in topi D6<sup>-/-</sup> dopo 12 settimane di infezione con Mtb (Fig. 15), mentre un grave danno polmonare (Fig 16), ma soprattutto epatico (Fig 17), è riscontrato nei topi Tir8<sup>-/-</sup> già a 4 settimane di infezione con Mtb.



**Figura 15: Sezioni di fegato e rene di topi WT e D6<sup>-/-</sup> (KO) a 12 settimane dall' infezione con *M. Tuberculosis*. Lo staining mostrato è stato effettuato con ematossilina ed eosina e per le immagini principali l'ingrandimento usato è un 10x, per i particolari un 40x.**



**Figura 16:** Sezioni di polmoni di topi *Tir8<sup>+/+</sup>* e *Tir8<sup>-/-</sup>* a 4 settimane dall'infezione con *M. tuberculosis*. Lo staining mostrato è stato effettuato con ematossilina ed eosina e l'ingrandimento usato è un 40x.

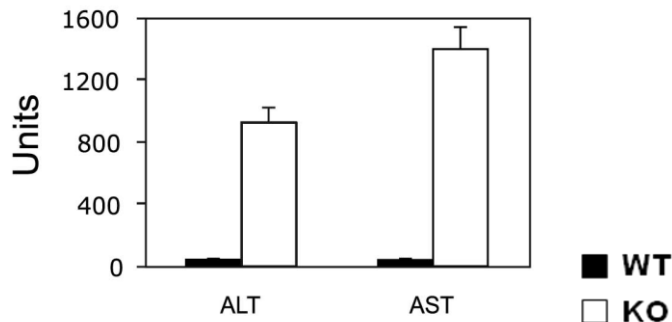


**Figura 17:** Sezioni di fegato di topi *Tir8<sup>+/+</sup>* e *Tir8<sup>-/-</sup>* a 4 settimane dall'infezione con *M. tuberculosis*. Lo staining mostrato è stato effettuato con ematossilina ed eosina e l'ingrandimento usato è un 40x.

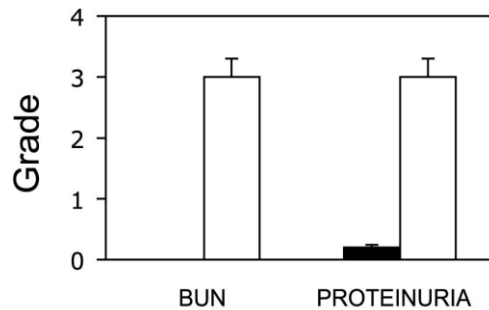


A conferma di questi dati, saggi ELISA eseguiti su campioni di sangue ed urine di topi D6<sup>-/-</sup> infettati con Mtb per 12 settimane mostrano livelli più elevati di transaminasi sieriche (Fig. 18A) e di azoto ureico nel sangue (BUN) e proteinuria (Fig. 18B), se paragonati a quelli di topi WT, suggerendo come la funzionalità renale in questi topi sia severamente compromessa.

A



B



**Figura 18: Saggi ELISA eseguiti a 12 settimane dall'infezione con *M. tuberculosis*.** Gli istogrammi mostrano i livelli di transaminasi sieriche (a), di azoto ureico ematico (BUN) e di proteinuria (b). Simili risultati sono stati ottenuti in cinque diversi esperimenti. Le differenze tra topi WT e D6<sup>-/-</sup> sono risultate statisticamente significative ( $P < 0.001$ ). I dati riportati sono i valori medi  $\pm$  DS.

Anche i livelli sierici delle transaminasi di topi Tir8<sup>-/-</sup> infettati con Mtb sono enormemente aumentati rispetto a quelli di topi Tir8<sup>+/+</sup> (Tab. I).

	<b>Tir8<sup>+/+</sup></b>	<b>Tir8<sup>-/-</sup></b>
<b>ALT</b>	<b>34 ± 8</b>	<b>875 ± 26*</b>
<b>AST</b>	<b>48 ± 12</b>	<b>1322 ± 128*</b>

**Tabella I: Saggi ELISA eseguiti a 4 settimane dall'infezione con *M. Tuberculosis*.** Topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> sono stati infettati intranasalmente con *M. tuberculosis*. I sieri sono stati raccolti 4 settimane più tardi e i livelli di transaminasi misurati come descritto in Materiali e Metodi. I valori riportati sono le medie ± DS. \*p < 0.001.

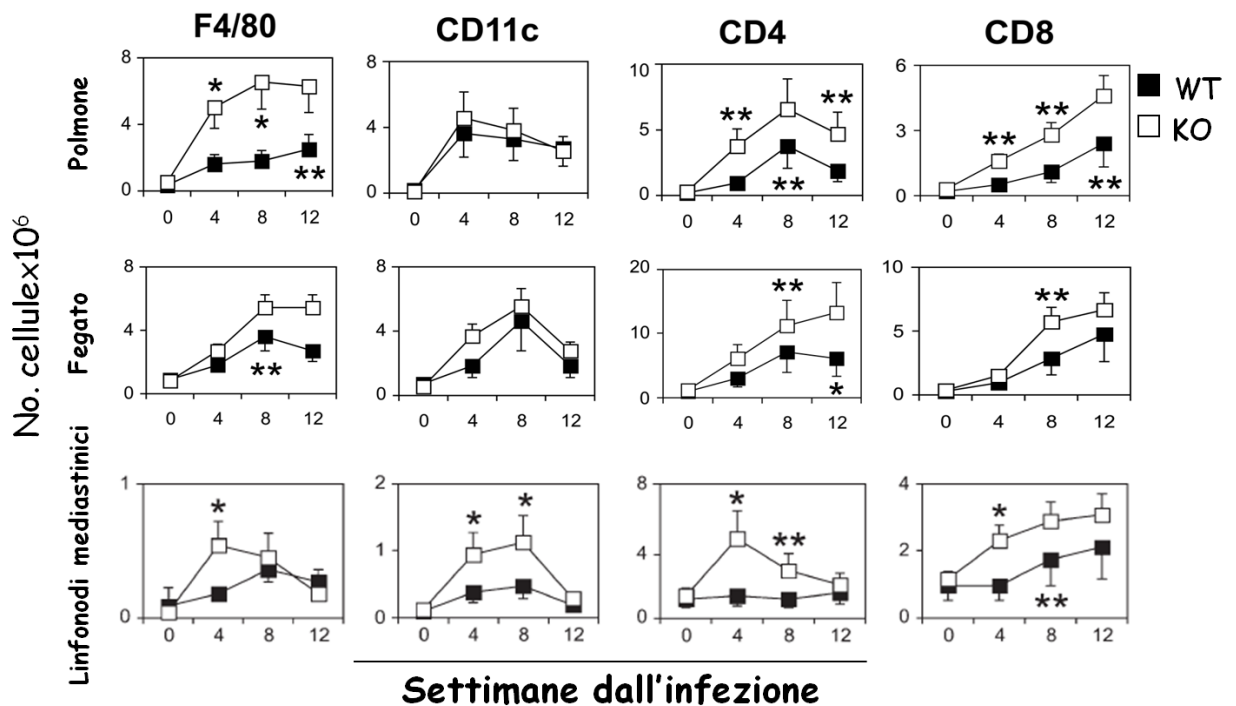
Così, nonostante la loro capacità di controllare l'espansione dei micobatteri infettanti, topi D6<sup>-/-</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> mostrano una più alta mortalità associata ad infiammazione polmonare, diffusa necrosi epatica e funzionalità renale gravemente compromessa.

## **Infiltrazione leucocitaria nei tessuti di topi D6<sup>-/-</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> infettati con *M. tuberculosis***

L'infiltrato cellulare presente nei polmoni di topi D6<sup>-/-</sup> è stato da noi esaminato a vari tempi dall'infezione. Il numero di DCs (CD11c<sup>+</sup>) ivi reclutate non è significativamente differente tra topi WT e D6<sup>-/-</sup> al contrario del numero di macrofagi (F4/80<sup>+</sup>), di linfociti T CD4 e CD8 che è invece significativamente più alto nei topi D6<sup>-/-</sup> a tutti i tempi esaminati dopo l'infezione (Fig. 19).

Inoltre, approssimativamente il 45% dei linfociti T CD4 e CD8 infiltranti i polmoni di tali topi, a 8 e 12 settimane dall'infezione, mostra una maggiore espressione di markers di attivazione quali CD25 e CD44 contro il 30% soltanto dei CD4 e il 35% dei CD8 infiltranti i polmoni di topi WT, sebbene le differenze non siano statisticamente significative.

Gli stessi risultati vengono riscontrati anche nel fegato, sebbene le differenze tra topi WT e D6<sup>-/-</sup> siano più basse che nei polmoni, raggiungendo significatività solo a 8 e a 12 settimane dall'infezione (Fig. 19).

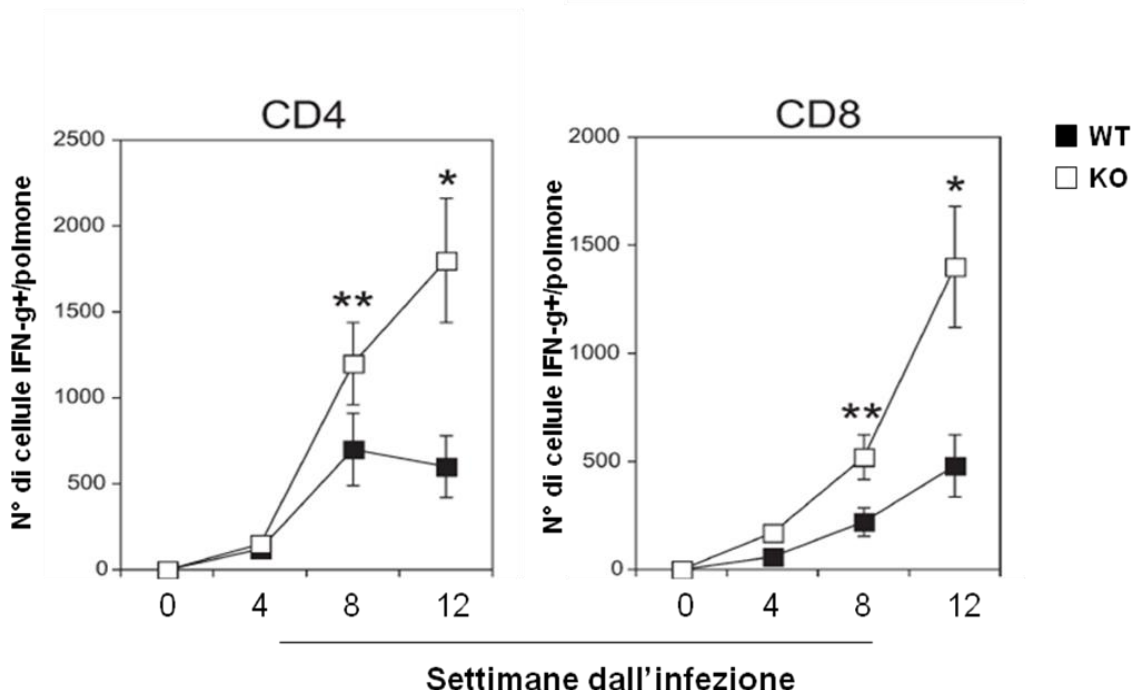


**Figura 19: Fenotipizzazione dell'infiltrato leucocitario negli organi e nei linfonodi dopo infezione di topi WT e D6<sup>-/-</sup> con *M. tuberculosis*.** I leucociti sono stati isolati dai polmoni, dal fegato e dai linfonodi mediastinici di topi WT e D6<sup>-/-</sup> infettati ed analizzati attraverso citofluorimetria a differenti settimane dall'infezione con Mtb. Le cellule sono state marcate con anticorpi fluorescenti per F4/80 (macrofagi), CD11c (DCs), CD4 e CD8. I valori medi  $\pm$  DS riportati sono il risultato di cinque esperimenti differenti. \*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

In aggiunta, è stato da noi riscontrato che, rispetto a quanto avviene nei topi WT, più alte quantità di macrofagi, DCs, CD4 e CD8 migrano nei linfonodi mediastinici dei topi D6<sup>-/-</sup> soprattutto a 4 e a 8 settimane di infezione con Mtb (Fig. 19). Il richiamo cellulare nei linfonodi causa, in seguito, un aumento del numero di linfociti T specificatamente attivati che, a loro volta, migrano nei polmoni, come confermato da saggi ELISPOT effettuati su leucociti infiltranti i

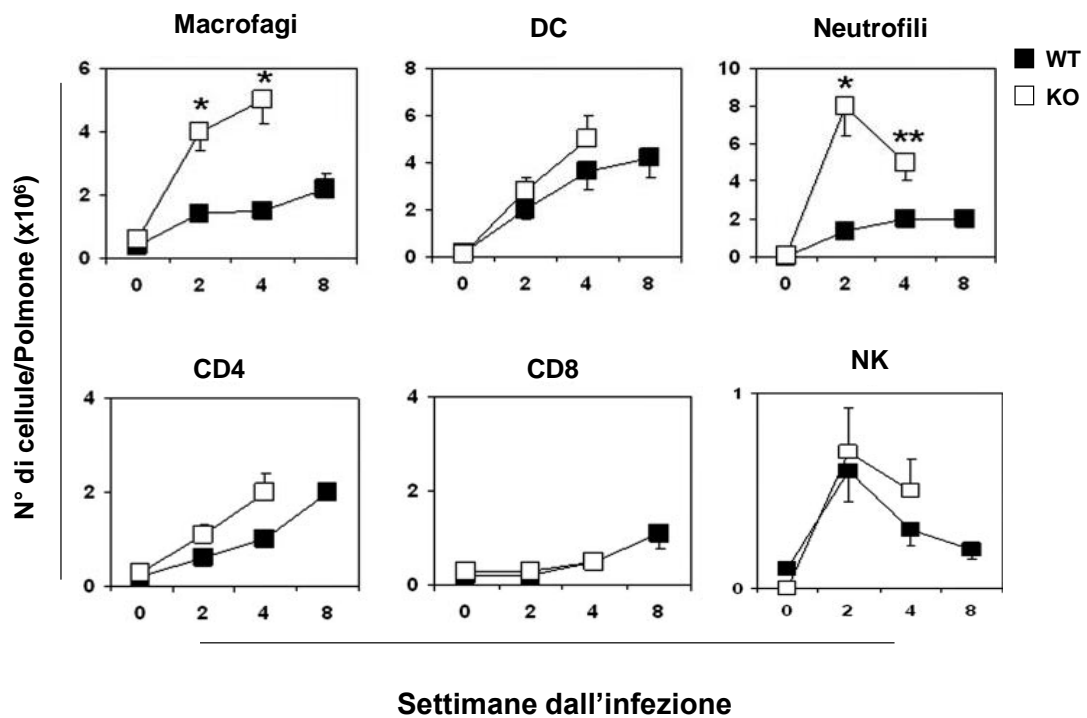
polmoni isolati da topi D6<sup>-/-</sup> infettati e stimolati *in vitro* con DCs irradiate prelevate da topi WT infettati con BCG.

Infatti, a 8 e 12 settimane dall'infezione con Mtb, il numero di CD4 e CD8 secernenti IFN- $\gamma$  risulta significativamente aumentato nei polmoni di topi D6<sup>-/-</sup> rispetto a topi WT trattati nello stesso modo (Fig. 20).



**Figura 20: CD4 e CD8 secernenti IFN- $\gamma$  nei polmoni dei topi D6<sup>-/-</sup> dopo infezione con *M. Tuberculosis*.** I leucociti infiltranti i polmoni sono stati isolati da topi WT e D6<sup>-/-</sup> infettati con Mtb ai tempi sopra indicati dall'infezione e ristimolati *in vitro* con WT DCs irradiate ed infettate con BCG per 36-40 h a 37°C. Il numero di CD4 e CD8 secernenti IFN- $\gamma$  è stato quantizzato attraverso saggi ELISPOT. In figura sono riportati i valori medi  $\pm$  DS dei risultati ottenuti da cinque esperimenti. \*, P < 0.005; \*\*, P < 0.01.

Come accade nei topi D6<sup>-/-</sup>, i polmoni dei topi Tir8<sup>-/-</sup> sono ricchi di infiltrato linfocitario, anche se i numeri di DCs, NK, CD4 e CD8 non sono differenti tra topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> a ciascun tempo esaminato a partire dall'infezione, mentre il numero dei macrofagi e dei neutrofili risulta drammaticamente aumentato in topi Tir8<sup>-/-</sup> a 2 e a 4 settimane di infezione (Fig. 21).

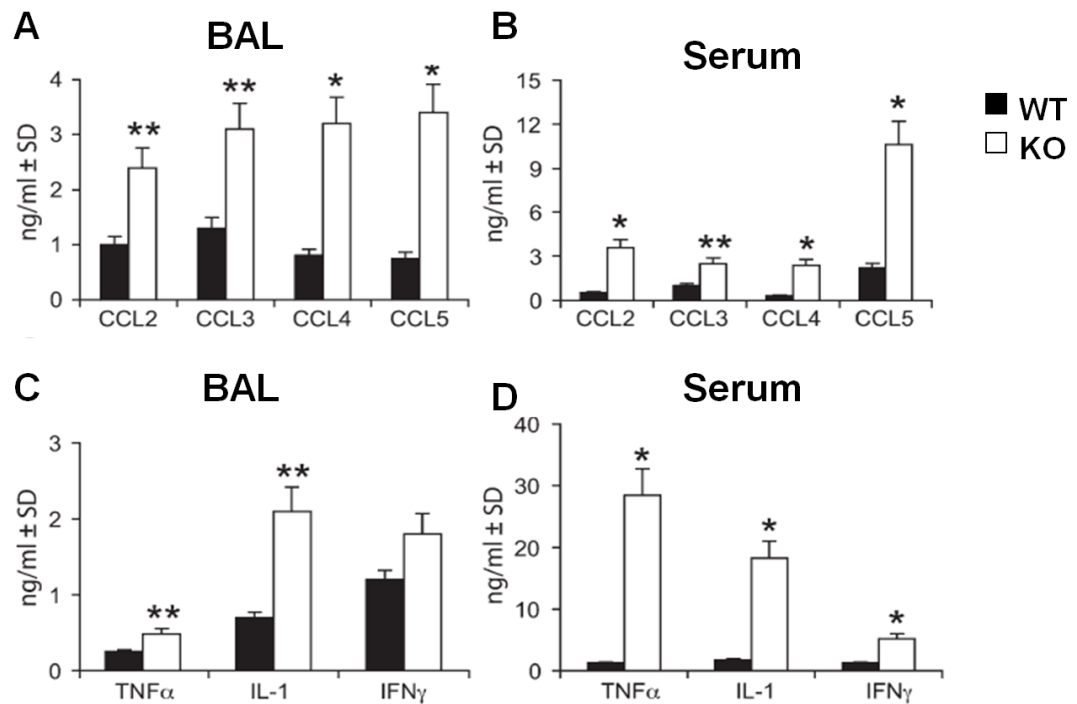


**Figura 21: Fenotipizzazione dei leucociti infiltranti i polmoni dopo infezione di topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> con *M. tuberculosis*.** I leucociti infiltranti i polmoni di topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> sono stati marcati con anticorpi fluorescenti per F4/80 (macrofagi), CD11c (DCs), Gr-1 (neutrofili), CD4, CD8, and NK1.1 (cellule NK). I risultati riportati sono i valori medi del numero di cellule  $\pm$  DS per ciascun tipo cellulare. \*, P < 0.001; \*\*, P < 0.01.

## **Aumento dei livelli citochinici e chemochinici in topi D6<sup>-/-</sup> Tir8<sup>-/-</sup> infettati con *M. tuberculosis***

L'aumentato richiamo di cellule infiammatorie nei differenti organi dei topi D6<sup>-/-</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> sembra causare una massiva, locale o sistemica, produzione di citochine pro-infiammatorie, come TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e di CC-chemochine (CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5), le quali sono responsabili dei danni tissutali riscontrati nei vari organi dei topi infettati.

Come suggerito dai dati riportati in letteratura (67, 70), le cellule mononucleate infiltranti i polmoni di topi D6<sup>-/-</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> infettati con Mtb producono maggiori quantità di citochine pro-infiammatorie e, soprattutto, più alti livelli di TNF- $\alpha$  ed IL-1 $\beta$  sono stati riscontrati nei lavaggi broncoalveolari (BAL) e nei sieri dei topi D6<sup>-/-</sup> (Fig. 22) mentre le DCs prelevate da topi Tir8<sup>-/-</sup> mostrano un'aumentata responsività all'LPS e agli oligodeossinucleotidi CpG in termini di produzione di citochine e chemochine (60).



**Figura 22: Livelli di chemochine e citochine pro-infiammatorie nei BAL e nei sieri di topi WT e D6<sup>-/-</sup> infettati con Mtb.** Topi WT e D6<sup>-/-</sup> sono stati infettati intranasalmente con *M. tuberculosis* e i BAL e i sieri sono stati ottenuti 12 settimane più tardi. I livelli di CC chemochine (A e B) e di citochine (C e D) sono stati misurati tramite saggi ELISA. I risultati mostrati sono i valori medi  $\pm$  DS. Risultati simili sono stati ottenuti in tre diversi esperimenti. \*, P < 0.001; \*\*, P < 0.01.

Il controllo dell'infezione con l'Mtb dipende dall'attivazione dei macrofagi secernenti IFN- $\gamma$ . Questa porta alla produzione di citochine pro-infiammatorie, come TNF- $\alpha$  ed IL-1 $\beta$ , di intermedi reattivi dell'azoto come l'NO, e alla formazione e al mantenimento del granuloma (71, 72).

Poiché i nostri risultati indicano che topi Tir8<sup>-/-</sup> hanno più neutrofili e macrofagi migranti nei polmoni in risposta al micobatterio (Fig. 21), saggi ELISA sono stati effettuati sui sovranatanti delle cellule mononucleate infiltranti i



polmoni dei topi *Tir8<sup>-/-</sup>* infettati per valutarne il contenuto citochinico. La produzione di entrambe le citochine pro-infiammatorie TNF- $\alpha$  ed IL-1 $\beta$  è già evidente dopo 4 settimane di infezione, anche se topi *Tir8<sup>-/-</sup>* producono livelli significativamente più alti di entrambe le citochine rispetto ai topi *Tir8<sup>+/+</sup>* (Tab. II).

	IL-1 $\beta$ (ng/ml)	TNF- $\alpha$ (ng/ml)	IFN- $\gamma$ (ng/ml)
<b>Tir8<sup>+/+</sup></b>	0.62 $\pm$ 0.24	0.56 $\pm$ 0.12	0.72 $\pm$ 0.24
<b>Tir8<sup>-/-</sup></b>	5.40 $\pm$ 0.85*	2.90 $\pm$ 0.56*	0.68 $\pm$ 0.36

**Tabella II: Contenuto citochinico dei polmoni di topi *Tir8<sup>+/+</sup>* e *Tir8<sup>-/-</sup>* a 4 settimane dall'infezione con *M. Tuberculosis*.** Topi *Tir8<sup>+/+</sup>* e *Tir8<sup>-/-</sup>* sono stati infettati intranasalmente ed i polmoni sono stati rimossi e digeriti dopo 4 settimane. Le sospensioni leucocitarie sono state preparate e tenute in coltura senza alcun stimolo per 48 h at 37°C. I sovranatanti sono stati raccolti ed i livelli di citochine analizzati tramite saggi ELISA. I risultati mostrati sono i valori medi  $\pm$  DS; \*, p<0.001.

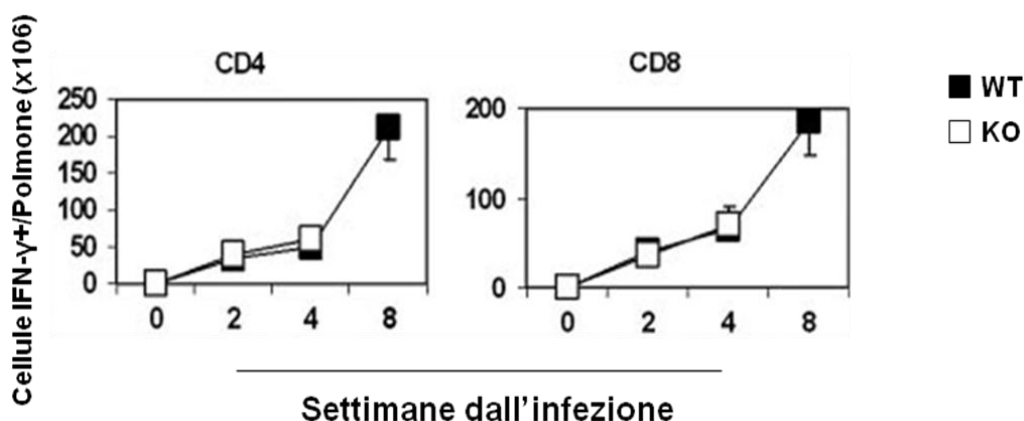
Al contrario, cellule mononucleate infiltranti i polmoni di topi *Tir8<sup>-/-</sup>* e *Tir8<sup>+/+</sup>* producono quantità simili di IFN- $\gamma$  (Tab. II).

La stessa cosa avviene per i livelli di citochine pro-infiammatorie circolanti, con significative differenze tra topi *Tir8<sup>-/-</sup>* e *Tir8<sup>+/+</sup>* per il TNF- $\alpha$  e l' IL-1 $\beta$ , ma non per l'IFN- $\gamma$  (Tab. III).

	<b>Tir8<sup>+/+</sup></b>	<b>Tir8<sup>-/-</sup></b>
<b>IL-1 <math>\beta</math> (ng/ml)</b>	0.36 $\pm$ 0.12	14.8 $\pm$ 3.5*
<b>TNF-<math>\alpha</math> (ng/ml)</b>	0.44 $\pm$ 0.1	8.3 $\pm$ 1.2*
<b>IFN-<math>\gamma</math> (ng/ml)</b>	0.21 $\pm$ 0.1	0.15 $\pm$ 0.1

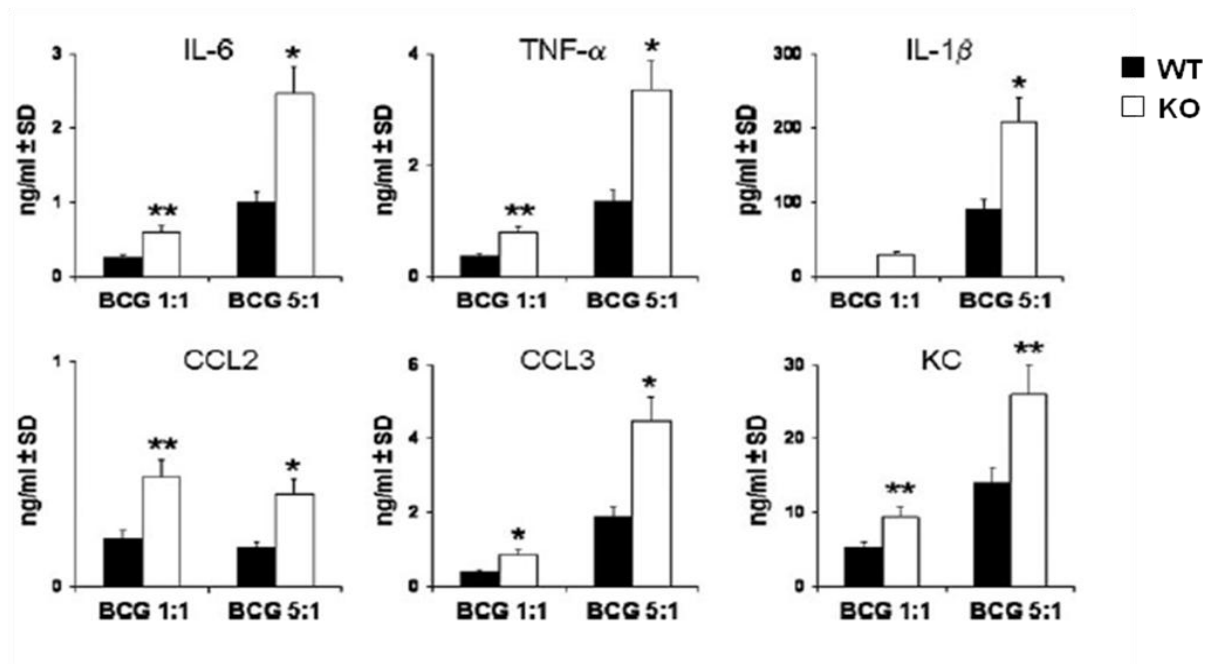
**Tabella III: Livelli sierici di citochine in topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> a 4 settimane dall'infezione con *M. tuberculosis*.** Topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> sono stati infettati intranasalmente ed i sieri, raccolti 4 settimane più tardi, sono stati analizzati per il loro contenuto di citochine e transaminasi attraverso saggi ELISA. I risultati mostrati sono i valori medi  $\pm$  SD; \*, p<0.001.

I risultati ottenuti dai saggi ELISA sulla produzione di IFN- $\gamma$  da parte di cellule mononucleate infiltranti i polmoni di topi Tir8<sup>-/-</sup> e Tir8<sup>+/+</sup> sono stati ulteriormente confermati dall'analisi citofluorimetrica delle cellule T CD4 e CD8, presenti nell'infiltrato polmonare e secernenti IFN- $\gamma$  (Fig. 23), che mostra come non vi siano differenze tra i due gruppi di topi a tutti i tempi presi in esame.



**Figura 23: Produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule T nei polmoni  $Tir8^{+/+}$  e  $Tir8^{-/-}$  dopo infezione con *M. tuberculosis*.** Cellule T CD4 e CD8 sono state isolate da topi  $Tir8^{+/+}$  e  $Tir8^{-/-}$  ai tempi sopra indicati dal momento dell'infezione e ristimate *in vitro* con WT DCs irradiate ed infettate con BCG per 36-40 h a 37°C. La percentuale di linfociti T CD4 e CD8 IFN- $\gamma$ -positivi è stata quantizzata attraverso citofluorimetria. Sono riportati in figura i valori medi  $\pm$  DS di CD4 e CD8 IFN- $\gamma$  positivi a ciascun punto sperimentale.

Per tale motivo abbiamo continuato i nostri esperimenti valutando se l'aumentata produzione citochinica avvenga in seguito ad infezione delle cellule dendritiche con BCG o con Mtb. La Fig. 24 mostra come le DCs di topi  $Tir8^{-/-}$  infettate *in vitro* con BCG producano livelli significativamente più elevati di citochine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ed IL-6) e chemochine (CCL2, CCL3, and KC), quando paragonati alle DCs di topi  $Tir8^{+/+}$ . Risultati simili sono stati ottenuti anche infettando le DCs di topi  $Tir8^{-/-}$  con Mtb (dati non mostrati), supportando l'ipotesi che siano proprio le DCs la fonte dell'aumentata produzione citochinica e chemochinica riscontrata nei topi  $Tir8^{-/-}$  infettati con Mtb.



**Fig. 24: Produzione di citochine e chemochine da DCs derivate dal midollo osseo di topi *Tir8<sup>+/+</sup>* e *Tir8<sup>-/-</sup>*.** Le DCs sono state generate da cellule del midollo osseo CD34<sup>+</sup> e stimolate con BCG (MOI di 1:1 and 5:1). 48 h dopo, i sovranatanti sono stati raccolti e il contenuto di chemochine e citochine è stato quantizzato attraverso saggi ELISA. I risultati riportati sono valori medi ± DS. \*, P < 0.001; \*\*, P < 0.02.

## **Effetti della neutralizzazione *in vivo* delle chemochine pro-infiammatorie**

I risultati ottenuti evidenziano come l'infezione murina con Mtb in assenza del recettore D6 sia caratterizzata da un'esagerata risposta infiammatoria ed un'aumentata mortalità, nonostante la crescita batterica sia tenuta sotto controllo.

Per comprendere se gli aumentati livelli di chemochine infiammatorie osservati nei topi D6<sup>-/-</sup> abbiano un ruolo cruciale nella patogenesi tubercolare, abbiamo cercato di bloccare *in vivo* le chemochine CC che avevamo trovato maggiormente espresse: CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  e CCL5/RANTES (59, 68).

A questo scopo, a topi D6<sup>-/-</sup> è stata iniettata intraperitonealmente una miscela di anticorpi rivolti verso queste chemochine, o, in alternativa, i singoli anticorpi rivolti verso ciascuna chemochina.

Nello stesso giorno dell'inoculo con gli anticorpi, topi controllo hanno ricevuto una quantità equivalente di anticorpi irrilevanti. I topi sono stati così inoculati settimanalmente, a partire dalla terza settimana dopo l'infezione con  $2 \times 10^3$  CFU di Mtb.

Dopo questo trattamento, nei topi trattati con la miscela di anticorpi la concentrazione sierica di CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  e

CCL5/RANTES si riduce consistentemente, dimostrando così l'efficacia della neutralizzazione, mentre topi D6<sup>-/-</sup> trattati con gli anticorpi controllo mantengono alti i livelli sierici delle chemochine, così come topi D6<sup>-/-</sup> non trattati.

Anche i livelli sierici di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ed IFN- $\gamma$  dopo il trattamento risultano consistentemente ridotti e l'afflusso ai tessuti infetti significativamente diminuito (dati non pubblicati).

In aggiunta, entrambe le funzioni renale ed epatica sembrano migliorare dopo questo trattamento, come evidenziato dai bassi livelli di transaminasi sieriche, di azoto ureico e di proteinuria riscontrati nei topi trattati.

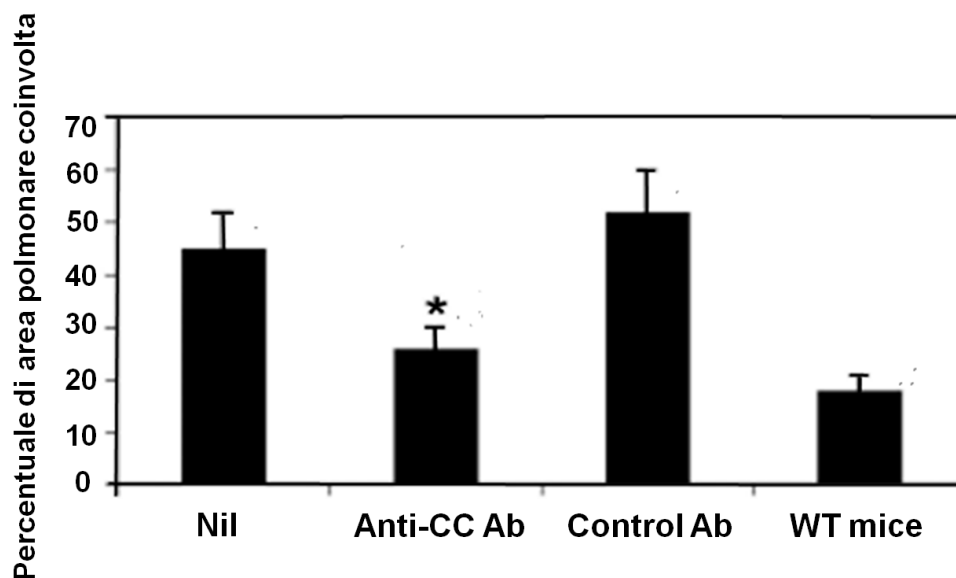
La conseguenza più importante della neutralizzazione delle CC-chemochine nei topi D6<sup>-/-</sup> è comunque una sopravvivenza significativamente prolungata, dal momento che solo il 10% dei topi muore dopo 12 settimane di infezione e il 30% dopo 16 settimane (Tab. IV).

Topi	Trattamento	MORTALITA'		
		Settimane dall'infezione		
		8	12	16
WT	Nil	0/10	0/10	0/10
D6 <sup>-/-</sup>	Nil	3/10	5/10	9/10
D6 <sup>-/-</sup>	Abs controllo	2/10	4/10	9/10
D6 <sup>-/-</sup>	Anti-CCL2/MCP-1	3/10	3/10	8/10
D6 <sup>-/-</sup>	Anti-CCL3/MIP-1 $\alpha$	4/10	6/10	9/10
D6 <sup>-/-</sup>	Anti-CCL4/MIP-1 $\beta$	2/10	4/10	8/10
D6 <sup>-/-</sup>	Anti-CCL5/RANTES	2/10	4/10	9/10
D6 <sup>-/-</sup>	Mix Ab	0/10*	1/10*	3/10**

**Tabella IV: Effetto della neutralizzazione delle chemochine infiammatorie in topi D6<sup>-/-</sup>.** Topi WT e D6<sup>-/-</sup> non trattati o trattati con anticorpi monoclonali diretti verso ciascuna singola CC-chemochina, o con un cocktail di anti-CC chemochine o anticorpi irrilevanti come controllo, sono stati infettati con *M. tuberculosis*. La sopravvivenza dei topi è stata controllata nel tempo. I dati riportati sono i numeri delle morti sul numero di topi trattati (n=10 per gruppo). \*, P < 0.001; and \*\*, P < 0.01 quando topi D6<sup>-/-</sup> trattati con la miscela di anticorpi (Mix antibody) vengono paragonati a topi non trattati (Nil) o trattati con anticorpo controllo (Control antibody).

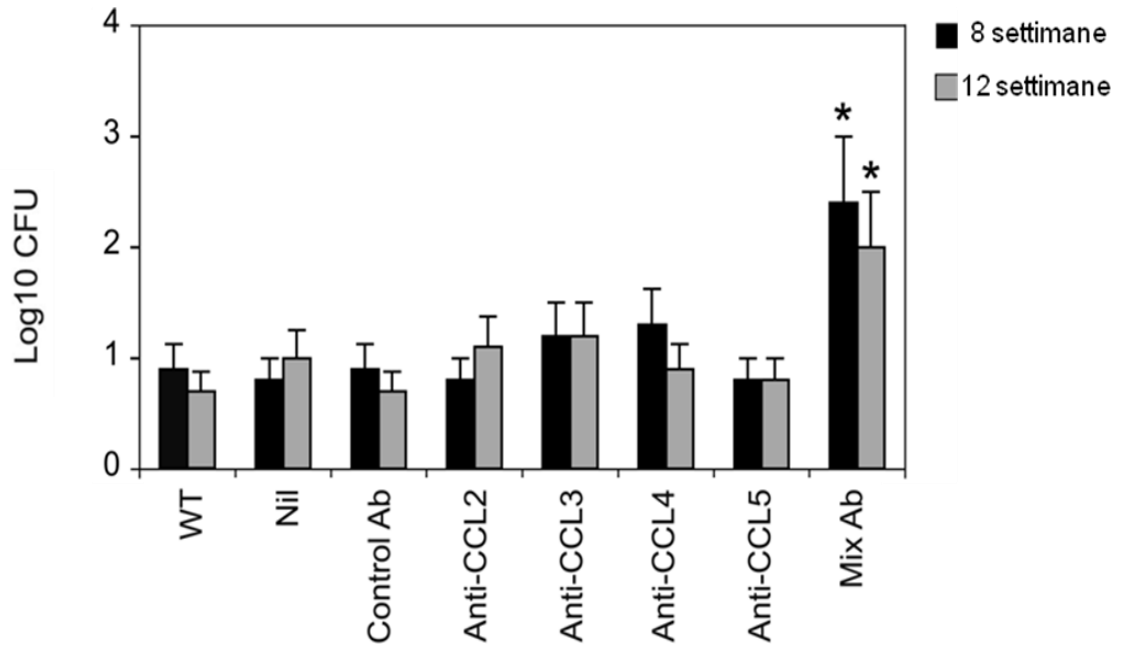
Nonostante la somministrazione di anticorpi neutralizzanti le chemochine sia capace di ridurre la risposta infiammatoria in topi D6<sup>-/-</sup> infettati con Mtb, dato confermato non soltanto dalla loro aumentata sopravvivenza ma anche dalla riduzione dell'area delle infiltrazioni granulomatose polmonari (Fig. 25A), tali

topi non riescono a controllare la crescita del micobatterio nei polmoni, raggiungendo più alte cariche batteriche a 8 e a 12 settimane dall'infezione (Fig.25B). Questo risultato indica che il recettore D6 gioca un ruolo cruciale nell'infezione tubercolare, costituendo una sorta di linea di confine tra l'instaurarsi di risposte protettive per l'ospite e il loro trasformarsi in risposte infiammatorie croniche e quindi patologiche.



**Figure 25A.** Crescita micobatterica in topi  $D6^{-/-}$  trattati con anticorpi diretti verso le chemochine CC. Topi WT e  $D6^{-/-}$  non trattati (Nil), o trattati con un cocktail di anti-CC chemochine (Anti-CC Ab) o di anticorpi controllo (Control Ab), sono stati infettati con *M. tuberculosis*. L'area delle infiltrazioni granulomatose nei polmoni dei topi infettati con *M. tuberculosis* è stata valutata analizzando due lobi polmonari prelevati da ciascun topo. I dati riportati sono espressi come percentuale  $\pm$  DS dell'area polmonare coinvolta, calcolata dividendo l'area coinvolta dalla formazione dei granulomi sull'area tissutale totale. Nella figura sono mostrati due diversi esperimenti.





**Figura 25B. Crescita micobatterica in topi D6<sup>-/-</sup> trattati con anticorpi diretti verso le chemochine CC.** Topi WT e D6<sup>-/-</sup> non trattati (Nil), o trattati con anticorpi verso ciascuna singola chemochina, o con un cocktail di anti-CC chemochine (Mix Ab), o con anticorpi controllo (Control Ab), sono stati infettati con *M. tuberculosis*.

I dati riportati sono la media delle conte batteriche  $\pm$  DS. \*,  $P < 0.01$  quando vengono paragonate le CFU riscontrate nei topi D6<sup>-/-</sup> con quelle dei topi non trattati (Nil) o trattati con gli anticorpi controllo.

## Effetti della neutralizzazione *in vivo* delle citochine pro-infiammatorie

I risultati da noi ottenuti dimostrano chiaramente come l'infezione con MTb in assenza del recettore Tir8 sia caratterizzata da un'esagerata risposta infiammatoria con elevati livelli sistemici di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , portando ad una massiva necrosi epatica e ad un'aumentata mortalità, nonostante i topi infettati riescano a tenere sotto controllo la crescita e l'espandersi del micobatterio.

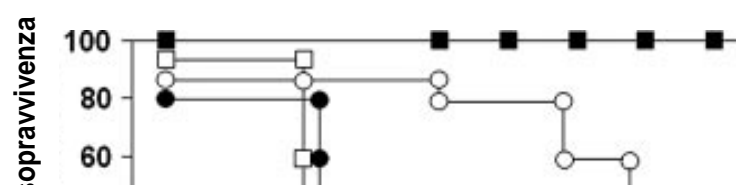
Per confermare se l'aumentata produzione di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  sia coinvolta nella patogenesi del danno tissutale, abbiamo cercato di bloccare le citochine ed i loro effetti *in vivo*.

A questo scopo, abbiamo iniettato intraperitonealmente in topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> una miscela di anticorpi diretti verso entrambe le citochine, come descritto in Materiali e Metodi.

Nello stesso giorno, topi controllo hanno ricevuto, invece, una quantità equivalente di anticorpi irrilevanti, come controllo dell'efficacia del trattamento.

I topi sono stati trattati settimanalmente, a partire dalla seconda settimana dall'infezione con 2x10<sup>3</sup> CFU di Mtb, e la mortalità dei topi è stata monitorata a vari tempi dopo il trattamento.

Come ci aspettavamo, topi Tir8<sup>-/-</sup> non trattati, o trattati con gli anticorpi controllo, muoiono già dopo 8 settimane di infezione con Mtb (Fig. 26), mentre topi Tir8<sup>+/+</sup> infettati con la stessa dose di Mtb sopravvivono fino a 16 settimane dopo l'infezione.



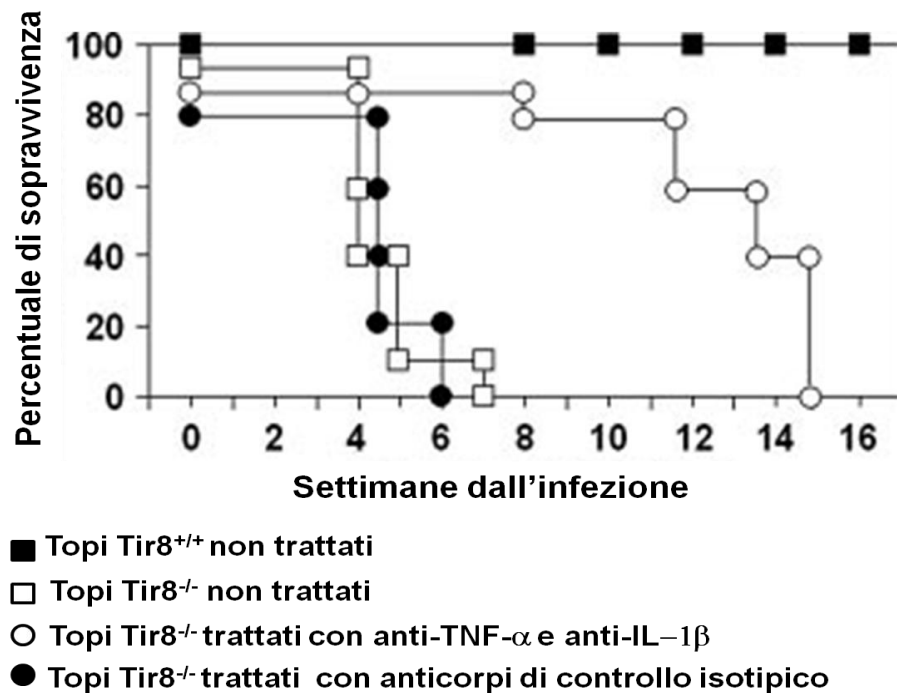


Figura 26: Curva di sopravvivenza di topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> infettati intranasalmente con  $2 \times 10^3$  CFU di Mtb e successivamente sottoposti a trattamento con anticorpi neutralizzanti le citochine pro-infiammatorie TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . I dati indicano la percentuale di sopravvivenza dei topi nel tempo.

Il trattamento dei topi Tir8<sup>-/-</sup> con gli anticorpi neutralizzanti IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  ne prolunga significativamente la sopravvivenza con solo il 20% di mortalità tra i topi trattati dopo 8 settimane, contro il 100% riscontrato in topi Tir8<sup>-/-</sup> non trattati, e il 60% di mortalità dopo 14 settimane di infezione (Fig. 26).

Questi risultati, quindi, indicano che in assenza del recettore Tir8 si sviluppa un'esacerbata risposta infiammatoria sistemica durante l'infezione con Mtb, con

elevati livelli di citochine pro-infiammatorie, quali IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , che causano necrosi epatica e conseguente mortalità.

Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo concluso che la carenza di entrambi i recettori D6 e Tir8 induce un aumento delle chemochine e delle citochine pro-infiammatorie circolanti, responsabili del richiamo massivo ed incontrollato di cellule immunocompetenti nei siti infiammati, delle esagerate risposte infiammatorie e dei danni tissutali.

## **Discussione**

## **Ruolo del recettore D6 nel controllo della risposta immunitaria e/o infiammatoria in corso di tubercolosi**

Una migliore comprensione dei meccanismi immunologici della protezione e della patogenesi è essenziale per poter disegnare nuovi vaccini e strategie immunoterapeutiche contro la tubercolosi.

La risposta protettiva verso il *M. tuberculosis* richiede la presenza di linfociti T CD4 e CD8, di citochine pro-infiammatorie quali IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e di macrofagi attivati (49).

La cooperazione tra cellule e citochine richiede una stretta interazione che è raggiunta dopo la migrazione cellulare e la formazione del granuloma nei polmoni.

La caratteristica dell'infezione polmonare è la formazione del granuloma, costituito dall'aggregazione di macrofagi, linfociti e cellule dendritiche, il quale serve a contenere fisicamente i micobatteri e a creare un microambiente per l'interazione cellulare, limitando così la crescita e la pericolosa disseminazione dell'Mtb. Le chemochine sono potenti attivatori leucocitari e chemoattraenti che intervengono positivamente nella formazione del granuloma, dimostrandosi così importanti nella risposta immunitaria nei confronti del *M. tuberculosis* (48).

Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che l'infezione con Mtb di macrofagi murini ottenuti dal midollo osseo induce l'espressione di TNF- $\alpha$ , così come di

parecchie chemochine, tra cui i ligandi per i recettori chemochinici CXCR3, CCR5, e CCR2. La neutralizzazione del TNF- $\alpha$  attraverso specifici anticorpi, o utilizzando macrofagi TNFR1-deficienti, ha dimostrato che l'espressione di alcune chemochine (CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL5/RANTES e CCL2) dopo l'infezione con *M. tuberculosis* dipende, almeno in parte, dal TNF- $\alpha$  stesso. Comunque, la mancanza di TNF- $\alpha$ , non azzerava del tutto l'espressione delle chemochine, indicando che vi sono sicuramente altri fattori, indotti dall'infezione, che stimolano la produzione delle chemochine (50).

In alcuni modelli murini l'espressione genica delle chemochine CXC e CC è stata trovata nei polmoni dopo infezione con Mtb (50, 73, 74). Topi CXCR3-deficienti (75) non riescono a formare granulomi dopo infezione via aerosol con *M. tuberculosis*, sebbene questo effetto sia transiente e caratteristico degli stadi più precoci dell'infezione.

Topi CCR2-deficienti si sono rivelati straordinariamente suscettibili a moderate o alte dosi di micobatterio somministrate per via endovenosa (76), e la suscettibilità all'Mtb sembra essere dose-dipendente (53). Al contrario, CCR5 (54) potrebbe non essere essenziale per lo sviluppo di una risposta protettiva nei confronti del micobatterio.

Infine, topi che non esprimono CCL2 non dimostrano un'aumentata suscettibilità al micobatterio al contrario di ciò che avviene in topi che lo overesprimono (55).

L'azione delle chemochine, altamente pleiotropica e ridondante, è finemente regolata dai "decoy receptors" (45) che internalizzano ed etichettano le chemochine per la degradazione intracellulare, ponendo così un freno alle risposte infiammatorie eccessive e al conseguente danno tissutale.

D6 è un "decoy receptor" che riconosce e lega la maggior parte di chemochine CC infiammatorie, implicando che esso giochi un ruolo chiave nella risoluzione delle risposte infiammatorie da loro indotte.

I risultati da noi ottenuti e pubblicati confermano questa ipotesi in un modello murino di infezione mucosale con *M. tuberculosis* e mostrano che topi privi del recettore D6 hanno un'esagerata risposta infiammatoria che li porta alla morte, nonostante la loro capacità di controllare efficacemente la carica batterica.

Dopo l'inoculo intranasale di una bassa dose di micobatterio ( $2 \times 10^3$  CFU), il 20% dei topi D6<sup>-/-</sup> muore all'ottava settimana di infezione, il 50% alla dodicesima e il 100% alla sedicesima, nonostante il completo controllo della crescita dei bacilli.

Il fenotipo dei topi D6<sup>-/-</sup> infettati è drammatico ed altamente riproducibile così come i dati riguardanti le CFU a 4, 8 e 12 settimane dall'infezione con *M. tuberculosis*.

La mortalità dei topi D6<sup>-/-</sup> coincide con una intensa risposta infiammatoria locale e sistemica che compromette soprattutto le funzioni epatica e renale dell'ospite, caratterizzata da un aumentato e sostenuto numero di macrofagi, di CD4 e CD8 e da un'aumentata produzione di chemochine CC e di citochine pro-infiammatorie, quali TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ .

Comunque, non siamo riusciti a trovare CFU micobatteriche nei reni di topi WT e D6<sup>-/-</sup> dopo 12 settimane di infezione.

Questo dato potrebbe spiegare il fatto che la crescita dell'Mtb rimane al di sotto di valori da noi rilevabili o che il danno renale si sviluppa in assenza di infezione al rene.

L'aumento nel numero dei macrofagi, delle DCs e delle cellule T è stato trovato anche nei linfonodi mediastinici, suggerendo la possibilità che più linfociti T vengano attivati e migrino nei linfonodi.

Quest'aumentata attivazione preferibilmente giustifica l'aumentato numero di linfociti T ritrovati nei polmoni dei topi D6<sup>-/-</sup> dopo l'infezione con Mtb, come confermato dai saggi ELISPOT che mostrano che significativamente più CD4 e



CD8 infiltranti i polmoni di topi D6<sup>-/-</sup> vengono indotti a produrre IFN- $\gamma$ , quando stimolati in vitro dalle DCs infettate con BCG.

Il fatto che topi D6<sup>-/-</sup> abbiano una reazione infiammatoria più esacerbata è interessante ed in modo convincente supporta l'ipotesi di un ruolo immunoregolatorio per il recettore D6.

Dati recenti hanno, inoltre, dimostrato come topi D6<sup>-/-</sup> instaurino esagerate risposte a stimoli infiammatori che determinano patologie cutanee infiammatorie molto aggressive, come per esempio ripetute somministrazioni di TPA (59).

Altri studi (67) hanno, invece, messo in evidenza come topi D6<sup>-/-</sup> mostrino una risposta esagerata all'iniezione sottocutanea di CFA.

Sfortunatamente, nessuno degli studi ad oggi effettuato, è stato capace di definire un meccanismo alla base delle aumentate risposte infiammatorie locali, come al TPA o al CFA, o sistemiche, come all'Mtb, nei topi D6<sup>-/-</sup> anche se quella maggiormente accreditata da noi e da molti altri ricercatori è che la mancanza del recettore D6 porti alla mancata rimozione delle chemochine CC da molti organi e tessuti, determinando così un aumento della loro concentrazione.

Tale aumentata espressione/circolazione di chemochine CC potrebbe, a sua volta, portarle ad interagire con i loro recettori segnalatori e ciò potrebbe avere come effetto quello di un maggiore afflusso di cellule immuni e di

un'abbondante ed incontrollata produzione di citochine pro-infiammatorie, le quali sarebbero al fine responsabili dei danni ai tessuti e agli organi.

L'aumentata espressione delle chemochine circolanti potrebbe anche essere causata dall'accumularsi di cellule negli organi infetti. Comunque, le concentrazioni di CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  e CCL5/RANTES sono state da noi trovate largamente incrementate nei lavaggi bronco alveolari e nel siero di topi D6<sup>-/-</sup> infettati con Mtb per molto tempo dopo l'infezione ed, inoltre, bloccando *in vivo* tutte e quattro le chemochine, attraverso ripetute iniezioni di un cocktail di anticorpi neutralizzanti, abbiamo ridotto significativamente il richiamo di cellule immunocompetenti nei polmoni, la produzione di chemochine e citochine pro-infiammatorie, il danno epatico e renale e, soprattutto, la mortalità dei topi D6<sup>-/-</sup> infettati con Mtb. Nonostante ciò, i topi D6<sup>-/-</sup> trattati con gli anticorpi neutralizzanti le chemochine infiammatorie, anche se con meno danni ai tessuti e agli organi e, di conseguenza, con una prolungata sopravvivenza, diventano più suscettibili all'infezione con Mtb, come dimostrato dalle più alte CFU nei polmoni a 8 e a 12 settimane dall'infezione.

I dati da noi riportati mostrano chiaramente come nessuna delle chemochine neutralizzate da sola spiega la ridotta risposta infiammatoria e la ridotta mortalità, né l'aumentata suscettibilità all'infezione. Le chemochine CCL2/MCP-

1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  e CCL5/RANTES sono tutti ligandi di CCR5, che può attrarre ed attivare macrofagi e linfociti Th1.

Studi effettuati su topi CCR5-deficienti hanno dimostrato che, sebbene CCR5 giochi un ruolo nella migrazione delle DCs a e dai linfonodi (54, 77), esso non è indispensabile per la formazione del granuloma e per la protezione immunitaria nei confronti dell'Mtb (77). Inoltre, topi CCL2-deficienti non mostrano alcuna aumentata suscettibilità all'Mtb (78) mentre topi CCR2-deficienti sono straordinariamente suscettibili a moderate o alte dosi di Mtb somministrate per endovena, ma non a basse dosi somministrate per aerosol (53).

Ciò dimostra la grande ridondanza presente nel sistema chemochinico. Difatti, le chemochine CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1  $\alpha$ , CCL4/MIP-1  $\beta$  e CCL5/RANTES sono tutti ligandi di CCR5, ma CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL5/RANTES possono anche interagire con CCR1 e CCR3.

Tutto ciò rende difficile comprendere i ruoli precisi di ciascuna chemochina e dei loro recettori.

Nel nostro caso, nonostante il potenziamento della risposta di tipo I o la capacità dei linfociti T di infiltrare i polmoni dei topi D6<sup>-/-</sup> rispetto ai topi WT, in tali topi non si hanno dei benefici sul controllo dell'infezione e dell'infiammazione, suggerendo che probabilmente esistono dei fattori

aggiuntivi che devono essere indotti per aumentare la capacità dell'ospite di eliminare il micobatterio.

In conclusione, i nostri studi suggeriscono un importante ruolo per il recettore D6 nella regolazione delle risposte immunitarie. D6 controlla l'accumulo delle chemochine e l'attività, la migrazione e, possibilmente, il mantenimento delle DCs e delle cellule T negli organi infettati, così come la produzione delle citochine pro-infiammatorie. Quindi D6, attraverso la sua capacità di eliminare l'eccesso di chemochine nei tessuti infiammati, sembra favorire la risoluzione delle risposte infiammatorie croniche e fornisce un meccanismo per il controllo ed il bilanciamento delle risposte immunoprotettive ed immunopatogene.

### **Ruolo del recettore Tir8 nel controllo della risposta immunitaria e/o infiammatoria in corso di tubercolosi**

I segnali citochinici che regolano la formazione del granuloma e la sua persistenza sono ancora poco conosciuti, sebbene i recettori IL-1R di tipo 1 (79) e TNFR1 ne siano i principali artefici (80, 81).

Il TNF- $\alpha$  è una citochina pro-infiammatoria molto potente, con un'ampia gamma di attività in entrambe le risposte infiammatoria ed immunitaria (82).

Il TNF- $\alpha$  è cruciale per la resistenza dell'ospite nei confronti delle infezioni da Mtb ed altri micobatteri (81, 83).

Topi TNF-deficienti infettati tramite aerosol con Mtb sviluppano risposte immunitarie cellulo-mediate normali nei confronti degli antigeni micobatterici (84), ma sono profondamente suscettibili all'infezione, morendo con un'estesa necrosi tissutale nei polmoni e negli organi infetti.

L'IL-1 è espressa nei macrofagi durante la tubercolosi (85) e macrofagi attivati dimostrano un'aumentata espressione di IL-1 $\beta$  (86, 87). Il trattamento con antagonisti di IL-1R è associato allo sviluppo del *M. avium* nei polmoni, accompagnato da un ridotto afflusso di cellule infiammatorie nel compartimento polmonare (88).

Topi IL-1R<sup>-/-</sup>, nei quali il segnale indotto dall'IL-1 è assente, muoiono in seguito all'infezione con Mtb, presentando un'esacerbata crescita micobatterica nel sito dell'infezione ed in organi distanti (49, 79) e topi IL-1 $\alpha\beta$  doppi knock-out (89) hanno un profondo difetto nella generazione della risposta protettiva precoce all'Mtb.

Comunque, sebbene la produzione di IL-1 e TNF- $\alpha$ , così come quella di altre citochine pro-infiammatorie, abbia un ruolo protettivo, se lasciata incontrollata potrebbe portare a malattie infiammatorie molto gravi e croniche (90, 91).

Riguardo l'infezione tubercolare, la produzione di elevate quantità di TNF- $\alpha$  determina severe infiammazioni polmonari e spleniche con morte precoce (92), e perfino le biglie rivestite di IL-1 sono capaci di indurre la formazione di grandi granulomi nel tessuto polmonare (93).

Sebbene i membri della superfamiglia dei TLR-IL-1R siano importanti nel riconoscimento dei prodotti microbici e nell'instaurarsi di appropriate risposte immunitarie o immunopatogene, la funzione dei recettori per citochine infiammatorie è strettamente regolata da inibitori che agiscono fuori e dentro la cellula (28, 60, 94, 95).

Studi recenti individuano Tir8 come regolatore negativo del segnale innescato da TLR-IL-R (27, 28, 60, 96, 97).

I risultati qui riportati dimostrano come topi Tir8<sup>-/-</sup> infettati intranasalmente con l'Mtb sviluppino un'esagerata risposta infiammatoria che li porta alla morte, nonostante la loro capacità di controllare efficientemente la crescita batterica.

In seguito all'inoculo intranasale di una bassa dose di Mtb ( $2 \times 10^3$  CFU), il 60% dei topi Tir8<sup>-/-</sup> muore dopo 6 settimane e il 100% già ad 8 settimane di infezione, anche se in assenza dell'espandersi della carica batterica nei vari organi esaminati, quali polmoni, milza e fegato.

La mortalità di questi topi coincide con un'esacerbata risposta infiammatoria nei polmoni, un aumentato numero di neutrofili e macrofagi infiltranti i polmoni in risposta all'Mtb ed un'aumentata produzione di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

Comunque, questa esagerata risposta infiammatoria non sembra influenzare lo sviluppo di una specifica risposta immunitaria, come dimostrato dal fatto che non è stata da noi riscontrata una significativa differenza tra topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> nel numero di cellule T CD4 e CD8 infiltranti i polmoni, nella quantità di IFN- $\gamma$  prodotto dalle cellule mononucleate presenti nei polmoni e nel numero di CD4 e CD8 attivati che producono IFN- $\gamma$  dopo essere stati stimolati *in vitro* dalle DCs irradiate ed infettate con BCG.

Dati recenti dimostrano che i topi Tir8<sup>-/-</sup> sono più suscettibili alla tossicità batterica dell'LPS (28) mentre altri (60) riportano che topi Tir8<sup>-/-</sup> con un differente background genetico hanno una normale suscettibilità alla tossicità sistemica dell'LPS anche se mostrano un'esagerata risposta infiammatoria intestinale al DSS.

Il risultato da noi ottenuto riguardante una maggiore risposta infiammatoria riscontrata a livello polmonare nei topi Tir8<sup>-/-</sup> infettati con Mtb supporta l'ipotesi di un ruolo immunoregolatorio per questo recettore.

Comunque, il grado di infiammazione presente nei polmoni ed il fatto che i topi Tir8<sup>-/-</sup> controllino efficientemente come i topi Tir8<sup>+/+</sup> la crescita dell'Mtb in

differenti organi, non spiega la loro precoce ed elevata mortalità che si accompagna ad un'estesa necrosi epatica e ad un incremento dei livelli sierici delle transaminasi, di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

Studi effettuati *in vitro* hanno ulteriormente confermato l'aumentata produzione di IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e di chemochine da parte delle DCs di topi Tir8<sup>-/-</sup> infettati con l'Mtb. Questo risultato, insieme all'osservazione che Tir8 è espresso dalle DCs immature (60), suggerisce queste ultime come sorgente di citochine infiammatorie.

E' probabile che siano proprio gli elevati livelli di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  riscontrati in topi Tir8<sup>-/-</sup> infettati con Mtb i principali artefici della necrosi epatica e della mortalità, come suggerito dal fatto che il trattamento *in vivo* con gli anticorpi neutralizzanti IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  ne prolunghi significativamente la sopravvivenza, con una mortalità del 20% dopo ben 8 settimane, punto sperimentale in cui la mortalità riscontrata tra i topi Tir8<sup>-/-</sup> senza alcun trattamento ed infettati con Mtb è del 100%.

Un lavoro precedentemente pubblicato (98), riporta come in topi CBA l'ingiuria epatica causata dal priming con BCG e dalla susseguente iniezione di LPS sia causata da varie citochine come TNF- $\alpha$  (99, 100) e IL-1 $\beta$  (101), e il trattamento dei topi con gli inibitori di entrambe le citochine attenui il danno epatico (102).



Infatti, il TNF- $\alpha$  esercita i suoi effetti citotossici direttamente sugli epatociti e stimola una serie di mediatori pro infiammatori tra cui NO, IL-1, IL-6 e IL-8 (91), che sono essenziali per l'infiammazione e il conseguente danno epatico.

Sebbene l'IL-1 stessa abbia pochi effetti diretti sul fegato, la sua aumentata produzione potrebbe stimolare molti tipi di cellule immunitarie ed infiammatorie a sintetizzare citochine, tra cui TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, che in seguito medierebbero l'ingiuria infiammatoria ed immunologica (90).

Oltre a questi effetti, l'IL-1 potrebbe agire sugli epatociti incrementandone l'espressione dell'mRNA per la iNOs e la generazione di NO, portando così al danno epatico (103).

Sebbene non si possa escludere la possibilità che l'espressione cellulo-specifica del TNF- $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  e/o dei loro recettori giochi un ruolo essenziale nell'indirizzare verso la protezione immunologica o la patologia, è la quantità relativa di TNF- $\alpha$  nei siti di infezione a determinare se la citochina risulti protettiva o distruttiva, come dimostrato nei topi infettati con basse o alte dosi di BCG ricombinante secernente TNF- $\alpha$  (92).

Infatti, topi WT riescono a controllare l'infezione tubercolare con basse o alte dosi di BCG ricombinante secernente TNF- $\alpha$ , mostrando comunque una diminuita sopravvivenza alle alte dosi.

Gli effetti del TNF- $\alpha$  richiedono, quindi, l'interazione segnalatoria con un recettore intatto, dal momento che i suoi effetti scompaiono in topi TNFR-deficienti infetti (92).

Inoltre, pur non trovando una significativa differenza tra topi Tir8<sup>+/+</sup> e Tir8<sup>-/-</sup> in termini di quantità di IFN- $\gamma$  prodotto dalle cellule mononucleate infiltranti i polmoni e il numero di linfociti T CD4 e CD8 attivati secernenti IFN- $\gamma$ , esiste la possibilità che l'IFN- $\gamma$  giochi un ruolo essenziale in questo modello, data la sua abilità nel sensibilizzare i macrofagi ed aumentare la produzione di citochine infiammatorie (104).

Evidenze sperimentali suggeriscono che Tir8, richiamato nei complessi dei recettori di segnale, possa agire da "decoy" intracellulare, intrappolando componenti chiave della cascata di trasduzione del segnale (27, 28, 96).

L'aumentata responsività in termini di produzione citochinica e l'aumentata severità dell'infiammazione epatica dei topi Tir8<sup>-/-</sup> confermano ulteriormente l'ipotesi che Tir8 sia una trappola molecolare per i componenti della cascata di trasduzione del segnale, in particolare per TNFR-associated factor (TRAF) 6 e IL-1R-associated kinase (IRAK) 1 (28).

A conferma di ciò, l'aumentata produzione di citochine pro-infiammatorie in pazienti con cirrosi avanzata sembra essere dovuta alla mancanza dell'induzione mieloide-specifica di IRAK1 (105).

In conclusione, i nostri studi suggeriscono un importante ruolo immunoregolatorio per Tir8 che, in virtù della sua capacità di limitare la produzione in eccesso di citochine pro-infiammatorie, previene l'eccessivo danno tissutale, ponendo un freno allo sviluppo di pericolose reazioni patogene a partire da normali risposte immunitarie protettive.

## Bibliografia

- 1- Hooks J., Cytokines, Chemokines and Adhesion molecules. In Manual of Clinical Immunology, VI ed., Rose NR, Hamilton RG, Detrick B (eds), ASM, Washington DC, 2002; 319-375
- 2- Kaushansky K., Hematopoietic Growth Factors, signaling and chronic myeloproliferative disorders. Cytokine Growth Factor Rev. 2006; 17(6): 423-30.
- 3- Aggarwal B.B., Puri R.K., Common and uncommon features of cytokines and cytokine receptors: an overview. In Human cytokines: their role in disease and therapy. Blackwell Sci., Cambridge Mass., 1995; 3-24.
- 4- Curfs JHAJ, Meis JFGH, Hoogkamp-Korstanje JAA., A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers. Clin. Microbiol. Rev. 1997; 10(4): 742-780.
- 5- Rossi D. and Zlotnik A., The biology of chemokines and their receptors, Annu. Rev. Immunol. 2000; 18: 217-242.
- 6- Alessi D.R. and Downes C.P., The role of PI 3-kinase in insulin action. Biochim. Biophys. Acta 1998; 1436(1-2): 151-164.

- 7- Cabrera-Vera T.M., Vanhauwe J., Thomas T.O., Medkova M., Preininger A., Mazzoni M.R., Hamm H.E., Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.*, 2003; 24(6): 765-781.
- 8- Youn B.S., Yu K.Y., Oh J., Lee J., Lee T.H., Broxmeyer H.E., Role of the CC chemokine receptor 9/TECK interaction in apoptosis. *Apoptosis*, 2002; 7(3): p. 271-276.
- 9- Rollins B.J., Chemokines. *Blood*, 1997; 90(3): 909-928.
- 10- Murphy P. M., Baggiolini M., Charo I. F., Hebert C. A., Horuk R., Matsushima K., Miller L. H., Oppenheim J. J. and Power C. A., International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.*, 2000; 52(1): 145-176.
- 11- Mantovani A., Locati M., Vecchi A., Sozzani S., Allavena P., Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol.* 2001; 22(6): 328-336.
- 12- Nibbs R., Graham G., Rot A., Chemokines on the move: control by the chemokine “interceptors” Duffy blood group antigen and D6. *Semin. Immunol.* 2003; 15(5): 287-294.
- 13- Ahuja S. K., Gao J. L. and Murphy P. M., Chemokine receptors and molecular mimicry. *Immunol. Today*, 1994; 15(6): 281-287.

- 14- Nibbs R.J., Wylie S.M., Pragnell I.B., Graham G.J., Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three other related macrophage inflammatory protein- 1alpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272(19): 12495-12504.
- 15- Maho A., Bensimon A., Vassart G., Parmentier M., Mapping of the CCXCR1, CX3CR1, CCBP2 and CCR9 genes to the CCR cluster within the 3p21.3 region of the human genome. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1999; 87(3-4): 265-268.
- 16- Farzan M., Choe H., Martin K.A., Sun Y., Sidelko M., Mackay C.R., Gerard N.P., Sodroski J., Gerard C., HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1beta-mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR5. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272(11): 6854-6857.
- 17- Savarese T.M. and Fraser C.M., In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem. J.*, 1992; 283( Pt 1): 1-19.
- 18- Garlanda C., Maina V., Martinez de la Torre Y., Nebuloni M., Locati M., Inflammatory reaction and implantation: the new entries PTX3 and D6. *Placenta* 29 (Suppl. B), 2008; 129-134.
- 19- Nibbs R.J., Yang J., Landau N.R., Mao J.H., Graham G.J., LD78beta, a non-allelic variant of human MIP-1alpha (LD78alpha), has enhanced receptor

interactions and potent HIV suppressive activity. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274(25): 17478-17483.

20- Galliera E., Jala V.R., Trent J.O., Bonecchi R., Signorelli P., Lefkowitz R.J., Mantovani A., Locati M., Haribabu B., beta-Arrestin-dependent constitutive internalization of the human chemokine decoy receptor D6. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(24): 25590-25597.

21- Graham G.J., D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. *Eur. J. Immunol.*, 2009; 39(2): 342-351.

22- Weber M., Blair E., Simpson C.V., O'Hara M., Blackburn P.E., Rot A., Graham G.J., Nibbs R.J., The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines. *Mol. Biol. Cell*, 2004; 15(5): 2492-2508.

23- Blackburn P.E., Simpson C.V., Nibbs R.J., O'Hara M., Booth R., Poulos J., Isaacs N.W., Graham G.J., Purification and biochemical characterization of the D6 chemokine receptor. *Biochem. J.*, 2004; 379 (Pt 2): 263-272.

24- Liu L., Huang D., Matsui M., He T.T., Hu T., Demartino J., Lu B., Gerard C., Ransohoff R.M., Severe disease, unaltered leukocyte migration and reduced IFN-gamma production in CXCR3<sup>-/-</sup> mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 2006; 176(7): 4399-4409.

- 25- Wu F.Y., Ou Z.L., Feng L.Y, Luo J.M., Wang L.P., Shen Z.Z., Shao Z.M., Chemokine decoy receptor D6 plays a negative role in human breast cancer. *Mol. Cancer Res.*, 2008; 6(8): 1276-1288.
- 26- Mantovani A., Locati M., Polentarutti N., Vecchi A., Garlanda C., Extracellular and intracellular decoys in the tuning of inflammatory cytokines and Toll-like receptors: the new entry TIR8/SIGIRR. *J. Leukoc. Biol.*, 2004; 75(5): 738-742.
- 27- Polentarutti N., Rol G.P., Muzio M., Bosisio D., Camnasio M., Riva F., Zoja C., Benigni A., Tomasoni S., Vecchi A., Garlanda C., Mantovani A., Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8/SIGIRR. *Eur. Cytokine Netw.*, 2003; 14(4): 211-218.
- 28- Wald D., Qin J., Zhao Z., Qian Y., Naramura M., Tian L., Towne J., Sims J.E., Stark G.R., Li X., SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat. Immunol.*, 2003; 4(9): 920-927.
- 29- Garlanda C., Riva F., Veliz T., Polentarutti N., Pasqualini F., Radaelli E., Sironi M., Nebuloni M., Zorini E.O., Scanziani E., Mantovani A., Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family. *Cancer Res.*, 2007; 67(13): 6017-6021.
- 30- Garlanda C., Di Liberto D., Vecchi A., La Manna M.P., Buracchi C., Caccamo N., Salerno A., Dieli F., Mantovani A., Damping excessive



inflammation and tissue damage in *Mycobacterium tuberculosis* infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling. *J. Immunol.*, 2007; 179(5): 3119-3125.

31- Romani L., Puccetti P., Controlling pathogenic inflammation to fungi. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2007; 5(6): 1007-1017.

32- Bozza S., Zelante T., Moretti S., Bonifazi P., De Luca A., D'Angelo C., Giovannini G., Garlanda C., Boon L., Bistoni F., Puccetti P., Mantovani A., Romani L., Lack of Toll IL-1R8 exacerbates Th17 cell responses in fungal infection. *J. Immunol.*, 2008; 180(6): 4022-4031.

33- Lech M., Kulkarni O.P., Pfeiffer S., Savarese E., Krug A., Garlanda C., Mantovani A., Anders H.J., Tir8/SIGIRR prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens, *J. Exp. Med.*, 2008; 205(8): 1879-1888.

34- Marshak-Rothstein A. and Rifkin I.R., Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007; 25: 419-441.

35- Lau C.M., Broughton C., Tabor A.S., Akira S., Flavell R.A., Mamula M.J., Christensen S.R., Shlomchik M.J., Viglianti G.A., Rifkin I.R., Marshak-Rothstein A., RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell

antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J. Exp. Med.*, 2005; 202(9): 1171-1177.

36- Boulè M.W., Broughton C., Mackay F., Akira S., Marshak-Rothstein A., Rifkin I.R., Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J. Exp. Med.*, 2004; 199(12): 1631-1640.

37- Pawar R.D., Ramanjaneyulu A., Kulkarni O.P., Lech M., Segerer S., Anders H.J., Inhibition of Toll-like receptor-7 [TLR-7] or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2007; 18(6): 1721-1731.

38- Christensen S.R., Shupe J., Nickerson K., Kashgarian M., Flavell R.A., Shlomchik M.J., Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity*, 2006; 25 (3): 417-428.

39- Subramanian S., Tus K., Li Q.Z., Wang A., Tian X.H., Zhou J., Liang C., Bartov G., McDaniel L.D., Zhou X.J., Schultz R.A., Wakeland E.K., A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006; 103(26): 9970-9975.

40- Wu X. and Peng S.L., Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus. *Arthritis Rheum.*, 2006; 54(1): 336-342.

- 41- Flynn J.L. and Chan J., Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001; 19: 93-129.
- 42- Feng C.G., Bean A.G., Hooi H., Briscoe H., Britton W.J., Increase in gamma interferon-secreting CD8<sup>+</sup>, as well as CD4<sup>+</sup>, T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 1999; 67(7): 3242-3247.
- 43- Orme I.M., The immunopathogenesis of tuberculosis: a new working hypothesis. *Trends Microbiol.*, 1998; 6(3): 94-97.
- 44- Nathan C., Points of control in inflammation. *Nature*, 2002; 420 (6917): 846-852.
- 45- Mantovani A., The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today*, 1999; 20(6): 254-257.
- 46- Roach D.R., Briscoe H., Saunders B., France M.P., Riminton S., Britton W.J., Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J. Exp. Med.*, 2001; 193(2): 239-246.
- 47- Bean A.G., Roach D.R., Briscoe H., France M.P., Korner H., Sedgwick J.D., Britton W.J., Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J. Immunol.*, 1999; 162(6): 3504-3511.

- 48- Algood H.M., Chan J., Flynn J.L., Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2003; 14(6): 467-477.
- 49- Kaufmann S.H., How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat. Rev. Immunol.*, 2001; 1(1): 20-30.
- 50- Algood H.M., Lin P.L., Yankura D., Jones A., Chan J., Flynn J.L., TNF influences chemokine expression of macrophages in vitro and that of CD11b<sup>+</sup> cells in vivo during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.*, 2004; 172(11): 6846-6857.
- 51- Seiler P., Aichele P., Bandermann S., Hauser A.E., Lu B., Gerard N.P., Gerard C., Ehlers S., Mollenkopf H.J., Kaufmann S.H., Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *Eur. J. Immunol.*, 2003; 33(10): 2676-2686.
- 52- Peters W., Scott H.M., Chambers H.F., Flynn J.L., Charo I.F., Ernst J.D., Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001; 98(14): 7958-7963.
- 53- Scott H.M. and Flynn J.L., *Mycobacterium tuberculosis* in chemokine receptor 2-deficient mice: influence of dose on disease progression. *Infect. Immun.*, 2002; 70(11): 5946-5954.

- 54- Algood H.M. and J.L. Flynn, CCR5-deficient mice control *Mycobacterium tuberculosis* infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. *J. Immunol.*, 2004; 173 (5): 3287-3296.
- 55- Rutledge B.J., Rayburn H., Rosenberg R., North R.J., Gladue R.P., Corless C.L., Rollins B.J., High level monocyte chemoattractant protein-1 expression in transgenic mice increases their susceptibility to intracellular pathogens. *J. Immunol.*, 1995; 155(10): 4838-4843.
- 56- Chensue S.W., Warmington K.S., Allenspach E.J., Lu B., Gerard C., Kunkel S.L., Lukacs N.W., Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *J. Immunol.*, 1999; 163(4): 165-173.
- 57- Martinez de la Torre Y., Locati M., Buracchi C., Dupor J., Cook D.N., Bonecchi R., Nebuloni M., Rukavina D., Vago L., Vecchi A., Lira S.A., Mantovani A., Increased inflammation in mice deficient for the chemokine decoy receptor D6. *Eur. J. Immunol.*, 2005; 35(5): 1342-1346.
- 58- Nibbs R.J., Gilchrist D.S., King V., Ferra A., Forrow S., Hunter K.D., Graham G.J., The atypical chemokine receptor D6 suppresses the development of chemically induced skin tumors. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117(7): 1884-1892.

- 59- Jamieson T., Cook D.N., Nibbs R.J.B., Rot A., Nixon C., Mclean P., Alcami A., Lira S.A., Wiekowski M. and Graham G.J., The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response *in vivo*. *Nat. Immunol.*, 2005; 6(4): 403–411.
- 60- Garlanda C., Riva F., Polentarutti N., Buracchi C., Sironi M., De Bortoli M., Muzio M., Bergottini R., Scanziani E., Vecchi A., Hirsch E and Mantovani A., Intestinal inflammation in mice deficient in TIR8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101(10): 3522–3526.
- 61- Snewin V.A., Gares M.P., O' Gaora P., Hasan Z., Brown I.N. and Young D.B., Assessment of immunity to Mycobacterial infection with luciferase reporter constructs. *Infection and Immunity*, 1999; 67(9): 4586-4593.
- 62- Dieli F., Ivanyi J., Marsh P., Williams A., Naylor I., Sireci G., Caccamo N., Di Sano C. and Salerno A., Characterization of lung  $\gamma\delta$  T cells following intranasal infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J. Immunol.*, 2003; 170(1): 463–469.
- 63- Lazarevic V., Myers A.J., Scanga C.A. and Flynn J.L., CD40, but not CD40L, is required for the optimal priming of T cells and control of aerosol *M. tuberculosis* infection. *Immunity*, 2003; 19(6): 823–835 .
- 64- Dieli F., Caccamo N., Meraviglia S., Ivanyi J., Sireci G., Bonanno C.T., Ferlazzo V., La Mendola C. and Salerno A., Reciprocal stimulation of  $\gamma\delta$  T cells

and dendritic cells during the anti-mycobacterial immune response. *Eur. J. Immunol.*, 2004; 34 (11): 3227–3235.

65- Buccheri S., Reljic R., Caccamo N., Ivanyi J., Singh M., Salerno A. and Dieli F., IL-4 depletion enhances host resistance and passive IgA protection against tuberculosis infection in BALB/c mice. *Eur. J. Immunol.*, 2007; 37(3): 729–737.

66- Sireci G., Russo D., Dieli F., Porcelli S.A., Taniguchi M., La Manna M.P., Di Liberto D., Scarpa F. and Salerno A., Immunoregulatory role of J $\alpha$ 281 T cells in aged mice developing lupus-like nephritis. *Eur. J. Immunol.*, 2007; 37(2): 425–433 .

67- Martinez de la Torre Y., Locati M., Buracchi C., Dupor J., Cook D.N., Bonecchi R., Nebuloni M., Rukavina D., Vago L., Vecchi A., Lira S.A. and Mantovani A., Increased inflammation in mice deficient for the chemokine decoy receptor D6. *Eur. J. Immunol.*, 2005; 35(5): 1342–1346.

68- Martinez de la Torre Y. , Buracchi C., Borroni E.M., Dupor J., Bonecchi R., Nebuloni M., Pasqualini F., Doni A., Agostinis C., Bulla R., Cook D.N., Haribabu B., Meroni P., Rukavina D., Vago L., Tedesco F., Vecchi A., Lira S.A., Locati M. and Mantovani A. Protection against inflammation- and

autoantibody-caused fetal loss by the chemokine decoy receptor D6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2007; 104(7): 2319–2324.

69- Dieli F., Taniguchi M., Kronenberg M., Sidobre S., Ivanyi J., Fattorini L., Iona E., Orefici G., De Leo G., Russo D., Caccamo N., Sireci G., Di Sano C. and Salerno A., An anti-inflammatory role for V $\alpha$ 14 NKT cells in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin-infected mice. J. Immunol., 2003; 171(4): 1961–1968.

70- Di Liberto D., Locati M., Caccamo N., Vecchi A., Meraviglia S., Salerno A., Sireci G., Nebuloni M., Caceres N., Cardona P.J., Dieli F. and Mantovani A., Role of the chemokine decoy receptor D6 in balancing inflammation, immune activation, and antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* infection. J. Exp. Med., 2008; 205(9): 2075–2084.

71- Adams L. B., Mason C. M., Kolls J. K., Scollar D., Krahenbuhl J. L. and Nelson S., Exacerbation of acute and chronic murine tuberculosis by administration of a tumor necrosis receptor-expressing adenovirus. J. Infect. Dis., 1995; 171(2): 400–405.

72- Algood H.M., Lin P.L. and Flynn J. L., Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. Clin. Infect. Dis., 2005; 41 (3): S189–S193.

73- Sadek M.I. , Sada E., Toossi Z., Schwander S.K. and Rich E.A., Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria



and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1998; 19(3): 513–521.

74- Rhoades E.R., Cooper A.M. and Orme I.M., Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 1995; 63(10): 3871–3877.

75- Seiler P., Aichele P., Bandermann S., Hauser A.E., Lu B., Gerard N.P., Gerard C., Ehlers S., Mollenkopf H.J. and Kaufmann S.H., Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *Eur. J. Immunol.*, 2003; 33(10): 2676–2686.

76- Peters W., Scott H.M., Chambers H.F., Flynn J.L., Charo I.F. and Ernst J.D., Chemokine receptors 2 serve an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001; 98(14): 7958–7963.

77- Badewa A.P., Quinton L.J., Shellito J.E. and Mason C.M., Chemokine receptor 5 and its ligands in the immune response to murine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2005; 85(3): 185–195.

78- Lu B., Rutledge B.J., Gu L., Fiorillo J., Lukacs N.W., Kunkel S.L., North R., Gerard C. and Rollins B.J., Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 1998; 187(4): 601 – 608.

- 79- Juffermans N. P., Florquin S., Camoglio L., Verbon A., Kolk A. H., Speelman P., van Deventer S. J. and van Der Poll T., Interleukin-1 signaling is essential for host defence during murine pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, 2000; 182(3): 902–908.
- 80- Kindler V., Sappino A. P., Grau G. E., Piguet P. F. and Vassalli P., The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*, 1989; 56(5): 731–740.
- 81- Flynn J. L., Goldstein M. M., Chan J., Triebold K. J., Pfeffer K., Lowenstein C. J., Schreiber R., Mak T.W. and Bloom B.R., Tumor necrosis factor- $\alpha$  is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*, 1995; 2(6): 561–572.
- 82- Sedgwick J.D., Riminton D. S., Cyster J. G. and Korner H., Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol. Today*, 2000; 21(3): 110–113.
- 83- Bean A.G., Roach D.R., Briscoe H., France M. P., Korner H., Sedgwick J.D. and Britton W.J., Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J. Immunol.*, 1999; 162(6): 3504–3511.

- 84- Roach D. R., Briscoe H., Saunders B., France M.P., Riminton S. and Britton W.J., Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J. Exp. Med.*, 2001; 193(2): 239-246.
- 85- Chensue S.W., Warmington K.S., Berger A.E. and Tracey D.E., Immunohistochemical demonstration of interleukin-1 receptor antagonist protein and interleukin-1 in human lymphoid tissue and granulomas. *Am. J. Pathol.*, 1992; 140(2): 269-275.
- 86- Jovanovic D. V., J. A. Di Battista, J. Martel-Pelletier, F. C. Jolicoeur, Y. He, M. Zhang, F. Mineau, and J. P. Pelletier. 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- $\beta$  and TNF- $\alpha$ , by human macrophages. *J. Immunol.* 160: 3513-3521.
- 87- Perera P.Y., Qureshi N., Christ W.J., Stutz P. and Vogel S.N., Lipopolysaccharide and its analogue antagonists display differential serum factor dependencies for induction of cytokine genes in murine macrophages. *Infect. Immun.*, 1998; 66(6): 2562-2569.
- 88- Denis M. and Ghadirian E., Interleukin-1 is involved in mouse resistance to *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.*, 1994; 62(2): 457-461.
- 89- Yamada H., Mizuno S., Horai R. and Iwakura Y., Sugawara I. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 $\alpha/\beta$  double-knocked mice. *Lab. Invest.*, 2000; 80(5): 759-767.

- 90- Dinarello C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 1996; 87(6): 2095–2147.
- 91- Beutler B. and Cerami A., Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu. Rev. Biochem.*, 1988; 57: 505–518.
- 92- Bekker L.G., Moreira A.L., Bertgold A., Freeman S., Ryffel B. and Kaplan G., Immunopathologic effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect. Immun.*, 2000; 68(12): 6954–6961.
- 93- Kasahara K., Kobayashi K., Shikama Y., Yoneya I., Soezima K., Ide H. and Takahashi T., Direct evidence for granuloma inducing activity of interleukin-1: induction of experimental pulmonary granuloma formation in mice by interleukin-1– coupled beads. *Am. J. Pathol.*, 1988; 130(3): 629–638.
- 94- Liew F.Y., Xu D., Brint E.K. and O’Neill L.A., Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005; 5(6): 446–458.
- 95- Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A. and Locati M., The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, 2004; 25(12): 677–686.

- 96- Qin J., Qian Y., Yao J., Grace C. and Li X., SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280(26): 25233–25241.
- 97- Xiao H., Gulen M. F., Qin J., Yao J., Bulek K., Kish D., Altuntas C. Z., Wald D., Ma C., Zhou H., Tuohy V. K., Fairchild R. L., de la Motte C., Cua D., Vallance B.A. and Li X., The Toll-Interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. *Immunity*, 2007; 26(4): 461–475.
- 98- Ferluga J., Tuberculin hypersensitivity hepatitis in mice infected with *Mycobacterium bovis* (BCG). *Am. J. Pathol.*, 1981; 105(1): 82–90.
- 99- Nagakawa J., Hishinuma I., Hirota K., Miyamoto K., Yamanaka T., Tsukidate K., Katayama K. and Yamatsu I., Involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathogenesis of activated macrophage-mediated hepatitis in mice. *Gastroenterology*, 1990; 99(3): 758–765.
- 100- Tsuji H., Harada A., Mukaida N., Nakanuma Y., Bluethmann H., Kaneko S., Yamakawa K., Nakamura S. I., Kobayashi K. I. and Matsushima K., Tumor necrosis factor receptor p55 is essential for intrahepatic granuloma formation and hepatocellular apoptosis in a murine model of bacterium induced fulminant hepatitis. *Infect. Immun.*, 1997; 65(5): 1892–1898.

- 101- Fujioka N., Mukaida N., Harada A., Akiyama M., Kasahara T., Kuno K., Ooi A., Mai M. and Matsushima K., Preparation of specific antibodies against murine IL-1ra and the establishment of IL-1ra as an endogenous regulator of bacteria-induced fulminant hepatitis in mice. *J. Leukocyte Biol.*, 1995; 58(1): 90-98.
- 102- Yao H. W. and Yue L., Effect and mechanisms of FR167653, a dual inhibitor of TNF- $\alpha$  and IL-1, on BCG plus LPS induced-liver injury. *Inflamm. Res.*, 2005; 54(11): 471-477.
- 103- Nussler A.K. and Billiar T.R., Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukocyte Biol.*, 1993; 54(2): 171-178.
- 104- Fenton M.J. and Vermeulen M.W., Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect. Immun.*, 1996; 64(3): 683-690.
- 105- Tazi K.A., Quioc J.J., Saada V., Bezeaud A., Lebrec D. and Moreau R., Upregulation of TNF- $\alpha$  production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: possible role of Akt and IRAK-M. *J. Hepatol.* 2006; 45(2): 280-289.

Tesi cofinanziata dal Fondo Sociale Europeo  
PROGRAMMA OPERATIVO NAZIONALE 2000-2006  
“Ricerca Scientifica, Sviluppo Tecnologico, Alta Formazione”  
Misura III.4. “Formazione Superiore e Universitaria” - Dottorati  
di Ricerca