



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.  
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
IMMUNOLOGIA E BIOTECNOLOGIE APPLICATE

XXI CICLO

Immunità innata e tubercolosi:  
identificazione di ligandi molecolari coinvolti nella risposta  
antitubercolare e generazione di liposomi contenenti lipidi bioattivi ad  
attività immunomodulante

Dott.ssa Emanuela Greco

A.A. 2008/2009

Docente Guida: Prof. Maurizio Fraziano

Coordinatore: Prof. Paolo Rossi

*A mamma, papà e Vale*

*A Danilo*

# INDICE

- *Abbreviazioni*
- *Lista delle parole chiave*
- *Lista delle pubblicazioni*
- *Brevetti*
- *Riassunto*

## 1. INTRODUZIONE

- 1.1. *Cenni storici*
- 1.2. *La tubercolosi nel mondo*
- 1.3. *M. tuberculosis*
  - 1.3.1. *Parete cellulare*
- 1.4. *Risposta immunitaria verso M. tuberculosis*
- 1.5. *Immunopatogenesi della tubercolosi*
- 1.6. *Immunità innata e tubercolosi*
  - 1.6.1. *Cellule epiteliali alveolari*
  - 1.6.2. *Macrofagi alveolari*
- 1.7. *Sequenze oligodeossinucleotidiche caratterizzate da motivi CpG*
- 1.8. *Acido fosfatidico (PA)*
- 1.9. *Acido lisofosfatidico (LPA)*
- 1.10. *Sfingosina 1-fosfato (SIP)*
- 1.11. *Scopo della tesi*

## 2. MATERIALI E METODI

- 2.1. *Batteri*
- 2.2. *Colture cellulari*
- 2.3. *Preparazione di liposomi asimmetrici e analisi citofluorimetrica*
- 2.4. *RT-PCR*
- 2.5. *Analisi della tossicità*
- 2.6. *Analisi fluorimetrica per il rilevamento dei flussi di Ca<sup>++</sup>*
- 2.7. *Analisi dell'attività della PLD*
- 2.8. *Western blotting*
- 2.9. *Protocollo d'infezione e valutazione della crescita di M. tuberculosis*
- 2.10. *Microscopia confocale a fluorescenza*
- 2.11. *Quantificazione dei micobatteri endogeni in cellule di lavaggio broncoalveolare di pazienti con tubercolosi*
- 2.12. *Infezione in vivo e analisi istologica*
- 2.13. *Analisi statistica*

## 3. RISULTATI

- 3.1. *Ruolo del CpG nella risposta immunitaria antitubercolare in cellule monocito-macrofagiche*
  - 3.1.1. *CpG induce un aumento del Ca<sup>++</sup> intracellulare in cellule THP-1*
  - 3.1.2. *CpG attiva la PLD Ca<sup>++</sup>-dipendente*
  - 3.1.3. *CpG favorisce la maturazione del fagolisosoma contenente MTB*
  - 3.1.4. *CpG determina un incremento dell'attività micobattericida nei monociti mediante il coinvolgimento della PLD*
- 3.2. *Ruolo del CpG nella risposta immunitaria antitubercolare in cellule epiteliali alveolari*
  - 3.2.1. *CpG attiva la PLD in cellule A549*
  - 3.2.2. *CpG favorisce la maturazione del fagolisosoma contenente MTB*
  - 3.2.3. *CpG determina un incremento dell'attività micobattericida mediante il coinvolgimento della PLD*

- 3.3. *Ruolo di LPA nella risposta immunitaria antitubercolare in cellule monocito-macrofagiche*
  - 3.3.1. *LPA attiva la PLD Ca<sup>++</sup> -dipendente*
  - 3.3.2. *LPA favorisce la maturazione del fagolisosoma contenente MTB*
  - 3.3.3. *LPA determina un incremento dell'attività micobattericida mediante il coinvolgimento della PLD*
  - 3.3.4. *LPA induce attività micobattericida ex vivo*
- 3.4. *Ruolo di LPA e SIP nella risposta immunitaria antitubercolare in cellule epiteliali alveolari*
  - 3.4.1. *LPA e SIP sono citoprotettive e riducono la crescita intracellulare di MTB in cellule A549*
  - 3.4.2. *LPA e SIP inducono un'attivazione della PLD Ca<sup>++</sup> -dipendente*
  - 3.4.3. *LPA e SIP inducono maturazione del fagolisosoma attraverso l'attivazione della PLD*
  - 3.4.4. *LPA e SIP inducono inibizione della crescita intracellulare di MTB attraverso l'attivazione della PLD e la maturazione del fagolisosoma*
  - 3.4.5. *La stimolazione con i lisofosfolipidi di cellule epiteliali alveolari infettate con MTB riduce in vitro il rilascio e la disseminazione micobatterica verso i macrofagi*
  - 3.4.6. *Il trattamento con SIP riduce la crescita micobatterica polmonare in topi aerogenicamente infettati con M. tuberculosis*
- 3.5. *Generazione di liposomi bioattivi coinvolti nella risposta antimicobatterica*
  - 3.5.1. *Produzione di liposomi asimmetrici*
  - 3.5.2. *I liposomi PS/PA sono efficientemente fagocitati dai macrofagi*
  - 3.5.3. *I liposomi PS/PA riducono la produzione di citochine proinfiammatorie nei macrofagi*
  - 3.5.4. *I liposomi PS/PA inducono la mobilizzazione del calcio intracellulare nei macrofagi umani*
  - 3.5.5. *I liposomi PS/PA promuovono la maturazione del fagolisosoma*
  - 3.5.6. *I liposomi PS/PA inducono attività micobattericida nei macrofagi*
  - 3.5.7. *La maturazione del fagolisosoma è coinvolta nell'uccisione intracellulare di MTB indotta dai liposomi PS/PA*

#### **4. DISCUSSIONE**

#### **5. RINGRAZIAMENTI**

#### **6. BIBLIOGRAFIA**

#### **7. PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE**

## • **Abbreviazioni**

**TB**, tubercolosi; **MTB**, *Mycobacterium tuberculosis*; **DTH**, Delayed-Type Hypersensitivity; **BCG**, Bacillo di Calmette-Guerin; **WHO**, World Health Organization; **HIV**, virus dell'immunodeficienza umana; **AIDS**, sindrome da immunodeficienza acquisita; **MDR-TB**, Multi Drug Resistant tuberculosis; **XDR-TB**, eXtensively Drug Resistant tuberculosis; **LAM**, lipoarabinomannano; **LM**, lipomannano; **MCP**, Monocyte Chemoattractant Protein; **IL**, interleuchina; **iNOS**, ossido nitrico sintasi inducibile; **TLR**, Toll-Like Receptor; **ManLAM**, Mannose-capped LAM; **PILAM**, PhosphoInositide-capped LAM; **AraLAM**, Arabinofuransyl-terminated LAM; **TNF- $\alpha$** , fattore di necrosi tumorale  $\alpha$ ; **PLD**, fosfolipasi D; **APC**, cellule presentanti l'antigene; **MHC**, maggior complesso d'istocompatibilità; **Th**, linfocita T helper; **IFN- $\gamma$** , interferone- $\gamma$ ; **TAP**, trasportatore associato alla processazione dell'antigene; **CMI**, immunità cellulo-mediata; **PAMP**, Pathogen Associated Molecular Pattern; **PI3K**, fosfoinositolo-3-chinasi; **NF- $\kappa$ B**, Nuclear Factor- $\kappa$ B; **MMR**, recettore macrofagico per il mannosio; **FcR**, recettore per il frammento Fc; **CR**, recettore per il complemento; **ROI**, reattivi intermedi dell'ossigeno; **LAMP**, proteina di membrana associata ai lisosomi; **RNI**, intermedi reattivi dell'azoto; **NO**, ossido nitrico; **TGF- $\beta$** , Transforming Growth Factor- $\beta$ ; **TACO**, Tryptophane Aspartate-containing Coat Protein; **PMSF**, PhenylMethylSulphonyl Fluoride; **IAA**, Indole Acetic Acid; **HRP**, HorseRadish Peroxidase; **ECL**, Enhanced ChemiLuminescence; **ATP**, adenosin trifosfato; **S1P**, sfingosina 1-fosfato; **CpG**, Cytosine-phosphate-Guanine; **GpC**, Guanine-phosphate-Cytosine; **PA**, acido fosfatidico; **PC**, fosfatidil-colina; **PLA**, fosfolipasi A; **PLC**, fosfolipasi C; **PI4K**, fosfatidil-inositolo-4-chinasi; **DAG**, diacil-glicerolo; **PKC**, protein kinasi C; **PI4,5K**, fosfatidilinositol 4-fosfato 5-chinasi; **LPA**, acido lisofosfatidico; **MAG**, monoacilglicerolo; **Lyso-PC**, lisofosfatidilcolina; **EDG**, Endothelial Differentiation Gene; **GPCR**, recettori transmembrana accoppiati alle proteine G; **cAMP**, adenosin-monofosfato-ciclico; **PDGF**, fattore di crescita delle piastrine; **FBS**, siero bovino fetale; **LPS**, liposaccaride; **ERK**, chinasi regolata dai segnali extracellulari; **LDL**, Low Density Lipoprotein; **HDL**, High Density Lipoprotein; **BAL**, Broncho Alveolar Lavage; **ADC**, Albumina, Destrosio, Catalasi; **PBS**, Phosphate Buffer Saline, **OADC**, acido oleico destrosio catalasi; **CFU**, unità formanti colonia; **dTHP-1**, THP-1 differenziate; **PMA**, forbolo12-miristato 13-acetato; **PS**, fosfatidilserina; **MTT**, 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil tetrazolio bromide; **SDH**, succinato deidrogenasi; **MOI**, molteplicità d'infezione; **Cq**, cloroquina; **NH<sub>4</sub>Cl**, cloruro d'ammonio; **PetOH**, fosfatidiletanolo; **Et-OH**, etanolo; **But-OH**, butanolo; **HBHA**, Heparin Binding HemAgglutinin.

## • **Lista delle parole chiave**

Tubercolosi, *Mycobacterium tuberculosis*, Immunità innata, Interazione ospite-patogeno, sequenze oligodeossinucleotidiche CpG, Acido lisofosfatidico, Sfingosina 1-fosfato, Acido fosfatidico, liposomi.

## • Lista delle pubblicazioni

1. Garg SK, Valente E, **Greco E**, Santucci MB, De Spirito M, Papi M, Bocchino M, Saltini C, Fraziano M. Lysophosphatidic acid enhances antimycobacterial activity both in vitro and ex vivo. *Clin Immunol*. 2006; 121(1): 23-8.
2. **Emanuela Greco**, Marco De Spirito, Massimiliano Papi, Marco Fossati, Giovanni Auricchio, Maurizio Fraziano. CpG oligodeoxynucleotides induce Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipase D activity leading to phagolysosome maturation and intracellular mycobacterial growth inhibition in monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 347 (4): 963-9.
3. Marilina B. Santucci, **Emanuela Greco**, Marco De Spirito, Giuseppe Arcovito, Giulia De Angelis, Roberto Cauda, Maurizio Fraziano. Sphingosine 1-phosphate promotes antigen processing and presentation to CD4<sup>+</sup> T cells in Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 361 (3): 687-93.
4. Michela Sali, Giovanni Delogu, **Emanuela Greco**, Stefano Rocca, Vittorio Colizzi, Giovanni Fadda, Maurizio Fraziano. Exploiting immunotherapy in Mycobacterium tuberculosis-infected mice: Sphingosine 1-phosphate treatment results in a protective or detrimental effect depending by the stage of infection (manoscritto in stampa su *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*).
5. **Emanuela Greco**, Marilina B. Santucci, Michela Sali, Francesca De Angelis Rigotti, Massimiliano Papi, Marco De Spirito, Giovanni Delogu, Maurizio Fraziano. Natural lysophospholipids reduce MTB induced cytotoxicity and induce antimycobacterial activity by a phagolysosome maturation dependent mechanism in type II alveolar epithelial cells (manoscritto sottoposto per pubblicazione).
6. **Emanuela Greco**, Marilina B. Santucci, Massimiliano Papi, Marco De Spirito, Maurizio Fraziano. CpG oligodeoxynucleotides promote endolysosome maturation and intracellular mycobacterial killing in M. tuberculosis infected type II alveolar epithelial cells (manoscritto sottoposto per pubblicazione).

## • Brevetti

“Liposomi asimmetrici e loro usi in campo medico”. Inventori: Maurizio Fraziano, Marco De Spirito, Gianluca Quintiliani, Emanuela Greco. N° RM2007A000394 del 16/07/07; PCT/IT2008/000474 del 15/07/08.

## • Riassunto

La tubercolosi (TB) è la malattia infettiva, causata da un singolo agente infettivo, più diffusa a livello mondiale ed è responsabile di più di due milioni di decessi ogni anno. L'agente eziologico della tubercolosi è il *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), un patogeno intracellulare aerobio obbligato che infetta l'uomo, preferibilmente per via aereosolica, riuscendo a sopravvivere a livello intracellulare. Un meccanismo d'evasione che MTB attua per sfuggire all'azione micobattericida del macrofago è rappresentato dalla maturazione del fagolisosoma e dall'inibizione dell'enzima fosfolipasi D (PLD), il cui prodotto metabolicamente attivo è l'acido fosfatidico (PA). In questa Tesi abbiamo studiato il ruolo di ligandi d'origine microbica, quali le sequenze CpG, e ligandi naturali, come Acido Lisofosfatidico (LPA) e Sfingosina 1-fosfato (S1P), nella risposta immunitaria innata antimicobatterica in cellule epiteliali alveolari e in cellule della linea monocito/macrofagica. In questo contesto, abbiamo dimostrato che, in entrambi i tipi cellulari, la stimolazione con CpG, LPA o S1P può i) inibire la crescita intracellulare di MTB attraverso l'azione della PLD, ii) indurre l'attivazione della PLD  $Ca^{++}$ -dipendente, iii) promuovere la maturazione del fagolisosoma mediante il coinvolgimento della PLD in cellule infettate con MTB. Questi risultati indicano che le cellule epiteliali alveolari, oltre ai monociti-macrofagi, possono svolgere un ruolo attivo nell'ambito della risposta immunitaria innata antitubercolare e che l'attivazione della PLD con la conseguente produzione di PA, è cruciale per l'attivazione della risposta antimicrobica basata sulla maturazione fagolisosomale. Su queste basi, abbiamo ideato liposomi in grado di veicolare secondi messaggeri lipidici, come il PA la cui produzione è soppressa in corso di infezione con MTB, in grado di ristabilire o potenziare la risposta immunitaria innata micobattericida. Abbiamo, quindi, prodotto liposomi asimmetrici simili a corpi apoptotici caratterizzati dalla presenza di fosfatidilserina (PS) sul foglietto lipidico esterno e PA nel foglietto interno. I nostri risultati indicano che tali liposomi possono essere efficacemente internalizzati nei macrofagi senza indurre segnali proinfiammatori. Inoltre, la stimolazione di macrofagi umani con questi liposomi i) induce un incremento dei flussi di  $Ca^{++}$ , ii) promuove la maturazione del fagolisosoma  $Ca^{++}$ -dipendente e iii) riduce la crescita intracellulare micobatterica in maniera dipendente dalla maturazione fagolisosomale. In conclusione, questi risultati suggeriscono la possibilità di usare i liposomi come "cavalli di Troia" per veicolare secondi messaggeri lipidici e ripristinare quei segnali molecolari frequentemente inibiti dai patogeni intracellulari come strategia di sopravvivenza nella cellula ospite.

## 1. INTRODUZIONE

La Tuberculosis (TB) è una malattia infettiva che per secoli ha rappresentato una delle maggiori cause di mortalità dovuta ad un singolo agente infettivo. Il batterio responsabile della patologia è *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) noto anche come bacillo tubercolare a causa delle caratteristiche lesioni o tubercoli che produce durante l'infezione. La progressione dell'infezione tubercolare dipende fondamentalmente dall'integrità del sistema immunitario dell'ospite. Grazie all'introduzione della chemioterapia e delle misure di profilassi, per vari decenni abbiamo assistito ad una notevole riduzione del tasso di mortalità; tuttavia, attualmente si sta verificando una fase di recrudescenza della tubercolosi come conseguenza di fattori antropici come la povertà, le scarse condizioni igienico-sanitarie e fattori biologici quali la recente pandemia HIV/AIDS e lo sviluppo di ceppi farmaco-resistenti.

### 1.1 Cenni storici

La tubercolosi era una malattia ben conosciuta già nell'antichità, come dimostrano reperti archeologici provenienti da ogni parte del mondo risalenti a 10000 anni fa (*Smith I., 2003*). Le più antiche tracce della malattia riguardano evidenze di tubercolosi ossea, o morbo di Pott, che colpisce lo scheletro determinando modificazioni morfologiche e strutturali, quali la fusione delle vertebre e la deformazione della colonna vertebrale. In Egitto, presso la necropoli di Heliopolis, sono state rinvenute mummie di 2000 anni fa con chiari segni di tubercolosi ossea (*Crubezy E. et al., 1998*). La loro distribuzione, focalizzata in aree precise, indicava la presenza di centri simili ai sanatori novecenteschi, in cui i malati venivano isolati per tentare di controllare la diffusione della malattia. Situazione analoga la si riscontra in



mummie precolombiane dell'America Latina (*Salo W.L., et al., 1994*). Inoltre, tracce del morbo tubercolare risalenti al Neolitico si sono registrate anche in diversi siti archeologici in Italia, Danimarca e Medio Oriente, evidenziando la notevole diffusione geografica della malattia. Nonostante sia stata probabilmente descritta per la prima volta nei testi indiani, fu Ippocrate di Kos, intorno al 430 a.C., a definire la tubercolosi polmonare col termine greco “*φθίσις*”, consunzione, e ad etichettarla come la malattia più diffusa e dagli esiti quasi sempre mortali, che si manifestava attraverso tosse con sangue (*Siegel RE., 1964*). Per risalire alla più moderna espressione “tubercolosi”, bisogna aspettare il XVII secolo d.C. con Franciscus de la Boe, meglio conosciuto come Dr. Silvius, che fece studi anatomico-patologici su noduli polmonari che chiamò “tubercoli”. Molti grandi patologi del suo tempo credevano però che questi fossero tipi di tumore o ghiandole anomale, rifiutando ogni probabile origine infettiva. La prima ipotesi credibile sulla natura infettiva della tubercolosi è stata esposta dall'inglese Benjamin Marten nel 1722, che ipotizzò che la malattia potesse essere trasmessa attraverso il “respiro” di una persona malata (*Doetsch RN., 1978*). Inoltre sempre agli inizi del '700, l'inglese Richard Morton usò il termine “tisi” per indicare specificatamente il malato di tubercolosi. Al termine tubercolosi, col passare del tempo e fino ai giorni nostri, se ne sono aggiunti di alternativi, come *tisi* per la tubercolosi polmonare, *lupus vulgaris* per quella della pelle e *morbo di Pott* per quella delle ossa.

Malgrado la tubercolosi abbia da millenni afflitto la vita degli essere umani, una maggiore conoscenza scientifica della malattia si ha solo nel 1882 quando il medico e microbiologo Robert Koch riesce finalmente a isolare e caratterizzare l'agente eziologico della malattia dando inizio alla lotta alla tubercolosi. Oltre a identificare *Mycobacterium tuberculosis* o “bacillo di Koch”, Koch purificò dai filtrati di coltura

una sostanza prodotta dal batterio (la tuberculina) che inoculata intradermicamente induceva una risposta infiammatoria, caratterizzata da un rigonfiamento della cute, in pazienti che erano già entrati in contatto con il micobatterio. Questa reazione consisteva in un rigonfiamento a livello cutaneo che si manifestava dopo 24-48 ore dalla somministrazione della tuberculina. Il fenomeno, oggi noto come reazione di ipersensibilità di tipo ritardato (Delayed-type hypersensitivity, DTH), ma all'epoca venne chiamato "fenomeno di Koch". Tuttavia è agli inizi del '900 che si tagliò un importante traguardo nella lotta contro la tubercolosi grazie al contributo di Albert Calmette e Camille Guerin. I due scienziati produssero un ceppo attenuato di micobatterio, trattando *Mycobacterium bovis* con bile bovina. Questo ceppo, denominato Bacillo di Calmette e Guerin (BCG), venne utilizzato come vaccino sull'uomo e, nonostante esso sia efficace esclusivamente contro forme fulminanti di meningite tubercolare, resta ancor oggi l'unico vaccino disponibile (Kumar R. et al., 2005). Nello stesso periodo Koch sviluppò metodi di colorazione per l'identificazione del bacillo tubercolare; queste tecniche furono successivamente migliorate dal medico e batteriologo tedesco Paul Ehrlich, il cui metodo per l'individuazione del bacillo fornì le basi per lo sviluppo della colorazione di Ziehl-Nielsen, che ancora oggi è un importante strumento per l'identificazione del batterio.

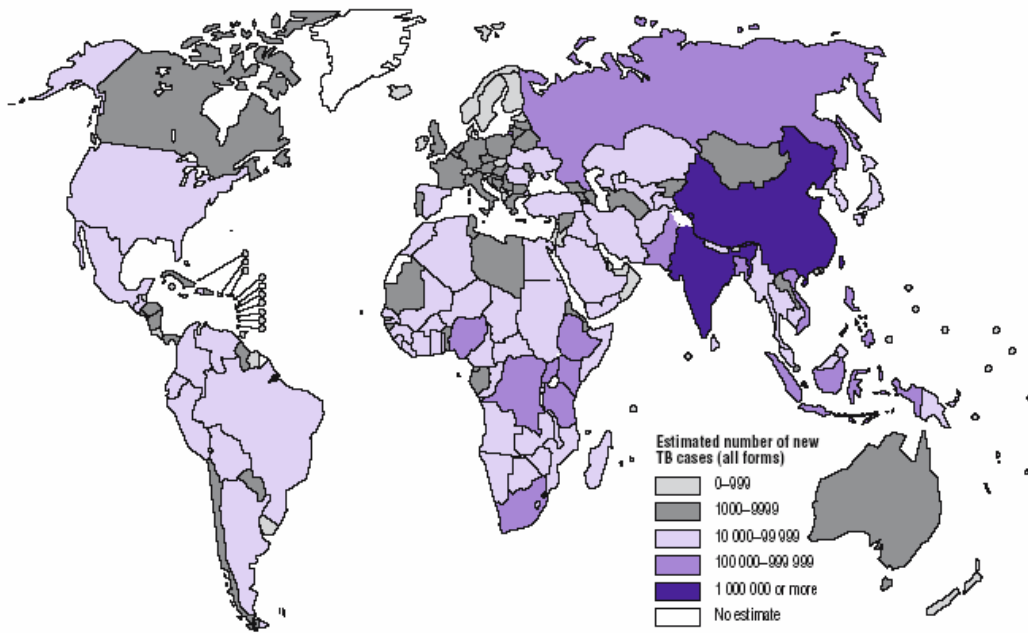
Uno tra gli episodi che segna un passo importante nella cura della tubercolosi, è la costruzione dei sanatori; il primo fu fondato nel 1884 dall'americano Edward Livingston Trudeau negli Stati Uniti. Questa istituzione riceveva solo pazienti tubercolari la cui terapia era basata sul riposo, l'aria fresca e una dieta salutare. I progressi successivi seguirono rapidamente. Nel 1943, Selman Abraham Waksman, un biochimico e microbiologo russo naturalizzato americano, premio Nobel per la medicina nel 1952, scoprì che l'antibiotico streptomina, purificato da *Streptomyces*

*griseus*, era efficace contro *M. tuberculosis*, fornendo così le basi per la farmacologia della tubercolosi e per l'odierna terapia antibiotica. Attualmente viene infatti utilizzato un cocktail farmacologico composto da 5 antibiotici: isoniazide, rifampicina, pirazinamide, etambutolo, e streptomina. Nel caso di resistenza verso uno o più di questi antibiotici, sono comunque disponibili alcuni farmaci di seconda scelta i cui effetti a lungo termine non sono però ancora totalmente noti (Golan DE. et al. 2006).

## **1.2 La tubercolosi nel mondo**

La diffusione della tubercolosi si è stabilizzata per la prima volta nel 1993, quando l'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization, WHO) dichiarò la malattia un'emergenza di salute pubblica. La tubercolosi è una delle patologie dovute ad un singolo agente infettivo che annualmente causa il maggior numero di decessi. Secondo l'ultimo rapporto sul controllo della tubercolosi pubblicato dalla WHO nel 2008, stiamo assistendo ad un aumento lento ma continuo del numero di casi di tubercolosi. Infatti, tra il 2005 e il 2006 il numero di nuovi casi è aumentato da 9,1 milioni a 9,2 milioni, con un incremento dello 0.6% (WHO Report, 2008). Le aree geografiche particolarmente colpite sono quelle dei paesi in via di sviluppo come Africa, Sud Est Asiatico, ma anche regioni mediterranee orientali e l'Europa orientale (Figura 1.1).

Estimated number of new TB cases, by country, 2006



<sup>1</sup> *The Global Plan to Stop TB, 2006-2015*. Geneva, Stop TB Partnership and World Health Organization, 2006 (WHO/HTM/STB/2006.35).

Figura 1.1: Incidenza della tubercolosi nel mondo nel 2006 (World Health Organization - WHO, 2008)

Questa inversione di tendenza, che ha portato ad una diffusione della tubercolosi dai paesi più poveri a quelli occidentali e ricchi, ha avuto origine alla fine degli anni '80. L'attuale diffusione e distribuzione della TB è dovuta a diversi fattori quali la diffusione dell'infezione da HIV (virus dell'immunodeficienza umana), la comparsa di ceppi micobatterici farmaco-resistenti, l'istaurarsi di condizioni di immunodepressione dovuta a malnutrizione, alcolismo, diabete, stress, fumo di sigaretta (Pai M. et al., 2007). Di particolare rilevanza è la coinfezione tra il HIV e il *M. tuberculosis*; in Africa, infatti, fra le persone affette da AIDS (Sindrome da Immuno Deficienza Acquisita) la tubercolosi è la principale causa di morte. E' nota, infatti, una duplice interazione tra i due patogeni: MTB accelera la progressione verso condizioni d'AIDS conclamato e l'infezione da HIV aumenta la suscettibilità alla tubercolosi (Shafer RW. et al., 1996). Un altro aspetto che aggrava la situazione è

l'insorgenza di ceppi di micobatterio farmaco-resistenti. La non corretta aderenza alla terapia antibiotica ha portato infatti all'insorgenza di ceppi resistenti agli antibiotici. Una forma di tubercolosi resistente ai farmaci particolarmente pericolosa è la MDR-TB (multidrug resistant tuberculosis), provocata da ceppi di batteri resistenti ad almeno due medicinali anti tubercolari di prima linea, quali l'isoniazide e la rifampicina. In alcuni casi, la MDR-TB può trasformarsi in una forma d'infezione ancora più difficile da trattare, in quanto resistente anche ai farmaci di seconda linea come capreomicina, kanamicina e amikacina; per questo motivo viene definita XDR-TB (extensively drug resistant tuberculosis) (Fig 1.2).

### Countries with XDR-TB confirmed cases as of February 2008

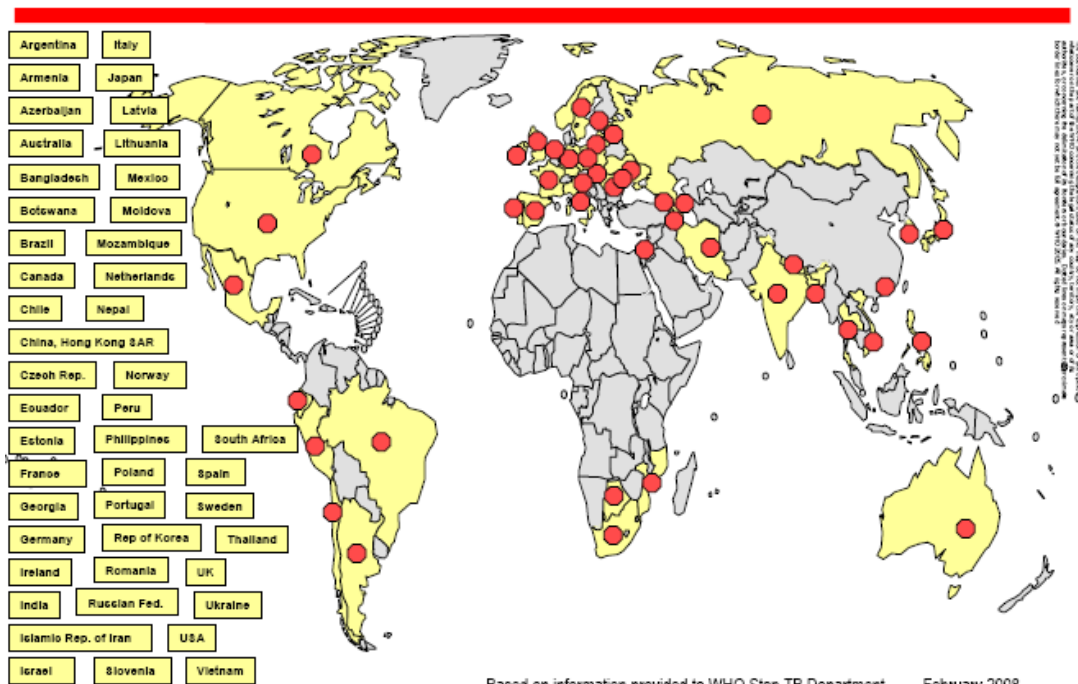


Figura 1.2: Casi di XDR-TB nel mondo (World Health Organization – WHO Stop TB Department, 2008)

### 1.3 *Mycobacterium tuberculosis*

L'agente eziologico della tubercolosi è *M. tuberculosis* (MTB), un patogeno intracellulare a crescita lenta, privo di flagello, asporigeno, aerobio-obbligato. Al microscopio MTB si presenta con la classica forma bastoncellare, curva o leggermente piegata, di lunghezza media tra 2-4  $\mu\text{m}$  e di larghezza tra 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  (Fig 1.3).

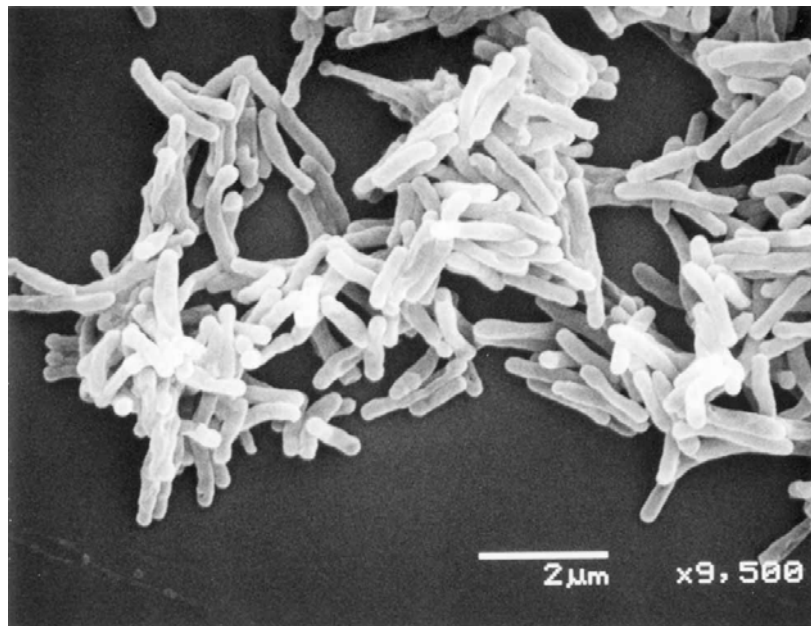
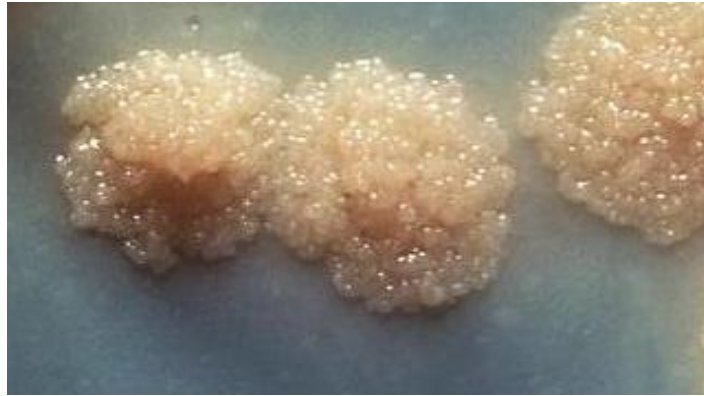


Figura 1.3: *Mycobacterium tuberculosis* (The Research Institute of Tuberculosis, Tokyo)

MTB stabilisce la sua infezione principalmente nel tessuto polmonare, con particolare predilezione per i lobi superiori in quanto ricchi di ossigeno. Il tempo di replicazione è intorno alle 24 h, sia in terreno sintetico, che *in vivo* (Cole ST. et al., 1998). La crescita batterica in laboratorio necessita dalle 3 alle 4 settimane per diventare visibile e porta alla formazione di colonie visibili, dalla superficie umida e frastagliata (Fig 1.4).



**Figura 1.4:** Colonie di *Mycobacterium tuberculosis* su agar.

Da un punto di vista tassonomico, *M. tuberculosis* appartiene alla classe degli schizomiceti, all'ordine *Actinomycetales*, alla famiglia *Mycobacteriaceae* e al genere *Mycobacterium*. Questo genere include una vasta gamma di specie, tra cui le specie patogene *M. bovis*, *M. lepre*, e le specie ambientali non patogene per l'uomo quali *M. smegmatis* e *M. terrae*. *M. tuberculosis* viene comunemente considerato debolmente Gram positivo ed è caratterizzato da alcol-acido resistenza evidenziabile mediante la colorazione di Ziehl-Nielsen. MTB, inoltre, persiste a lungo nell'ambiente dove può permanere a lungo vitale nella polvere e sugli oggetti; inoltre è molto resistente agli agenti chimici e fisici, mostrando una sensibilità media al calore e una lunga resistenza all'essiccamento (Ducati RD. et al., 2006).

### **1.3.1 Parete cellulare**

*M. tuberculosis* presenta un rivestimento cellulare di protezione estremamente complesso costituito da un insieme di lipidi, glicolipidi e proteine; tale rivestimento è formato da una membrana fosfolipidica rivestita all'esterno da una complessa parete cellulare. Nella parete osservata al microscopio elettronico sono distinguibili tre strati: uno più interno che è il peptidoglicano, uno intermedio che è l'arabinogalattano miccolato, e uno più esterno caratterizzato dalle catene idrocarburiche polari di acidi grassi e dall'estremità terminale del lipopolisaccaride lipoarabinomannano (LAM)

(Brennan PJ. et Draper P., 1994). Il peptidoglicano conferisce resistenza e rigidità alla parete batterica ed è il principale fattore di virulenza di MTB. L'arabinogalattano è legato al peptidoglicano attraverso legami fosfodiesteri ed è esterificato alle estremità distali con acidi grassi ad alto peso molecolare (acido micolico). L'acido micolico costituisce una barriera altamente idrofobica responsabile dell'alta resistenza di MTB ad alcuni farmaci. Associati all'arabinogalattano-micolato ci sono una vasta gamma di lipidi e glicolipidi tra cui il LAM, il lipomannano (LM) e il fosfatidil inositolo mannosio (Fig 1.5).

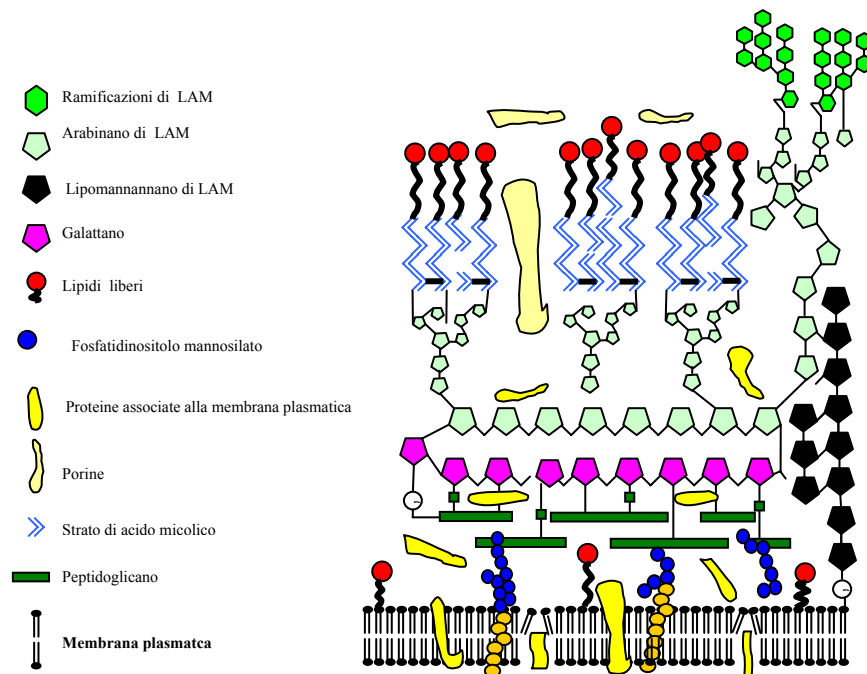


Figura 1.5: Struttura della parete di *M. tuberculosis* (Garg SK. et al., 2004)

Una componente della parete cellulare che determina virulenza è il fattore cordale (trealosio 6,6-dimicolato), glicolipide associato all'acido micolico, implicato nell'attivazione di eventi mediati da citochine. Il fattore cordale induce tossicità sistemica, rilascio da parte dei macrofagi di chemochine ed ha una spiccata capacità di



indurre la formazione dei granulomi (*Roland R. et al., 2001*). Inoltre è nota la sua capacità di inibire la fusione tra le vescicole fosfolipidiche indotta dal calcio, la migrazione dei leucociti, e la formazione del fagolisosoma (*Spargo BJ. et al., 1991*). I ceppi batterici privi di questo micoside risultano avirulenti, pur conservando la vitalità. Un'azione analoga è svolta da un altro importante elemento della parete, i solfatidi, glicolipidi di superficie che, all'interno delle cellule macrofagiche, inibiscono la fusione del fagosoma con i lisosomi. Rilevante è inoltre il ruolo della lipoproteina 19 kDa, molecola che si trova ancorata alla membrana attraverso la sua porzione lipidica idrofobica. Essa sembra essere implicata in una vasta gamma di risposte immunologiche come l'induzione di IL-12 da parte di macrofagi umani e l'incremento, a livello trascrizionale, della iNOS (ossido nitrico sintasi inducibile) (*Brightbill HB. et al., 1999*). La lipoproteina 19 kDa è in grado di riconoscere e legarsi ad un recettore appartenente alla famiglia dei recettori di tipo Toll (Toll-like receptors, TLR), il TLR-2, inducendo apoptosi in cellule monocitiche THP-1 (*Aliprantis AO. et al., 1999*) e produzione di citochine pro-infiammatorie (*Ciaramella A. et al., 2000*). Tale risposta apoptotica è associata alla sopravvivenza intracellulare del micobatterio stesso (*Santucci MB. et al., 2000*). Infine un altro componente rilevante della parete micobatterica è il lipoarabinomannano (LAM) di cui se ne distinguono tre classi (*Garg SK. et al., 2004*): ManLAM (mannose-capped LAM) caratterizzato da una mannosilazione dei residui terminali tipico dei ceppi virulenti, PILAM (phosphoinositide-capped LAM) presente nei micobatteri a crescita rapida e nei ceppi patogeni dove è considerato il precursore di ManLAM, e AraLAM (arabinofuransyl-terminated LAM) privo di mannosilazione dei residui terminali. Queste molecole vengono annoverate tra le principali modulatrici della risposta immunitaria dell'ospite (*Brennan PJ., 2003*). In particolare il ManLAM può inibire

direttamente la risposta macrofagica favorendo la sopravvivenza intracellulare del micobatterio stesso (*Knutson KL. et al., 1998*), ed è inoltre in grado di favorire la fagocitosi attraverso il recettore per il mannosio (*Maeda N. et al., 2003*). Differentemente dal ManLAM, AraLAM appare essere un forte induttore di TNF- $\alpha$  e citochine chemotattiche come MCP-3 e IL-8 (*Roach TI. et al., 1993*).

Il LAM micobatterico è riconosciuto da un membro della famiglia dei recettori di tipo Toll, il TLR4, che in seguito a tale legame induce segnali d'attivazione nel macrofago, rivelabili in termini di produzione di citochine proinfiammatorie nel microambiente circostante (*Aderman A. et al., 2000*). Il LAM svolge anche una serie di funzioni immunoregolatorie finalizzate alla sopravvivenza intracellulare del micobatterio stesso, tra le quali i) l'inattivazione degli intermedi reattivi dell'ossigeno, ii) l'inibizione dell'attivazione delle fosfolipasi D macrofagiche implicate nella maturazione del fagolisosoma (*Locati M. et al., 2001*), iii) l'inibizione dell'attività della protein kinasi C (*Schorey JS. et al., 2003*) e iv) l'inibizione della maturazione del fagolisosoma (*Fratti RA. et al., 2003*).

#### **1.4 Risposta immunitaria verso *M. tuberculosis***

*M. tuberculosis* si diffonde per via aerea ed entra nell'organismo ospite tramite l'inalazione di pochi micobatteri, sufficienti per l'instaurarsi di un'infezione produttiva. Il rischio di trasmissione dipende da diversi fattori, come carica batterica, frequenza di esposizione al contagio e condizione di recettività del soggetto esposto. In generale un individuo con tubercolosi polmonare attiva, espelle goccioline contenenti i bacilli, che possono essere ispirate da individui nelle vicinanze. Tuttavia, solo il 40-50% degli individui esposti risulterà infettato (*Diel R. et al., 2006*) e di questi ultimi solo il 5-10% può sviluppare la malattia nel corso degli anni,

suggerendo che la risposta immunitaria riesce a controllare l'infezione. In seguito all'inalazione se le particelle d'aerosol contenenti il patogeno riescono a raggiungere gli alveoli polmonari, esse verranno fagocitate da macrofagi e da cellule dendritiche. I macrofagi polmonari resteranno nel tessuto alveolare dove svolgeranno la loro funzione protettiva, mentre le cellule dendritiche migreranno ai vicini linfonodi drenanti dove attiveranno i linfociti T antigene specifici, capaci di contenere la crescita micobatterica all'interno di piccole strutture chiamate granulomi (Fig 1.6).

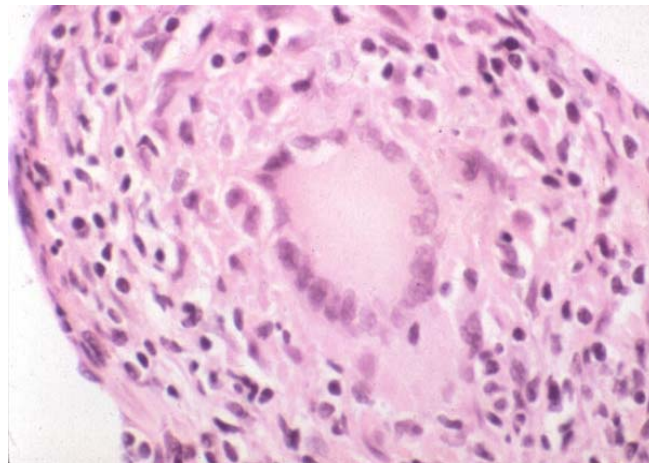


Figura 1.6: Struttura del granuloma tubercolare ([http:// www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com))

Il granuloma si presenta con un'area centrale costituita da una zona necrotica, e strati periferici concentrici di macrofagi, cellule epitelioidi, cellule giganti multinucleate di Langhans e linfociti (*Mariano M. et. al., 1995*). Questo cordone di cellule previene la disseminazione del patogeno e focalizza la risposta immunitaria intorno al focolaio d'infezione. Inoltre nell'infiltrato leucocitario periferico c'è un abbondante numero di linfociti T CD4+ e linfociti T CD8+, con intensa attività proliferativa (*Fenhalls G. et al., 2000*), a dimostrazione di una maggior attività nella periferia del granuloma. Queste cellule si distribuiscono attorno ad aggregati follicolari linfoidei costituiti prevalentemente da APC (cellule presentanti l'antigene) e da linfociti B. Tali

aggregati, simili a linfonodi, assicurano un'efficace risposta immune locale, nonostante non riescano ad eradicare definitivamente il patogeno. L'assenza di un'efficace eliminazione del patogeno provoca un processo infiammatorio a lungo termine con conseguenti danni funzionali al tessuto polmonare (*Ulrichs T. et al., 2004*).

Negli individui immunocompetenti, solo raramente l'infezione da *M. tuberculosis* evolve in malattia; generalmente, infatti, si instaura un equilibrio dialettico tra risposta immune dell'ospite e crescita del patogeno (*Stewart GR. et al., 2003*). Durante le prime fasi della formazione del granuloma, il micobatterio riduce le sue attività metaboliche e replicative in maniera tale da sopravvivere in un ambiente ostile, povero di nutrienti e ossigeno (*Cosma CL. et al., 2003*). Nonostante ci siano numerosi studi sull'argomento, ancora non è completamente chiaro come l'infezione latente da *M. tuberculosis* si possa trasformare in tubercolosi polmonare attiva; alcuni studi in vitro suggeriscono il coinvolgimento di alcuni fosfolipidi e proteine batteriche nel passaggio da uno stato di dormienza ad uno metabolicamente attivo (*Zhang Y. Et al., 2001*). Inoltre recentemente è stato ipotizzato anche il coinvolgimento dei prodotti dei geni rpf (resuscitation promoter factor) di *M. tuberculosis* (*Cohen-Gonsaud M. et al., 2004; Cohen-Gonsaud M. et al., 2005*), ma ancora non è chiaro il loro ruolo nel passaggio a malattia attiva.

*M. tuberculosis* risiede all'interno di vescicole endo-fagosomali del macrofago, dove i peptidi d'origine micobatterica vengono caricati su molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) di classe II (*Kaufmann SH. et al., 1999*). Una volta raggiunta la membrana, le molecole MHC cariche dei peptidi batterici possono attivare i linfociti T CD4+ specifici. La sottopopolazione di linfociti T CD4+ mostra un'importanza cruciale nel controllo dell'infezione da *M. tuberculosis* (*Schaible UE.*

*et al., 1999*); durante l'infezione tubercolare la risposta immunitaria adattativa è mediata dai linfociti T CD4+ con un fenotipo T helper 1 (Th1). I linfociti Th1, che producono IFN- $\gamma$ , esprimono in maniera preferenziale il recettore per le chemochine CCR5 e si accumulano nel polmone di pazienti con tubercolosi polmonare attiva (*Von Andrian UH. et al., 2000; Santucci MB. et al., 2004*).

Nonostante *M. tuberculosis* risieda all'interno dei fagosomi, l'immunità acquisita verso questo patogeno non è dominata soltanto dai linfociti T CD4+. Tradizionalmente i linfociti T CD8+ sono responsabili dell'eliminazione di cellule che presentano sulla loro membrana molecole MHC di classe I che presentano peptidi micobatterici nella loro tasca. Nel citosol, gli antigeni, d'origine microbica o endogena, sono associati all'ubiquitina, condotti al proteasoma e degradati in peptidi dalla lunghezza di 8-10 amminoacidi. I peptidi vengono poi veicolati al reticolo endoplasmatico, dove si legano alle nuove molecole MHC di classe I che migreranno alla membrana plasmatica e attiveranno i linfociti T CD8+ antigene specifici (*Houde M. et al., 2003*). Al contrario della via di presentazione di classe II, quella di classe I è meno immediata per antigeni inizialmente contenuti nel fagosoma, questo perchè essi dovranno prima attraversare la membrana fagosomiale e poi raggiungere il citoplasma. Antigeni di *M. tuberculosis* possono essere presentati nel contesto delle molecole MHC di classe I ed attivare i linfociti T CD8+ specifici attraverso una via alternativa (cross-presentazione) (*Canaday DH. et al., 1999*). Infatti è stato dimostrato che i fagosomi posseggono tutti gli elementi necessari per la "cross-presentazione" degli antigeni esogeni nel contesto delle molecole MHC di classe I (*Houde M. et al., 2003*). Questo studio suggerisce un modello in cui le idrolasi acide acquisite durante la maturazione del fagosoma, iniziano la degradazione di antigeni esogeni (*Garin J. et al., 2001; Muno D. et al., 2000; Lennon-Dumenil AM. et al.,*

2002), che successivamente vengono traslocati sul lato citoplasmatico della membrana fagosomale, per mezzo di una proteina chiamata Sec61 (Tsai B. et al., 2002). Gli antigeni traslocati hanno accesso al complesso del proteasoma, assemblato sul lato citoplasmatico del fagosoma, e generano peptidi che, attraverso la proteina associata alla processazione dell'antigene (TAP), in parte sono trasportati nel lume del reticolo endoplasmatico, in parte ritornano nel fagosoma dove si legano alle molecole MHC di classe I per essere presentati ai linfociti T CD8+.

Nel corso dell'infezione tubercolare i linfociti T CD8+ producono il fattore di necrosi tumorale (TNF- $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$  ed agiscono come cellule citotossiche lisando le cellule bersaglio per mezzo di granzimi, perforina o mediante il legame Fas/ligando di Fas. Queste cellule producono anche la granulicina che, entrando attraverso i pori formati dalla perforina, agisce direttamente su MTB uccidendolo (Stenger S. et al., 1997). Inoltre i linfociti T CD8+ riconoscono diversi antigeni di *M. tuberculosis* che non sono presentati dalle classiche molecole MHC, bensì da molecole non polimorfiche come la molecola CD1, che presenta principalmente antigeni glicolipidici del micobatterio (Porcelli SA. et al., 1999).

## **1.5 Immunopatogenesi della tubercolosi**

L'immunopatogenesi della tubercolosi viene suddivisa cronologicamente in cinque stadi, la cui durata e il susseguirsi possono tuttavia variare in base alle condizioni del soggetto infetto.

1° stadio: *interazione M. tuberculosis-macrofago*. Piccole particelle contenenti 1-3 bacilli tubercolari vengono inalate dall'individuo esposto, e possono subire due destini diversi: o vengono espulsi attraverso il flusso mucociliare, oppure, attraverso i bronchioli, giungono agli alveoli dove avviene il primo incontro tra il patogeno e i

macrofagi dell'ospite. La capacità o meno dei macrofagi alveolari di uccidere il micobatterio dipende dalla virulenza del ceppo e dalla capacità micobattericida intrinseca del fagocita. Qualora i bacilli non vengano eliminati, andranno incontro a proliferazione esponenziale, causeranno la morte del macrofago con conseguente loro rilascio e infezione dei macrofagi circostanti. Dal sangue periferico verranno richiamati quindi monociti nel sito d'infezione grazie a molecole chemotattiche.

2° stadio: *simbiosi*. I monociti del sangue periferico dopo aver raggiunto il polmone si differenziano in macrofagi, i veri responsabili della risposta primaria. I macrofagi alveolari verranno quindi relegati ad un ruolo marginale, perché fisicamente più lontani dai micobatteri. In questa fase, i macrofagi fagocitano i micobatteri senza distruggerli né inibendone la crescita. Si instaura quindi una sorta di simbiosi in cui i fagociti dell'ospite si accumulano e i micobatteri si moltiplicano. A questo punto però cominciano ad evidenziarsi piccoli danni tissutali dovuti alla stimolazione di linfociti T specifici che migrano al polmone. I linfociti cercano di eradicare il patogeno senza successo, e questo può causare la cronicizzazione del processo infiammatorio. Il patogeno, comunque, viene delimitato da cellule del sistema immunitario che vanno a circondarlo, generando la struttura denominata granuloma (Fig 1.7) (Flynn JL., 2004).

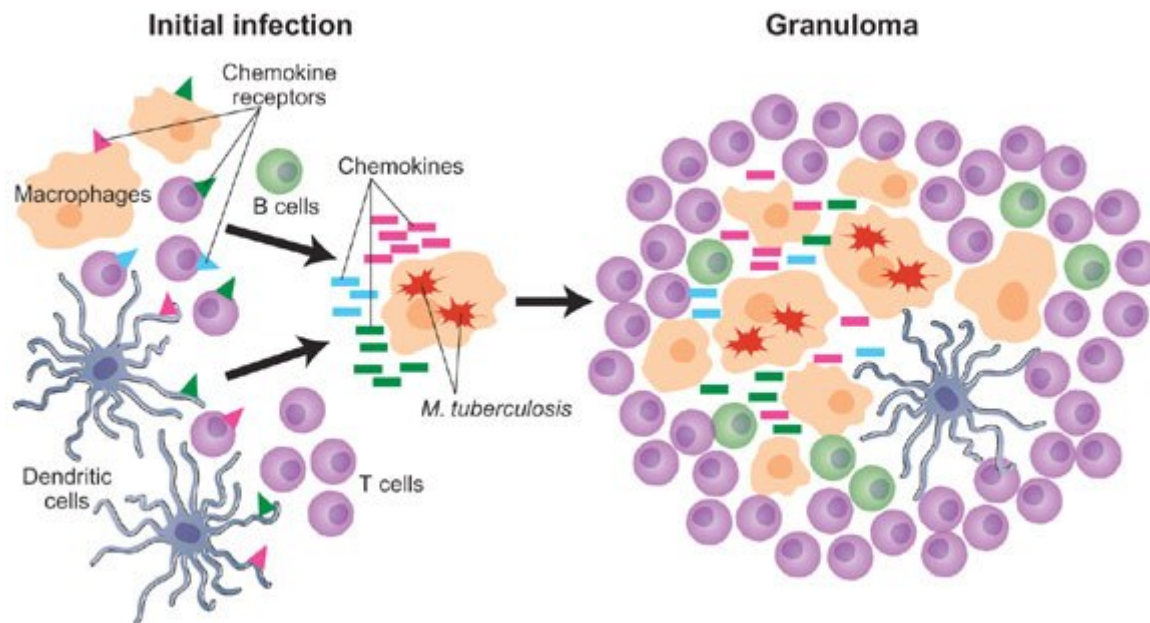


Figura 1.7: Formazione del granuloma (Flynn JL., 2004)

3° stadio: *necrosi*. Dopo due o tre settimane dall'infezione, si comincia a sviluppare una caratteristica necrosi caseosa nella porzione centrale della lesione primaria e si sviluppa positività al test per la tubercolina. Si viene quindi a generare una risposta immunitaria detta "ipersensibilità di tipo ritardato" (Delayed-Type Hypersensitivity, DTH) che coinvolge linfociti T (specialmente Th1) richiamati nei focolai d'infezione. Questa reazione provoca danni al tessuto polmonare poiché i linfociti T CD4+, in risposta agli antigeni micobatterici, secernono citochine che inducono flogosi locale. A causa del danno tissutale, al centro del granuloma si forma una sostanza caseosa, circondata da cellule epitelioidi di derivazione macrofagica, monociti, linfociti, neutrofili e da una corona di materiale fibroso. La necrosi al centro del granuloma contribuisce ulteriormente al danno tissutale infiammatorio e rende l'individuo particolarmente infettivo per via aereosolica. In questo momento c'è un titolo di micobatteri e di antigeni tubercolari tanto elevato da lasciare il polmone per via linfo-ematica e raggiungere linfonodi satellite dove inducono l'attivazione di



cellule dendritiche e linfociti T. Giunti a questo punto, *M. tuberculosis* è in grado di indurre un focolaio infiammatorio in sede linfonodale simile a quello polmonare primario. Si ha così la formazione del complesso primario (o complesso di Ghon) caratterizzato da una componente infiammatoria polmonare e una linfoghiandolare. Nella maggior parte dei casi, il complesso di Ghon guarisce, lasciando una lesione fibrotica e calcificata, nella quale il micobatterio può risiedere in forma quiescente.

4° stadio: *interazione tra ipersensibilità di tipo ritardato (DTH) e immunità cellulo-mediata (CMI)*. Dopo la terza settimana d'infezione, la malattia può seguire un decorso diverso a seconda della relazione che si instaura tra la risposta DTH e la CMI, la quale agisce stimolando la capacità microbica dei macrofagi infettati.

Nel paziente immunoincompetente si hanno alti livelli di DTH e si sviluppa una debole risposta cellulo-mediata. I bacilli tubercolari, rilasciati nel contesto caseoso, vengono fagocitati da nuovi macrofagi che risultano però incapaci di controllare la replicazione batterica. L'area di necrosi caseosa inizia quindi ad espandersi incrementando la distruzione del tessuto polmonare. Tramite questa espansione del granuloma i bacilli possono raggiungere i linfonodi tracheobronchiali e diffondersi a distretti extrapolmonari come fegato, milza, reni.

Nel paziente immunocompetente si ha invece lo sviluppo di una efficace risposta cellulo-mediata. I bacilli che fuoriescono dal centro caseoso sono fagocitati da macrofagi capaci di contenere la replicazione batterica e di uccidere il patogeno. Si noterà quindi un progressivo arresto del danno tissutale (*Kaufmann SH., 1999*).

5° stadio: *liquefazione*. *M. tuberculosis* si moltiplica extracellularmente in modo eccellente nel materiale necrotico e i macrofagi sono inefficaci nel controllare la sua crescita. I fattori scatenanti la liquefazione non sono chiari, anche se sembra che il fenomeno correli con un elevato tasso di enzimi idrolitici come proteasi,

nucleasi e lipasi. Questo materiale necrotico è osmoticamente attivo e capace di assorbire acqua dai tessuti circostanti, generando così un microambiente favorevole per le esigenze nutrizionali dei bacilli. L'elevato titolo micobatterico e l'abbondante carica antigenica sono in grado di necrotizzare i tessuti adiacenti come per esempio le pareti bronchiali. La distruzione dell'epitelio bronchiale permette la comunicazione con l'esterno e l'ingresso di ossigeno, evento cui consegue un'ulteriore replicazione microbica e un'incremento nella contagiosità. L'individuo, pertanto, diventa potenzialmente contagioso e tramite la tosse riesce a disseminare i bacilli all'esterno, sotto forma di aerosol. *M. tuberculosis* può sopravvivere all'interno del granuloma anche per anni senza andare incontro a replicazione grazie al basso pH e alla mancanza d'ossigeno. L'individuo, pertanto, rimane infetto ma non sviluppa la malattia (TB primaria). Se i bacilli sono pochi, possono anche essere eliminati e la lesione probabilmente regredisce e scompare. Se invece il patogeno non viene rimosso, il granuloma può andare incontro ad una calcificazione in cui i bacilli possono rimanere in uno stato dormiente, pronti a riattivarsi anche dopo molto tempo (TB post-primaria). I micobatteri sopravvissuti all'interno dei macrofagi, riattivandosi, si moltiplicano e possono lisare il fagocita e diffondere così per via linfo-ematica in nuove aree polmonari causando tanti piccoli granulomi (TB miliare) (Kaufmann SH., 2001).

## **1.6 Immunità innata e tubercolosi**

L'immunità innata è anche chiamata immunità naturale e comprende meccanismi pre-esistenti all'infezione, capaci di intervenire rapidamente contro i microbi; fornisce quindi la prima linea di difesa durante il periodo critico che si verifica subito dopo il contatto col patogeno, in attesa che la risposta adattativa si

sviluppi. L'immunità innata non mostra specificità d'azione nei confronti del singolo patogeno che viene riconosciuto da strutture molecolari che sono comuni nel mondo microbico. Tali strutture, poco soggette a mutazioni, sono chiamate "PAMPs" (Pathogen-Associated Molecular Patterns) e sono associate a funzioni biologiche fondamentali per la sopravvivenza del microrganismo. I PAMPs sono riconosciuti dalle cellule dell'immunità innata, mediante recettori di membrana di tipo Toll (TLR), perché analoghi al recettore Toll di *Drosophila*. Il legame tra i TLRs e i corrispettivi PAMPs, porta all'attivazione della cellula, mediante il cambiamento conformazionale della porzione intracellulare del recettore, che permette la trasduzione del segnale nella cellula (Fig 1.8). Tuttavia l'espressione dei TLRs non è caratteristica peculiare delle cellule dell'immunità innata. (Akira S. et al., 2001).

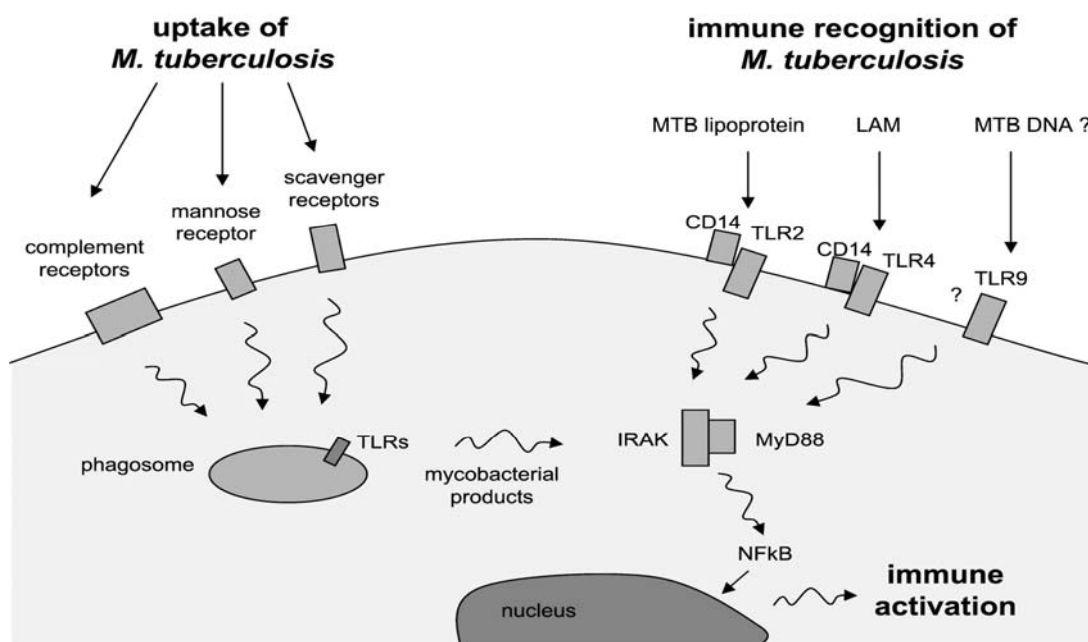
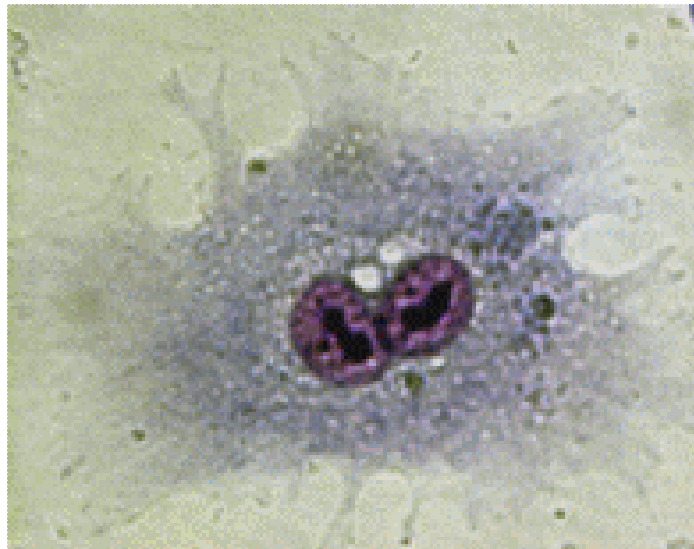


Fig 1.8: Recettori coinvolti nel riconoscimento di *M. tuberculosis* (vanCrevel R. et al., 2002)

### 1.6.1 Cellule epiteliali alveolari

La prima difesa dell'organismo è costituita da barriere fisico/chimiche, che separano l'ambiente interno da quello esterno; queste barriere sono formate dagli epitelii e da sostanze antimicrobiche che essi producono. In particolare, nella tubercolosi le cellule dell'epitelio alveolare (Fig 1.9) non sono semplici "spettatrici", ma vengono loro stesse infettate, attraverso un processo di macropinocitosi (*Garcia-Perez BE. et al., 2003*) dipendente dalla riorganizzazione del citoscheletro (*Bermudez LE. et al., 1996*).



**Fig 1.9: Cellule epiteliali alveolari**

Alcune evidenze suggeriscono che *M. tuberculosis* infetta le cellule epiteliali per sfuggire al potenziale ambiente ostile dei macrofagi, creandosi così una nicchia dove potersi replicare e dover poter stabilire l'infezione. In questo contesto le cellule epiteliali alveolari possono essere considerate come una "riserva" di batteri in corso di tubercolosi latente (*Hernandez-Pando R., 2000*). Tuttavia, diversi studi hanno messo in evidenza che le cellule epiteliali potrebbero giocare un ruolo attivo nella risposta innata antimicobatterica (*Roy S. et al., 2004*). Un importante contributo è dato dalla

produzione di peptidi antimicrobici da parte di queste cellule (Braff MH. et al., 2005). Esistono, infatti, diverse evidenze sperimentali che mostrano l'azione antimicrobica di questi peptidi anche nei confronti di *M. tuberculosis* (Miyakawa Y. et al., 1996). In particolare, le cellule epiteliali infettate con MTB mostrano elevati livelli di  $\beta$ -difensina-2 (Rivas-Santiago B. et al., 2005). Recentemente è stato dimostrato che questa produzione può essere innescata dal legame tra le lipoproteine batteriche e il TLR-2 (Birchler T. et al., 2001), che risponde a IL-1 $\beta$ , attraverso un meccanismo intracellulare che coinvolge fosfoinositolo-3-chinasi (PI3K) e nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Jang BC. et al., 2004).

Un secondo possibile meccanismo effettore, nell'azione antimicrobica delle cellule epiteliali alveolari, è costituito dalla produzione di ossido nitrico (Asano K. et al., 1994; Robbins RA. et al., 1994), attivata in risposta a citochine e a virus. Tale produzione è stata osservata anche durante l'infezione con il bacillo tubercolare, ma mostra attività micobattericida solo se coadiuvata dalla stimolazione con citochine esogene (Roy S. et al., 2004).

Le cellule epiteliali alveolari svolgono anche un importante ruolo come produttrici di citochine proinfiammatorie. Infatti, in risposta a batteri patogeni intracellulari, queste cellule secernono TNF- $\alpha$ , IL-8 e MCP-1, citochine che non vengono invece prodotte in seguito all'esposizione a microrganismi extracellulari (Jung HC. et al., 1995).

### **1.6.2 Macrofagi alveolari**

Un importante componente dell'immunità innata polmonare è rappresentata dai macrofagi alveolari (Fig 1.10). I macrofagi inglobano i microbi in vescicole attraverso il processo della fagocitosi e determinano l'uccisione dei microrganismi fagocitati mediante la maturazione del fagolisosoma e l'attivazione di enzimi proteolitici (Orme I., 2004).

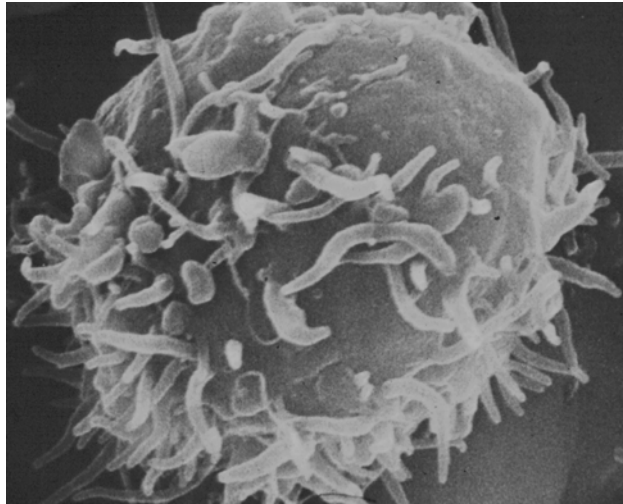


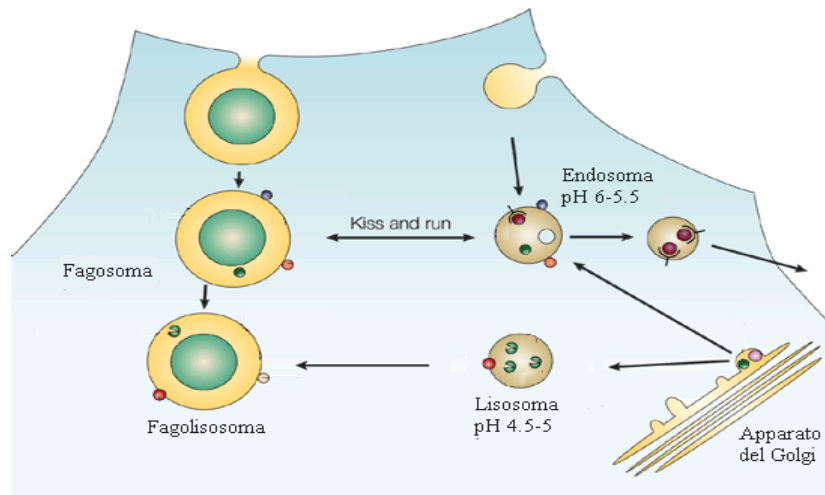
Fig 1.10: Macrofago (Saint Louis University School of medicine)

### **Fagocitosi di *M. tuberculosis***

In generale i fagociti che arrivano alla sede del danno tissutale e/o del focolaio infettivo devono riconoscere ed aderire alle strutture da eliminare. Il processo della fagocitosi è così innescato dal contatto ravvicinato tra la membrana plasmatica del fagocita e il corpo che deve essere ingerito. Il macrofago alveolare risulta essere l'ospite preferenziale di MTB in quanto dotato di recettori di superficie che ne facilitano l'ingresso (Daeron M., 1997). Nel macrofago, il coinvolgimento di alcuni recettori piuttosto che di altri influenza il destino intracellulare del micobatterio stesso (Da Silva RP. et al., 1989). La fagocitosi di MTB da parte dei macrofagi può essere dipendente o indipendente dall'opsonizzazione mediata da anticorpi o dal complemento (Hirsch CS. et al., 1994). La fagocitosi indipendente dalla opsonizzazione risulta particolarmente importante nei tessuti in cui i livelli del complemento sono bassi come, ad esempio la microglia (Peterson PK. et al., 1995), ed è mediata da recettori che riconoscono e legano molecole micobatteriche di superficie quali il mannosio e il lipoarabinomannano (LAM). Tali recettori sono rispettivamente il recettore del mannosio (Macrophages Mannose Receptor, MMR)

(Schlesinger LS., 1993) e il TLR4 (Toll like Receptor-4) in combinazione con il CD14 (Strohmeier GR. et al., 1999). Nella fagocitosi dipendente dalla opsonizzazione *M. tuberculosis* può essere opsonizzato sia da anticorpi (ad esempio IgG) che da proteine del complemento, ed essere poi fagocitato dalla cellula ospite per interazione di queste molecole con i recettori per il frammento Fc degli anticorpi (FcR) o con i recettori per il complemento (CR). La via d'ingresso di MTB mediata dai recettori del complemento (CR1, CR3, CR4) porta a risposte macrofagiche diverse in base al recettore coinvolto: in particolare, il legame del micobatterio al recettore CR3 (Le Cabec V. et al., 2000), ma non al CR1, previene la produzione di ROI (reattivi intermedi dell'ossigeno) e la completa formazione del fagolisosoma il cui sviluppo si arresta nei primi stadi di maturazione (Sturgill-Koszycki S. et al., 1994). Recentemente è emerso che anche il colesterolo svolge un ruolo nell'entrata del micobatterio nel macrofago. Infatti, la presenza di colesterolo sulla membrana plasmatica dei macrofagi risulta essere essenziale per il processo di fagocitosi dei micobatteri, ma non per l'entrata di altri bacilli come *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus casei*, *Yersinia pseudotuberculosis* (Gatfield J. et al., 2000).

Il meccanismo di biogenesi del fagolisosoma (Fig 1.11) viene definito come un processo dinamico caratterizzato da meccanismi di fusione e fissione (“kiss and run”) tra il fagosoma e organelli endocitici quali i lisosomi (Desjardins M., 1995).



**Fig 1.11: Biogenesi del fagolisosoma (Russell DG., 2001)**

In generale, l'internalizzazione di un batterio o di un corpo estraneo avviene attraverso l'estrusione di pseudopodi della membrana plasmatica del fagocita, così da circondare e inglobare l'agente esogeno in una vescicola endosomale intracellulare: il fagosoma. Al momento del distacco la composizione della membrana che avvolge la particella è uguale a quella plasmatica (Muller WA. *et al.*, 1983), ma dopo pochi minuti acquisisce una serie di recettori tra i quali MMR e Rab5, una piccola GTPasi che gioca un ruolo importante nelle prime fasi del processo di maturazione fagosomale (Viera OV. *et al.*, 2002). Successivamente i fagosomi si fondono con i lisosomi, formando i cosiddetti fagolisosomi, all'interno dei quali avviene la degradazione del materiale fagocitato che viene successivamente espulso dalla cellula per esocitosi. Le fasi di adesione, ingestione, formazione del fagosoma e maturazione del fagolisosoma comportano l'attivazione del fagocita, con aumento del metabolismo cellulare. Durante la sua maturazione il fagolisosoma perde Rab5 e MMR e acquista:

- Rab7, piccola GTPasi che regola la fusione del fagosoma con i lisosomi;
- proteine di membrana associate ai lisosomi, (LAMP);



- proteasi acida lisosomiale (*Desjardins M., 1995*) catepsina D;

Nel tempo non è solo il tipo di recettore a variare, ma anche il numero: si osserva infatti il progressivo incremento di LAMP e catepsina D (*Clemens DL. et al., 1995*).

### **Meccanismi d'uccisione intracellulare**

Se la particella ingerita è un microrganismo, esso deve essere eliminato. Il meccanismo più importante con cui ciò si realizza è quello che utilizza reattivi intermedi dell'ossigeno (ROI) (meccanismo ossigeno-dipendente). Questo consiste in un'incremento dell'attività ossidativa, cioè in una graduale riduzione dell'ossigeno molecolare in perossido di idrogeno. La riduzione dell'ossigeno molecolare è catalizzata da una ossidasi presente sulla superficie esterna della membrana plasmatica del fagocita. Nel processo di riduzione, l'ossigeno molecolare guadagna un elettrone ed è convertito così nell'anione superossido ( $O_2^-$ ). Successivamente grazie all'attività della superossido dismutasi, due molecole di anione vengono convertite in ossigeno e perossido di idrogeno. Quest'ultimo, già altamente reattivo, nel fagolisosoma è convertito dalla mieloperossidasi, in presenza di alogeni, in ipoclorito ( $ClO^-$ ) a potente attività battericida. Accanto a questo, vi sono altri meccanismi di uccisione dei batteri mediati da:

- l'abbassamento del pH all'interno del fagolisosoma;
- il lisozima che attacca i mucopeptidi presenti nella parete batterica;
- la lattoferrina che lega il ferro inibendo la crescita di un certo numero di microrganismi;
- proteine cationiche con attività antibatterica;
- idrolasi lisosomiali che essenzialmente digeriscono i resti degli organismi uccisi.

Esiste inoltre un ulteriore meccanismo microbicida che è mediato dagli intermedi reattivi dell'azoto (RNI). La sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS) catalizza la conversione della L-arginina in ossido nitrico (NO), dotato di potente attività microbicida. L'attivazione di questa via si è dimostrata essere a forte azione micobattericida su modelli sperimentali murini *in vitro* e *in vivo* (Chan J. et al., 1999; Shiloh M. et al., 2000). Infine, i macrofagi alveolari infettati con MTB sono in grado di produrre NO e tale produzione risulta correlata con l'inibizione della crescita micobatterica (Rich EA. et al., 1997).

### **Citochine immunoregatorie**

Il riconoscimento di *M. tuberculosis* da parte delle cellule fagocitiche porta all'attivazione cellulare e alla produzione di citochine, le quali mediano un processo complesso di auto- e cross-regolazione. Molte sono le citochine che svolgono un ruolo cruciale nella risposta infiammatoria e nel determinare l'esito delle infezioni micobatteriche. In questo contesto è noto che la stimolazione di monociti, macrofagi e cellule dendritiche con micobatteri o prodotti micobatterici induce la produzione di TNF- $\alpha$ , una citochina pro-infiammatoria (Henderson RA. et al., 1997). Il TNF- $\alpha$  svolge un ruolo chiave nella formazione del granuloma (vanCrevel R. et al., 2002), porta all'attivazione del macrofago e ha proprietà immunoregatorie. In pazienti tubercolari, la produzione di TNF- $\alpha$  è presente nel sito della malattia. Come il TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  è prodotta principalmente da monociti, macrofagi e cellule dendritiche in seguito ad infezione con *M. tuberculosis* ed è molto concentrata nel sito della malattia (Dahl KE. et al., 1996). L' IL-6 ha invece un ruolo controverso nella tubercolosi, avendo proprietà sia pro- che anti-infiammatorie (vanHeyningen TK. et al., 1997). Alcuni studi conferiscono a IL-6 proprietà nocive nelle infezioni micobatteriche, perché essa inibisce la produzione di TNF- $\alpha$  e di IL-1 $\beta$  (Schindler RJ. et al., 1990) e

promuove, in vitro, la crescita di *M. avium*. Al contrario, altri studi supportano un ruolo protettivo di IL-6: topi deficienti nella produzione di IL-6 sono maggiormente suscettibili all'infezione con *M. tuberculosis* (Saunders BM. et al., 2000). IL-12 è la citochina chiave nella difesa dell'ospite contro *M. tuberculosis*. IL-12 è prodotta principalmente da cellule fagocitiche in seguito alla fagocitosi di MTB (Ladel CH. et al., 1997), svolgendo un ruolo cruciale nella produzione di IFN- $\gamma$  e nell'attivazione di una risposta cellulo-mediata. Sinergicamente con IL-12 anche IL-18, citochina proinfiammatoria, porta alla produzione di IFN- $\gamma$ . È stato inoltre visto che IL-18 stimola la produzione di altre citochine proinfiammatorie, chemochine e l'attivazione di fattori di trascrizione, ed ha un ruolo protettivo durante le infezioni micobatteriche. Un'altra citochina che ha analogie nella sua attività biologica con IL-12 è IL-15. Sintetizzata principalmente da monociti e macrofagi, IL-15 è in grado di stimolare la proliferazione e l'attivazione delle cellule T e delle cellule NK.

Oltre a queste citochine proinfiammatorie, in corso di tubercolosi possono essere prodotte anche citochine anti-infiammatorie, come possibile meccanismo di difesa dal danno immunopatologico (vanCrevel R. et al., 2002). Tra queste c'è l'IL-10, che viene prodotta dai macrofagi in seguito alla fagocitosi di *M. tuberculosis* dopo il legame del LAM micobatterico. In pazienti con tubercolosi, l'espressione del mRNA di IL-10 è stata vista nelle cellule mononucleari circolanti, nel sito dell'infezione nel fluido pleurale e nel fluido del lavaggio alveolare. Un ruolo cruciale viene svolto anche da TGF- $\beta$  che riduce la risposta delle cellule T antigene-specifiche e sembra neutralizzare la risposta immune cellulo-mediata antitubercolare; i prodotti micobatterici inducono la produzione di TGF- $\beta$  da parte di monociti e cellule dendritiche (Toossi Z. et al., 1998). Come IL-10, anche TGF- $\beta$  è prodotto in eccesso durante il corso della tubercolosi ed è espresso nel sito di infezione.

### **Meccanismi di sopravvivenza intracellulare di *M. tuberculosis***

Più di trenta anni fa Armstrong e Hart (*Armstrong JA. et al., 1975*) hanno dimostrato che fagosomi contenenti *M. tuberculosis*, non riescono a completare il loro ciclo di maturazione. L'inibizione della maturazione del fagolisosoma è considerata una caratteristica distintiva dell'infezione micobatterica e rappresenta un meccanismo chiave attraverso il quale questi patogeni riescono a sopravvivere all'interno dei macrofagi. I fagosomi che contengono micobatteri vivi e virulenti esprimono molecole quali il recettore per la transferrina, molecole MHC di classe II, ed il ganglioside GM1, che sono tipiche di uno stadio di maturazione iniziale del fagosoma (*Clemens DL. et al., 1995*). Questi fagosomi mancano invece, di quelle molecole tipiche di uno stadio maturativo più tardivo, come il recettore per il mannosio (*Xu S. et al., 1994*), la proteasi lisosomiale Catepsina D (*Clemens DL. et al., 1995*) e le H<sup>+</sup>-ATPasi di membrana. Si suppone, inoltre che l'assenza delle H<sup>+</sup>-ATPasi sia la causa della ridotta acidificazione dei fagosomi (*Sturgill-Koszycki S. et al., 1994*) che contengono micobatteri, il cui pH si mantiene tra 6.2 e 6.3, invece di raggiungere un pH di 5.3-5.4 che normalmente si trova nei compartimenti endosomali. Un ruolo fondamentale nell'impedire al fagosoma contenente il micobatterio di fondersi con il lisosoma (*Tailleux L. et al., 2003*) è stato attribuito alla proteina coronina-1, detta anche TACO (tryptophane aspartate-containing coat protein). Poiché normalmente TACO viene rilasciato prima della maturazione del fagosoma in fagolisosoma (*Grogan A. et al., 1997*), il persistere della sua espressione sul fagosoma contenente MTB rappresenta quindi un segno distintivo dell'arresto della maturazione; infatti in macrofagi murini l'espressione di TACO è mantenuta nei fagosomi contenenti micobatteri vivi, mentre viene persa rapidamente da quelli contenenti micobatteri morti, permettendo la successiva fusione al lisosoma (*Ferrari G. et al., 1999*).

La presenza di *M. tuberculosis* nel fagosoma induce inoltre una riduzione dell'espressione di LAMP, della catepsina D e la persistenza di Rab5 (Clemens DL. et al., 1995). La presenza di Rab5 ma non di Rab7 nel fagosoma contenente il micobatterio è indicativa del blocco della maturazione del fagosoma (Deretic V. et al., 1999). La persistenza, inoltre, di *M. tuberculosis* vitale all'interno di queste vescicole, può inibire la processazione degli antigeni micobatterici, e l'associazione a molecole MHC di classe II, impedendo quindi il riconoscimento da parte dei linfociti T helper specifici (Hmama Z. et al., 1998). Inoltre da studi recenti è emerso un importante ruolo di un enzima macrofagico nella risposta anti tubercolare, la fosfolipasi D (PLD). Questo enzima sembra essere coinvolto, infatti, nei processi di maturazione fagolisosomale, rappresentando quindi un punto cruciale nei meccanismi microbicidi e una componente importante nella risposta antimicobatterica innata (Kusner DJ. et al., 2000). Il coinvolgimento della PLD è stato dimostrato nel controllo della crescita intracellulare di *M. tuberculosis*, indotto in seguito a stimolazione con ATP (Kusner DJ. et al., 2001), con sequenze oligonucleotidiche non metilate di tipo CpG (Auricchio G. et al., 2003) e con sfingosina 1-fosfato (S1P) (Garg SK. et al., 2004).

Come abbiamo già visto i fagociti, attivati da  $\text{INF-}\gamma$  e da  $\text{TNF-}\alpha$ , generano NO e gli RNI tramite l'enzima iNOS. In questo contesto il micobatterio attua delle strategie di difesa contro gli RNI che vengono principalmente definite "strutturali". Infatti, è noto che il LAM non mannosilato, tipico dei batteri non virulenti, induce una maggior produzione di  $\text{TNF-}\alpha$  da parte dei macrofagi rispetto al man-LAM (Chatterjee D. et al., 1992), presente nella parete dei ceppi virulenti come H37Rv. Per quanto riguarda invece gli intermedi reattivi dell'ossigeno, i micobatteri sono capaci di evitarne l'azione tossica in vari modi. Il LAM è in grado di inibire gli effetti microbicidi inibendo la protein chinasi C che gioca un ruolo importante nella produzione di ROI

(Chan J. et al., 1991) oppure inibendo la produzione di INF- $\gamma$ , fondamentale per l'attivazione macrofagica. Altri componenti che interferiscono con la produzione dei ROI da parte dei macrofagi sono il fenolglicolipide-I e i sulfatidi. I primi sono diversamente distribuiti nei vari ceppi *M. tuberculosis* (Brennan PJ., 2003), mentre i secondi sono più ampiamente espressi (Bloom B., 1991), comunque entrambi hanno la capacità di diminuire la produzione di ROI in un sistema di coltura macrofagica in vitro.

I macrofagi, dopo aver fagocitato un microrganismo, rispondono con un aumento della concentrazione del  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare, che passa da un livello basale di 50-100 nM a 500-1000 nM (Malik ZA. et al., 2000; Malik ZA. et al., 2003). Mentre l'aumento del  $\text{Ca}^{++}$  citosolico non è coinvolto nella fagocitosi (DiVirgilio F. et al., 1988), diventa fondamentale nei meccanismi effettori dell'immunità innata, come la generazione degli intermedi reattivi dell'ossigeno (Korchak HM. et al., 1988), e la maturazione del fagolisosoma (Malik ZA. et al., 2001; Jaconi ME. et al., 1990; Worth RG. et al., 2003). Mentre nei macrofagi infettati con *M. tuberculosis* vivo, non si evidenzia un aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$ , la fagocitosi di MTB ucciso al calore è seguita da un aumento del  $\text{Ca}^{++}$  citosolico e dalla maturazione dei fagosomi in fagolisosomi. Diverse evidenze dimostrano che l'inibizione dell'aumento del  $\text{Ca}^{++}$  nei macrofagi è fondamentale nella patogenesi della tubercolosi; infatti è stato dimostrato che, durante fagocitosi di MTB, un aumento del  $\text{Ca}^{++}$  citosolico indotto da farmaci, favorisce la maturazione dei fagosomi ed una migliore uccisione intracellulare dei bacilli tubercolari (Malik ZA. et al., 2001). Durante la fagocitosi di MTB ucciso, l'aumento del  $\text{Ca}^{++}$  citosolico è determinato dall'attivazione di un enzima macrofagico, la sfingosina chinasi (Malik ZA. et al., 2003), che catalizza la conversione da sfingosina a sfingosina 1-fosfato, un lipide bioattivo che stimola il

rilascio del  $\text{Ca}^{++}$  dalle riserve intracellulari (Spiegel S. et al., 2002). Inoltre l'attivazione della sfingosina chinasi è accompagnata dalla sua traslocazione dal citoplasma alla regione di formazione del fagosoma. Al contrario, *M. tuberculosis* vivo inibisce l'attivazione della sfingosina chinasi e la sua traslocazione al fagosoma contenente il micobatterio (Kusner DJ., 2005). Questi risultati suggeriscono che la sfingosina chinasi rappresenta, nella patogenesi della tubercolosi, un bersaglio molecolare, la cui inibizione da parte di *M. tuberculosis* determina un arresto della maturazione del fagosoma e dell'attività battericida del macrofagi (Fig 1.12).

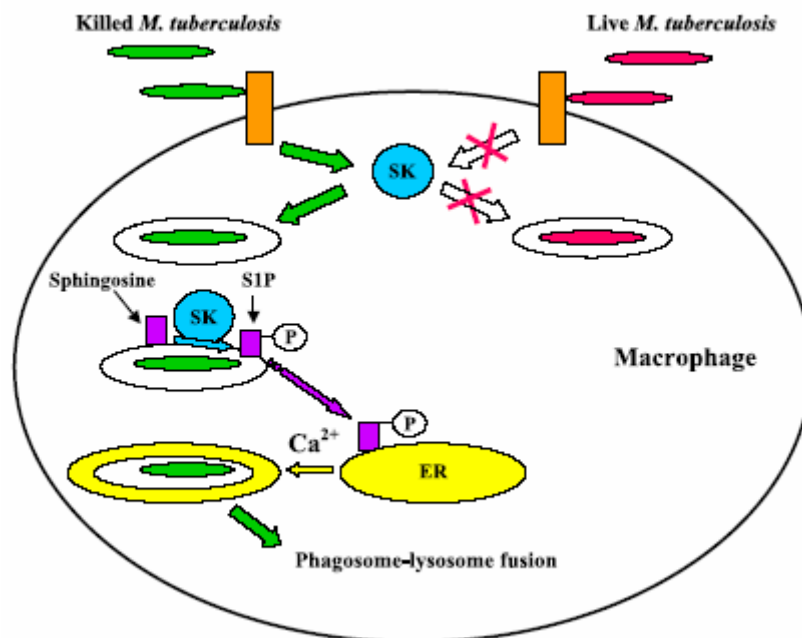


Figura 1.12: Blocco della maturazione del fagolisosoma. (Kusner DJ., 2005)

L'interazione tra micobatteri patogeni e macrofagi rappresenta un interessante esempio di co-evoluzione di agenti infettivi microbici con i propri ospiti. I micobatteri, probabilmente evolvendosi da saprofiti del terreno a microrganismi patogeni, hanno acquisito molti meccanismi per persistere all'interno dei macrofagi. La conoscenza delle tattiche messe in atto dai micobatteri patogeni per sopravvivere

all'interno dei macrofagi, ci potrebbe aiutare a combattere la tubercolosi e le altre malattie micobatteriche.

### **1.7 Sequenze oligodeossinucleotidiche caratterizzate da motivi CpG**

Vista la forte interazione esistente tra il micobatterio e l'immunità innata, analizziamo il ruolo di alcuni ligandi naturali e microbici nella risposta immunitaria antitubercolare.

Il sistema immunitario dei vertebrati ha evoluto meccanismi di difesa innati in grado di riconoscere componenti conservate del mondo microbico. Nei batteri, per esempio, sono presenti all'interno del DNA dei motivi CpG non metilati (Cytosine-phosphate-Guanine) (*Bird A., 1987*). L'attività immunostimolatoria del DNA batterico è dovuta principalmente alla presenza di questi motivi al suo interno, poco frequenti invece nel genoma dei vertebrati, dove le citosine sono tipicamente metilate. I motivi CpG sono riconosciuti dal TLR9, presente al livello del nucleo della cellula. Il legame diretto CpG-DNA sintetico e recettore, attiva cellule dell'immunità quali monociti, macrofagi, cellule dendritiche (DC) e linfociti B, inducendo delle risposte del tutto simili a quelle determinate dal CpG DNA naturale (*Yamamoto S. et al., 1992*). Le sequenze in grado di attivare il TLR9 differiscono per le diverse specie: diversi studi hanno dimostrato, infatti, che molecole di CpG DNA leggermente differenti tra loro attivano in maniera differenziale cellule umane o murine evidenziando così la presenza di un riconoscimento specie-specifico tra i vari TLR-9 (*Bauer S. et al., 2001*). Attualmente il meccanismo con cui le sequenze CpG agiscono, non è stato ancora completamente chiarito. Tuttavia è stato dimostrato che la molecola, una volta somministrata, viene internalizzata in vescicole di cellule competenti mediante un sistema che vede coinvolta l'attivazione della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K),

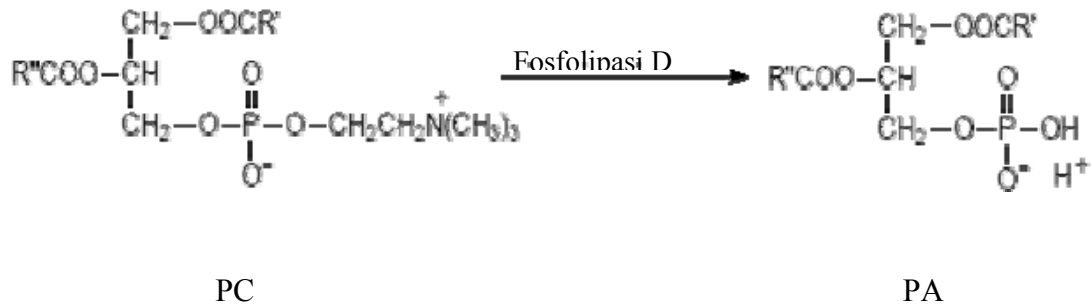


responsabile poi della successiva fusione di tali vescicole con quelle endocitosiche in cui si trova il TLR-9 (*Ishii KJ. et al., 2002*). E' stato dimostrato inoltre, che l'internalizzazione del DNA comporta un'acidificazione delle vescicole endocitosiche e la produzione pH-dipendente dei ROI (*Yi AK. et al., 1998*). Studi condotti su modelli murini mostrano che il trattamento con CpG in topi infettati con MTB induce un notevole aumento nei polmoni dei livelli di IFN- $\gamma$ , a cui era associato una decisa diminuzione della crescita micobatterica (*Juffermans NP. et al., 2002*). Da quanto detto è chiaro quindi che gli oligodeossinucleotidi sintetici mimano non solo molecole di DNA batterico prodotte, probabilmente, in seguito a lisi durante una risposta macrofagica, ma anche l'effetto immunostimolatorio del DNA batterico stesso. Proprio per questo motivo tali sequenze possono essere usate come agenti adiuvanti (*Klinman DM. et al., 1998*) il cui effetto si traduce in un incremento della capacità microbica dei macrofagi, maggior presentazione antigenica (*Shirota H. et al., 2001*), aumento della produzione di citochine infiammatorie e di citochine di tipo Th-1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ ) coinvolte nell'attivazione macrofagica, nello switch isotipico immunoglobulinico (IgM→IgG) e nell'attivazione di una risposta citotossica. Inoltre i motivi CpG sono responsabili dell'attivazione diretta e della conseguente proliferazione dei linfociti B che portano alla produzione di molecole anticorpali (*Branda RF. et al., 1996*). È noto infatti che la somministrazione nei topi di combinazioni vaccino-sequenze CpG, induce una maggiore e più repentina capacità di reagire contro l'inoculo immunogenico (*Moldoveanu Z. et al., 1998; McCluskie MJ. et al., 1998; McCluskie MJ. et al., 2000*), dimostrando così, la capacità del CpG di promuovere una migliore risposta umorale e cellulo-mediata. Oltre all'effetto adiuvante, i motivi CpG esercitano anche un importante ruolo nel prevenire le reazioni di ipersensibilità di tipo I (anafilassi) e nella terapia antitumorale. La

capacità, infatti, di indurre principalmente citochine di tipo Th-1, riduce lo sviluppo di una risposta umorale Th-2, prevenendo il rilascio di citochine come IL-4 e IL-5 e la conseguente produzione di anticorpi quali le IgE, riducendo così la suscettibilità allo sviluppo delle allergie (*Sur S. et al., 1999; Kline JN., 1998; Horner AA. et al., 2001*). Per quanto riguarda l'attività antitumorale risulta, invece, fondamentale la sua capacità di attivare i linfociti T citotossici e le cellule NK.

### **1.8 Acido fosfatidico (PA)**

Tra i ligandi naturali annoveriamo l'acido fosfatidico (PA), un lipide che, pur non essendo abbondante nelle cellule degli organismi viventi, è estremamente importante per la formazione di triacilglicerolo e di altri fosfolipidi. Si tratta di una molecola acida che presenta una carica negativa, così da richiedere uno ione positivo per stabilizzarsi. La via di sintesi più comune nei tessuti animali prevede l'acilazione sequenziale dell' $\alpha$ -glicerofosfato derivato dal catabolismo del glucosio, utilizzando l'acil-CoA degli acidi grassi. Aciltransferasi specifiche catalizzano dapprima l'acilazione in posizione sn-1 a formare l'acido lisofosfatidico (1-acil-sn-glicerol-3-fosfato) e poi in posizione sn-2 a dare il PA. In altri casi, il PA può essere prodotto a partire dal diacilglicerolo per azione di una diacilglicerolo chinasi. Tuttavia ancora più importante è la via di sintesi per idrolisi, catalizzata dall'enzima fosfolipasi D, a partire da fosfolipidi come la fosfatidilcolina (PC) (Fig 1.13).



**Fig 1.13: Biosintesi dell'acido fosfatidico PLD-dipendente**

In questa reazione i residui di istidina della PLD idrolizzano la PC, generando colina e un fosfatidilenzima intermedio (PLD-PA intermedio) (Stuckey JA. et al., 1999). Quest'ultimo è idrolizzato da una molecola d'acqua e il PA viene rilasciato.

Il PA generato dalla fosfolipasi D può essere coinvolto come secondo messaggero nella trasduzione del segnale (English D. et al., 1996). La sua produzione è stata correlata a stimoli proliferativi, di differenziamento e nella sopravvivenza cellulare (Huang P. et al., 2007). Appare inoltre coinvolto nella regolazione del traffico di membrana e nella fagocitosi (Corrotte M. et al., 2006), nell'attivazione dell'enzima NADPH ossidasi (Perisic O. et al., 2004), che agisce durante l'infiammazione nei meccanismi difensivi e protettivi contro il danno tissutale. L'acido fosfatidico, inoltre, gioca un ruolo chiave nel promuovere l'attivazione della fosfolipasi A2 (PLA2), fosfolipasi C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) e fosfatidil-inositolo-4-chinasi (PI-4-K) (English D. et al., 1996). Il PA gioca un ruolo chiave anche a livello della membrana, dove il cambiamento qualitativo nella composizione lipidica, dovuto alla presenza locale di PLD, genera un arricchimento di molecole di PA di forma conica (dovuta alle piccole dimensioni della sua testa polare) che rimpiazzano molecole di PC di forma cilindrica. Tale evento favorisce la curvatura della membrana necessaria per i processi di formazione delle vescicole endocitiche e di fusione delle vescicole secretorie. Oltre alle implicazioni dovute prettamente alla sua struttura fisica, il PA può essere

convertito in DAG (diacil-glicerolo) dall'enzima fosfatidato-fosfolipasi. Il DAG così generato può concorrere all'attivazione della protein kinasi C (PKC), che potrebbe promuovere la fagocitosi, mediata dai recettori del complemento (*Fallman M. et al., 1992*). La PLD è fortemente attivata dalla PKC ma malgrado gli inibitori della PKC possano portare ad un totale o parziale blocco della stimolazione della PLD mediata da agonisti in molti tipi cellulari, è comunque comprovata l'esistenza di vie PKC-indipendenti per la regolazione della fosfolipasi (*Exton JH., 1999*).

L'acido fosfatidico può interagire con altre proteine sia nella membrana stessa che nel citoplasma, attivando enzimi come la fosfatidilinositol 4-fosfato 5-chinasi (PI-4,5-K), oppure può servire per l'ancoraggio di proteine coinvolte nel traffico di membrana. Inoltre, si è visto che in presenza di ioni calcio, l'acido fosfatidico coadiuva efficientemente la fusione tra membrane. Infine, l'acido fosfatidico può anche venir convertito in acido lisofosfatidico o in diacilglicerolo (*Liscovitch M. et al., 2000*), entrambi coinvolti in altri meccanismi di signalling. In conclusione l'acido fosfatidico è coinvolto in numerosi processi biologici (*Moolenaar WH., 1999*) tra cui la proliferazione, migrazione e sopravvivenza cellulare, l'aumento della permeabilità vascolare, il rimodellamento dei neuriti, l'inibizione delle comunicazioni GAP-dipendenti, la riparazione del danno tissutale, la vasocostrizione, l'aumento di IL- $\beta$  e TNF- $\alpha$  nel sistema monocito-macrofagico (*Lee H. et al., 2002*).

## 1.9 Acido lisofosfatidico (LPA)

Il più semplice glicerofosfolipide è l'acido lisofosfatidico (LPA) (Fig 1.14), un importante precursore nella biosintesi di fosfolipidi in cellule eucariotiche e procariotiche. LPA è coinvolto in molteplici processi biologici (*Moolenaar WH., 1999*) come proliferazione migrazione e sopravvivenza cellulare, aumento della permeabilità vascolare, rimodellamento dei neuriti ed inibizione delle comunicazioni GAP-dipendenti.

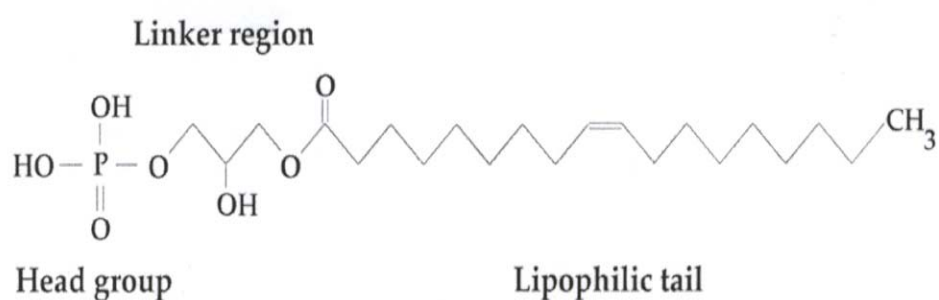


Fig 1.14: Acido lisofosfatidico

Un'altra importante funzione biologica in cui è coinvolto LPA è il riparo del danno tissutale. E' noto infatti che LPA stimola la proliferazione e la migrazione delle cellule mesenchimali ed epiteliali, un'azione vasocostrittrice, un aumento nella produzione di metallo-proteasi di matrice e di IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  nel sistema monocita-macrofagico (*Lee H. et al., 2002*).

Da un punto di vista strutturale, l'acido lisofosfatidico è un metabolita costituito da tre domini specifici (*Hopper DW. et al., 1999*): una testa con gruppo fosfato, una regione linker (glicerolo) e una coda lipofilica (catena di acido grasso). LPA agisce attraverso le classiche vie di traduzione del segnale, ma anche mediante l'attivazione delle GTPasi della famiglia Ras e Rho, che rispettivamente controllano la proliferazione-migrazione e la morfogenesi cellulare.

Le vie biologiche coinvolte nella produzione di LPA sono molte (Fig 1.14), ma la più semplice è la via che coinvolge la degradazione dell'acido fosfatidico, che si accumula nelle cellule attivate e viene degradato dalla fosfolipasi A2 (PLA2) (Fourcade O. et al., 1995; Gaits F. et al., 1997). Si suppone che la sintesi di LPA abbia inizio con il rilascio di microvescicole membranose ricche di PA, formatosi in seguito all'azione della diacil-glicerolo chinasi (Fourcade O. et al., 1995). Il loro prodotto finale, il DAG, viene deacilato a monoacilglicerolo (MAG) grazie ad una lipasi, e lo stesso MAG viene decilato o fosforilato a LPA (Gaits F. et al., 1997). Una seconda via di sintesi di LPA riguarda la produzione di PA attraverso l'azione della fosfolipasi D, che nei batteri idrolizza la lisofosfatidilcolina (Lyso-PC), producendo LPA nella parte esterna della membrana delle sue cellule bersaglio (van Dijk MCM. et al., 1998). In cellule sane LPA è sintetizzata in seguito alla stimolazione di recettori della membrana plasmatica o di altre proteine di superficie. Nelle cellule tumorali, invece, la sintesi di LPA è indotta spontaneamente. I macrofagi ed i fibroblasti sono capaci di produrre LPA (Goetzl EJ., 2001), ma le piastrine ne sono la sorgente principale e rappresentano la maggior fonte di LPA nel sangue (Le Balle F. et al., 1999). La maggior parte di LPA è il prodotto di rilascio delle PLA1, PLA2 e Lyso-PLD, attraverso tagli sequenziali della membrana e fosfolipidi del siero (Sano T. et al., 2002).

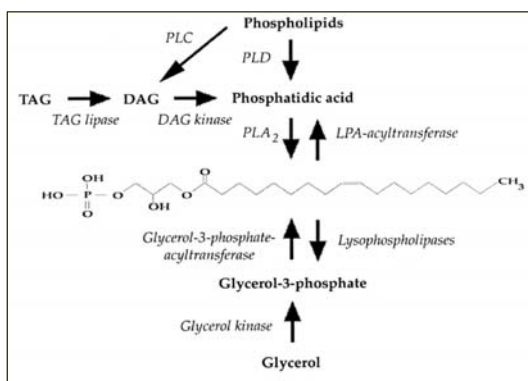


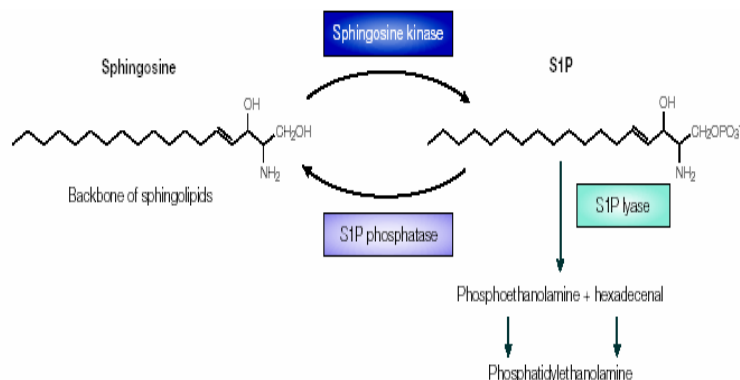
Fig 1.14: Sintesi e degradazione di LPA

LPA è legato e trasportato da proteine leganti lipidi intracellulari ed extracellulari, al fine di regolarne la libera concentrazione e di evitarne i livelli tossici (*Pagès C. et al., 2001*). Nel plasma, infatti, LPA si lega maggiormente all'albumina e a lipoproteine (*Takuwa Y. et al., 2002*). Tale legame lo preserva dalla digestione enzimatica delle fosfolipasi del siero (*Tigyi G. et al., 1992*). I recettori specifici di LPA sono: Edg2 (Endothelial differentiation gene), un recettore umano analogo a quello murino Vz1; Edg4 e Edg7, sottotipi recettoriali caratterizzati più tardi. Tali sottotipi, scoperti nelle piastrine umane (*Motoashi K. et al., 2000*), appartengono alla famiglia di recettori di membrana accoppiati alle proteine G (GPCRs) ed identificati tutt'ora con la seguente nomenclatura: LPA1 per Edg2, LPA2 per Edg4, LPA3 per Edg7. Questo gruppo di recettori presenta circa il 35% d'identità al secondo gruppo di recettori (S1P)1-5 detti Edg1, Edg3, Edg5, Edg6, Edg8 (*Lynch KR. et al., 1999; Chun J. et al., 2000*).

Il legame di LPA ai suoi recettori può attivare una serie di vie di trasduzione molecolari e l'attivazione può essere Ras o protein-kinasi C-dipendenti: questo dipende dal tipo cellulare o recettore coinvolto (*Luttrell LM. et al., 1996*). LPA si è mostrata capace di aumentare la concentrazione di cAMP (adenosin-monofosfato-ciclico) e ciò in risposta all'attivazione di proteine G e recettori LPA3 (*Bandoh K. et al., 1999*). L'efficacia di LPA dipende dalla sua concentrazione locale e dalla distribuzione dei recettori. Inoltre, produzioni eccessive di LPA nei fluidi corporei e sulle superfici cellulari possono essere coinvolte in diverse patologie. Il livello di LPA, ad esempio, nei fluidi circondanti i tessuti risulta elevato nell'arteriosclerosi, nel danno della cornea, nel danno del parenchima polmonare e nel cancro delle ovaie (*Wang DA. et al., 2001*).

## 1.10 Sfingosina 1-fosfato (S1P)

La sfingosina 1-fosfato (S1P) è un importante sfingofosfolipide formato da un aminoalcol insaturo, un acido grasso, un acido fosforico e una base azotata. S1P viene sintetizzato all'interno della cellula tramite l'azione della ceramidasi, che a partire dalla ceramide (precursore degli sfingofosfolipidi costituito da una lunga catena sfingoide con gruppi di acidi grassi lunghi 16-24 atomi di carbonio) porta alla formazione di sfingosina. Quest'ultima viene poi fosforilata dalla sfingosina chinasi in sfingosina 1-fosfato (*Spiegel S. et al., 1996*) (Fig 1.15).



**Figura 1.15: Sintesi e degradazione di S1P**

Il livello di S1P all'interno della cellula è piuttosto basso. Tale livello viene regolato in maniera spazio temporale tra la sua sintesi e la sua degradazione dalla sfingosina fosfatasi o da una liasi microsomiale localizzata nel reticolo endoplasmatico (*van Venthoven PP. et al., 1991*) che porta alla formazione di trans-2-esadecanolo e fosforiletanolamina.

La funzione della sfingosina 1-fosfato è molto diversa sia da quella della ceramide che da quella della sfingosina da cui deriva: è infatti coinvolta in vari processi quali la



proliferazione cellulare, la sopravvivenza, il differenziamento, l'apoptosi (*Payne SG. et al., 2002*) e, come è stato recentemente dimostrato, nel traffico dei linfociti B e T e nella regolazione dello sviluppo di questi ultimi (*Jolly P. et al., 2002; Mandala S. et al., 2002; Brinkmann V. et al., 2002*). Questi processi sono a loro volta associati a vari eventi di trasduzione del segnale (*Spiegel S. et al., 1996; Igarashi Y., 1997; Hla T. et al., 1999*). La S1P agisce sulle cellule sia come secondo messaggero intracellulare sia come mediatore extracellulare esplicando un'azione autocrina o paracrina. Oltre ad avere funzioni extracellulari, la S1P svolge anche un ruolo da secondo messaggero nella regolazione della proliferazione, nella sopravvivenza, nella omeostasi del calcio e nella soppressione dell'apoptosi (*Spiegel S. et al., 2000*). Inoltre la S1P è coinvolta anche in una via di trasduzione attivata da potenti fattori di crescita, come il fattore di crescita delle piastrine (PDGF) e il siero fetale bovino (FBS) che porta alla proliferazione cellulare (*Olivera et al., 1993*). Di recente è stato proposto un modello per l'induzione dell'apoptosi che coinvolge il bilancio tra la ceramide e la sfingosina, che mediano l'arresto della crescita in molti tipi cellulari, e la sfingosina 1-fosfato che promuove la proliferazione e la sopravvivenza. L'azione di una fosfolipasi caratterizzata e clonata recentemente (*Mandala SM. et al., 2000*), in seguito a stimoli di stress, fa diminuire i livelli di S1P della cellula, aumenta quelli della sfingosina e della ceramide promuovendo così l'apoptosi, mentre fattori di sopravvivenza stimolano la sfingosina chinasi, aumentando il livello di sfingosina 1-fosfato che inibisce il processo di apoptosi (*Cuvillier O. et al., 1996*).

Quando presente nell'ambiente extracellulare, la S1P stimola le cellule tramite alcuni recettori Edg (-1 -3, -5, -6 ed -8) presenti sui vari tipi cellulari (*Hla T. et al. 2001*). Questi recettori, accoppiati a proteine G, sono espressi in maniera diversa dai vari tessuti e regolano diverse vie di traduzione del segnale: tra queste ricordiamo

l'attivazione delle protein chinasi (Pyne SG. et al., 2000), della fosfolipasi C, della fosfolipasi D (Desai NN. et al., 1992) e del riarrangiamento Rac-dipendente del citoscheletro (Pyne SG. et al., 2000). La funzione della S1P extracellulare maggiormente studiata è la regolazione della migrazione cellulare e il suo ruolo nell'angiogenesi. La S1P stimola la migrazione delle cellule endoteliali (Wang F. et al., 1999) e delle cellule vascolari del muscolo liscio (Boguslawsky G. et al., 2002; Hobson JP. et al., 2001) eventi fondamentali nella formazione e nell'estensione dei vasi sanguigni. Questi eventi sembrano essere mediati principalmente dal legame di S1P al recettore Edg1. Inoltre la S1P può anche agire nel controllo del reclutamento delle cellule infiammatorie stimolando la migrazione delle cellule nel sito d'infezione ed aiutando la modulazione della risposta immunitaria mediante l'inibizione del TNF- $\alpha$  e dell'IL-12 e l'induzione della produzione dell'IL-10 da parte di cellule dendritiche immature stimulate con liposaccaride (LPS) (Idzko M. et al., 2002). Infine è stata recentemente dimostrata la produzione d'intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) da parte dei macrofagi alveolari in seguito a stimolazione con S1P, suggerendone un ruolo come attivatore fisiologico di queste cellule (Hornuss C. et al., 2001). Così come l'Edg1 anche l'Edg3 sembra essere coinvolto nel riarrangiamento del citoscheletro e nei movimenti della membrana plasmatica (Banno Y. et al., 2001); inoltre il legame di S1P ad Edg3 diminuisce l'espressione di Bax, classica proteina pro-apoptotica. Molto meno si conosce sul recettore Edg5, espresso sugli oligodendrociti e astrociti, dove la S1P inibisce attivazione delle ERK (chinasi regolata dai segnali extracellulari) e la proliferazione cellulare (Malek RL. et al., 2001). Non è comunque da escludere un ruolo S1P/Edg5 nello sviluppo del sistema nervoso (Spiegel S. et al., 2000). La S1P è anche un importante costituente del plasma, viene infatti rilasciata da piastrine attivate (Yatomi Y. et al., 2000) o da

mastociti. Le piastrine hanno una grande quantità di sfingosina chinasi e nessuna attività di lisi per la degradazione di S1P. Nel plasma la sfingosina 1-fosfato è associata a lipoproteine quali LDL (Low Density Lipoprotein), HDL (High Density Lipoprotein) nella quantità rispettivamente di 100-200 pmoli/mg di proteina, e in quantità molto minore nelle lipoproteine a densità molto bassa (Very Low Density Lipoprotein), con una concentrazione fisiologica totale di 200 nM (Murata N. et al., 2000). In questo contesto un ruolo citoprotettivo di S1P associata a HDL è stata dimostrato nelle cellule endoteliali del cordone ombelicale umano (Kimura T. et al., 2001). In alcuni studi, il polmone è stato descritto come il tessuto contenente la maggior quantità di S1P (Murata N. et al., 2000; Murata N. et al., 2002); questo suggerisce che la S1P può rappresentare un componente della mucosa polmonare deputato alla regolazione della risposta infiammatoria locale. Recentemente è stato dimostrato un ruolo della S1P nell'attivazione della risposta antimicobatterica innata. In particolare, la S1P induce l'uccisione intracellulare di *M. tuberculosis* attraverso un meccanismo che coinvolge l'attivazione della PLD e la maturazione fagolisosomiale (Garg SK. et al., 2004).

Inoltre, è stato recentemente dimostrato che, livelli di S1P nel surfattante alveolare di soggetti affetti da tubercolosi, sono significativamente minori rispetto a quelli rilevati nel surfattante di pazienti di controllo (Garg SK. et al., 2006) e la stimolazione con S1P in cellule di lavaggio broncoalveolare proveniente da pazienti con tubercolosi, induce l'uccisione intracellulare del micobatterio endogeno. Infine, il trattamento *in vivo* con S1P, riduce la crescita micobatterica e il danno tissutale polmonare.

## 1.11 Scopo della tesi

Il primo obiettivo di questo studio è stato quello di valutare il ruolo di ligandi naturali, quali S1P e LPA, e ligandi d'origine microbica come il CpG nella risposta immunitaria innata antitubercolare in macrofagi e cellule epiteliali alveolari. A tal fine, in seguito a stimolazione con i diversi ligandi, abbiamo analizzato:

- l'attività anti-micobatterica di cellule della linea monocito/macrofagica THP-1 ed di una linea cellulare dell'epitelio alveolare, A549, infettate con il ceppo patogeno di *M. tuberculosis* H37Rv e stimulate con i diversi ligandi;
- il ruolo del Ca<sup>++</sup> e della PLD nell'attivazione dei meccanismi micobattericidi;
- la biogenesi del fagolisosoma in cellule A549 e THP-1 infettate con *M. tuberculosis*;
- l'efficienza di LPA nell'indurre azione micobattericida in campioni di lavaggio bronco-alveolare (BAL), provenienti da pazienti con tubercolosi polmonare attiva;
- la disseminazione micobatterica *in vivo* in topi infettati aerogenicamente con *M. tuberculosis*.

Ottenuti questi risultati, abbiamo quindi provato a ripristinare, all'interno del macrofago infettato con MTB, parte di quei segnali inibiti dal micobatterio. A tal fine abbiamo prodotto liposomi in grado di veicolare all'interno della cellula ospite, molecole capaci di ripristinare la corretta risposta antimicobatterica, e che potessero essere riconosciuti in assenza di segnali proinfiammatori. A questo scopo, sono stati prodotti liposomi che avessero nello strato interno acido fosfatidico, chiave nell'attivazione dei meccanismi micobattericidi, e all'esterno fosfatidilserina, fosfolipide in grado di potenziare la fagocitosi legandosi ai recettori per la fosfatidilserina presenti sui fagociti. Prodotto dalla PLD, il PA è coinvolto infatti

nelle vie di trasduzione del segnale di S1P, LPA e CpG. Abbiamo quindi valutato in cellule macrofagiche:

- l'efficienza dell'internalizzazione dei liposomi all'interno di cellule THP-1 tramite analisi in microscopia a fluorescenza e microscopia confocale a fluorescenza;
- la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte delle cellule della linea monocito-macrofagica (THP-1) dopo stimolazione con i liposomi bioattivi;
- la capacità dei liposomi di mobilizzare il  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare;
- il ruolo della maturazione del fagolisosoma nell'attività antimicobatterica indotta dai liposomi;
- la risposta micobattericida di macrofagi infettati con MTB e stimolati con i liposomi.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Batteri

Il ceppo patogeno *M. tuberculosis* H37Rv è stato coltivato in terreno liquido Middlebrook 7H9 (Difco) arricchito con 10% ADC (albumina, destrosio, catalasi) a 37° C, in un'atmosfera umidificata e con il 5% di CO<sub>2</sub>. I batteri sono stati poi raccolti, sospesi in PBS (phosphate buffer saline) 0.15 M pH 7.2 sterile e conservati a -80° C fino al momento dell'uso. Prima dell'infezione, aliquote del ceppo micobatterico sono state fatte crescere in piastre contenenti agar 7H10 arricchito con 10% OADC (acido oleico, albumina, destrosio, catalasi). Il numero delle unità formanti colonie (CFU) è stato rilevato dopo 21 giorni di coltura. Dal numero delle colonie si è potuto risalire, attraverso gli opportuni fattori di diluizione, alla concentrazione delle aliquote originali.

### 2.2 Colture cellulari

Per gli studi *in vitro* sono state utilizzate due linee cellulari: THP-1 e A549 come modello rispettivamente di monociti/macrofagi e di cellule epiteliali alveolari. Le cellule THP-1 sono state coltivate in terreno completo (RPMI 1640 contenente 10% di siero fetale bovino, 5µg/ml di gentamicina, 2mM L-glutamina) addizionato con 1mM di aminoacidi non essenziali e 1mM di sodio piruvato e propagate due volte alla settimana in fiasche di polistirene da 25 cm<sup>2</sup>. Le cellule A549 sono state coltivate allo stesso modo e nello stesso terreno, senza l'aggiunta di aminoacidi non essenziali e sodio piruvato. In alcuni esperimenti, come modello di macrofago alveolare sono state utilizzate THP-1 differenziate (dTHP-1) per 48 ore con 20ng/ml di forbole12-miristato 13-acetato (PMA). In particolare, per i singoli esperimenti le cellule A549 e

dTHP-1 sono state seminate rispettivamente in piastre da 6 e 24 pozzetti ad una concentrazione di  $5 \times 10^5$  cellule per pozzetto e lasciate crescere per tre giorni fino a confluenza e ad una concentrazione finale di  $10^6$  cellule per pozzetto.

### **2.3 Preparazione di liposomi asimmetrici e analisi citofluorimetrica**

Le vescicole asimmetriche sono “bilayers” composti da un foglietto lipidico esterno e uno interno. I principi fondamentali sui quali si fonda il metodo utilizzato per ottenere le vescicole costituite da doppio strato fosfolipidico sono: la separazione tra fasi più o meno polari e la forza centrifuga che genera migrazione forzata di qualsiasi particella.

Affinché si possano ottenere le vescicole occorre preparare due diversi tipi di sospensione lipidica: uno per il monostrato esterno e uno per il monostrato interno.

La sospensione per il foglietto interno viene preparata all'interno di una bottiglia di vetro da 100ml. Vengono versati al suo interno 50ml di dodecano anidro (Sigma) e una soluzione fosfolipidica tale da raggiungere una concentrazione finale di 0,05 mg/ml. La miscela contenente dodecano e lipidi è stata sonicata in bagnetto sonicatore per 30 minuti e lasciata a temperatura ambiente per 16-18 ore. Successivamente sono stati aggiunti, alla soluzione ottenuta nella bottiglia, 250  $\mu$ l di una soluzione acquosa costituita da 100 mM di NaCl e 5 mM di tampone Tris. Quanto ottenuto viene agitato con un magnete per 3 ore al fine di ottenere una popolazione eterogenea di piccole goccioline (circondate da fosfolipidi con la testa idrofilica verso il centro della goccia e la coda idrocarburica rivolta alla soluzione di dodecano apolare). Per questo lavoro abbiamo realizzato vescicole che presentassero nel foglietto interno l'acido fosfatidico (PA) (vescicole candidate ad agente terapeutico) e altre che avessero all'interno la fosfatidilcolina (PC) come controllo negativo.

La sospensione per il foglietto esterno viene preparata all'interno di un tubo da centrifuga da 50ml e consta di 99 parti di dodecano anidro e 1 parte di olio di silicone. In questa soluzione viene aggiunta una quantità di fosfolipidi tale da ottenere anche qui una concentrazione lipidica di 0,05mg/ml. I fosfolipidi utilizzati per il monostrato esterno sono fosfatidilserina (PS) o fosfatidilcolina (PC).

Le vescicole realizzate sono quindi di 4 tipi:

PSesterno/PAinterno (PS/PA)

PSesterno/PCinterno (PS/PC)

PCesterno/PAinterno (PC/PA)

PCesterno/PCinterno (PC/PC)

Le vescicole vengono ottenute ponendo all'interno di un tubo da centrifuga da 50ml nell'ordine:

3ml di PBS o di terreno RPMI 1640 completo (qualora si realizzassero vescicole da somministrare alle cellule),

2ml di sospensione per il foglietto esterno,

100µl di sospensione per il foglietto interno.

La quantità di liposomi prodotti è stata estrapolata al citofluorimetro calcolando gli eventi acquisiti al minuto ad una velocità di acquisizione HIGH (60 µL/min). Essendo la quantità degli eventi dipendente anche dalla purezza del mezzo utilizzato come soluzione acquosa di raccolta, è stato parallelamente acquisito un campione di sola fase di raccolta (PBS o Terreno RPMI 1620 completo), privo di liposomi, e il numero degli eventi è stato sottratto al numero degli eventi corrispondente al campione di vescicole in esame. Malgrado tale misurazione non abbia un'elevatissima precisione, l'eventuale errore nella quantificazione è conservato nel tempo, per cui è stato utilizzato nel calcolo della quantità di vescicole prodotte.



In alcuni esperimenti, per analizzare l'effettiva presenza di fosfatidilserina all'esterno dei bilayers, i liposomi PS/PA sono stati marcati con Annexina V-FITC (Apoptotic Kit - Alexis Biochemicals), proteina che lega la fosfatidilserina in maniera  $Ca^{++}$  dipendente. Vescicole che presentassero PS/PA sono state realizzate in PBS e centrifugate a 1100 g per 5 minuti. Dopo l'eliminazione del PBS, le vescicole sono state risospese in 390 $\mu$ L di Binding Buffer (presente nel kit) e 15  $\mu$ L di Annexina V fluorescente, e incubate per 10 minuti al buio a temperatura ambiente. Dopo aver centrifugato a 1100 g per 5 minuti, sono state risospese in 600 $\mu$ L di PBS e acquisite al citofluorimetro. L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita utilizzando un citofluorimetro FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry System) supportato dal software Cell Quest.

## **2.4 RT-PCR**

Le cellule dTHP-1 sono state stimulate con lo stesso numero di liposomi PS/PA e incubate per 18 ore a +37 °C, in atmosfera umidificata con il 5% di CO<sub>2</sub>. Quindi sono state analizzate attraverso Real Time-PCR per rilevare i livelli di RNA di diverse citochine. Tale studio è stato effettuato in collaborazione con il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma. L' RNA totale è stato estratto da 1x10<sup>6</sup> cellule utilizzando RNeasy Kit (Qiagen) seguendo le specifiche tecniche, e l'analisi è stata condotta con il sistema ABI Prism 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems).

## **2.5      Analisi della tossicità**

In alcuni esperimenti abbiamo valutato l'analisi della morte cellulare sulle cellule A549, tramite saggio con 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil tetrazolio bromide (MTT). Il saggio con MTT (Molecular Probe) si basa sulla riduzione intracellulare dei Sali di tetrazolio, da parte dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi (SDH) in cristalli di un prodotto bluastro denominato formazano, riduzione che può essere prodotta solo in cellule metabolicamente attive. Tale saggio è stato condotto secondo le linee guida indicate nel manuale d'uso.

## **2.6      Analisi fluorimetrica per il rilevamento dei flussi di Ca<sup>++</sup>**

Per rilevare l'eventuale aumento di Ca<sup>++</sup> all'interno della cellula stimolata, le cellule sono state incubate al buio per 1 ora e a 37°C con il fluoroforo Fluo 3/AM (Molecular Probes) a una concentrazione di 3µM. Le cellule sono state successivamente lavate in PBS e centrifugate a 660 x g per 5 minuti, risospese in terreno RPMI 1640 completo e messe in cuvetta ad una concentrazione di 10<sup>5</sup> cellule/ml. La fluorescenza massima (controllo positivo) è stata determinata stimolando le cellule con 50 ng/ml di forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA), la minima invece è stata associata alle cellule non trattate (controllo negativo). Le cellule A549 sono state poi stimolate con 0.5µM di S1P o LPA (Calbiochem), o con 1µM di CpG o GpC (ATC GAC TCT CGA GCG TTC TC ed ATG CAC TCT GCA GGC TTC TC rispettivamente; Primm). Le THP-1 sono state stimolate con 1µM di CpG o GpC. I liposomi sono stati somministrati alle THP-1 ad una concentrazione tale che ogni cellula ricevesse in media due vescicole. La determinazione dell'incremento di Ca<sup>++</sup> è stata rilevata nel caso dei ligandi dopo pochi minuti, nel caso dei liposomi dopo 20, 40 e 90 minuti dalla somministrazione dello stimolo. La fluorescenza è stata

monitorata utilizzando un fluorimetro Perkin Elmer LS50 B con l'ausilio del software FL-WinLab, fissando la lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione rispettivamente a 505 nm e 530 nm. In alcuni esperimenti, allo scopo di verificare un eventuale ruolo del  $\text{Ca}^{++}$  nell'attivazione della PLD, le cellule sono state preincubate per 15 minuti con 2 mM EDTA o con 3mM di EGTA (Calbiochem), o per 30 minuti con 20  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM (Sigma), rispettivamente, chelanti extra cellulari ed intracellulari del  $\text{Ca}^{++}$ .

## **2.7 Analisi dell'attività della PLD**

L'analisi dell'attività della fosfolipasi D sulle cellule è stata effettuata utilizzando il kit Amlex Red Phospholipase D assay (Molecular Probes), secondo le linee guida indicate nel manuale d'uso.

## **2.8 Western blotting**

In alcuni esperimenti l'espressione della Catepsina D, un marker della maturazione fagolisosomiale, è stata misurata attraverso l'analisi del Western blotting. In breve le cellule dTHP-1, coltivate in terreno completo, sono state stimulate o no con 5 $\mu\text{M}$  di LPA in presenza o assenza di etanolo allo 0.3% a 37°C. Dopo 24 ore dalla stimolazione le cellule sono state sospese in un buffer di lisi contenente 100mM di Tris/HCl (pH 7.4), 2mM di EDTA, 100mM di NaCl, 1% di Nonidet P40, 0.1% di SDS, 2000 unità/ml di apoproteina, 1mM di PMSF (PhenylMethylSulphonyl Fluoride), 100 $\mu\text{M}$  di leupeptina, 50  $\mu\text{M}$  di pepstatina A e 10mg/ml di IAA (Indole Acetic Acid). A questo punto 10 $\mu\text{g}$  totali di proteina sono stati separati tramite SDS-PAGE (gel al 12%) e trasferiti alla membrana di nitrocellulosa. I filtri sono stati poi incubati per una notte a 4°C con un anticorpo murino monoclonale anti-catepsina D

umano (Becton Dickinson), e per altre due ore con un anticorpo coniugato a HRP (HorseRadish Peroxidase) che riconosca la porzione murina (Bio-Rad). Il segnale è stato poi sviluppato usando un substrato ECL (Enhanced ChemiLuminescence) per HRP ed esposto ad una pellicola CL-Xposure (Pierce).

## **2.9 Protocollo d'infezione e valutazione della crescita di *M. tuberculosis***

I batteri, conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sono stati scongelati a temperatura ambiente e lavati 3 volte in PBS centrifugandoli a 10.000 rpm per 5 minuti. Successivamente i batteri sono stati risospesi in un volume di 10 ml di RPMI completo e trasferiti in tubi di pirex, per essere sonicati per 3 minuti in un bagnetto sonicatore, in modo da eliminare gli eventuali aggregati batterici. Dopo aver effettuato le opportune diluizioni della sospensione batterica, le cellule sono state infettate con  $10^6$  batteri per pozzetto, in modo da ottenere una molteplicità d'infezione (MOI) di 1 batterio/cellula. Dopo 3 ore sono stati effettuati 3 lavaggi con RPMI caldo per rimuovere i batteri extracellulari e bloccare così l'infezione. Allo scopo di valutare la capacità della S1P, LPA o CpG nell'indurre un effetto micobatterida, le cellule THP-1 e A549, sono state risospese in terreno completo e stimulate rispettivamente con  $5\mu\text{M}$  e con  $0.5\mu\text{M}$  di S1P o LPA, o con  $1\mu\text{M}$  di CpG o GpC e incubate a  $37^{\circ}\text{C}$ , in atmosfera umidificata e con il 5% di  $\text{CO}_2$ , per i tempi indicati di volta in volta. Nel caso dei liposomi, alle THP-1 sono state somministrate le vescicole in un numero pari al doppio delle cellule presenti nel pozzetto. In alcuni esperimenti, al fine di studiare il coinvolgimento della PLD nel controllo della crescita intracellulare di *M. tuberculosis* indotto dai tre ligandi nelle THP-1 e A549, queste cellule sono state infettate con *M. tuberculosis* e stimulate con S1P, LPA o CpG in presenza di un alcool primario, etanolo allo 0.3% o 1-butanolo allo 0.3% (Fulka), come inibitori

della normale attività PLD, oppure dell'alcool secondario 2-butanolo allo 0.3% (Fulka) come controllo negativo. In altri esperimenti, allo scopo di valutare il coinvolgimento della maturazione del fagolisoma nell'attività micobattericida indotta dalla S1P, LPA e liposomi, le cellule sono state trattate con i nostri stimoli in presenza e assenza di Cloroquina (Cq) 10 $\mu$ M o cloruro d'ammonio (NH<sub>4</sub>Cl) 20mM, inibitori della maturazione fagosomiale. Infine allo scopo di valutare se la stimolazione con LPA e S1P di cellule epiteliali alveolari possa ridurre la disseminazione micobatterica verso i macrofagi, le cellule A549 sono state infettate o meno con MTB ad una MOI di 10 e stimulate per 2 giorni con i lisofosfolipidi. Successivamente i supernatanti sono stati raccolti e centrifugati a 14000 rpm per 5 minuti. Il pellet contenente i micobatteri è stato poi risospeso in RPMI completo e somministrato alle cellule dTHP-1 per 4 giorni.

Ai tempi indicati in ogni singolo esperimento, le cellule sono state risospese in 1 ml di PBS sterile e saponina allo 0.1% ed incubate a 37°C per 30 minuti. Dopo l'incubazione, i lisati cellulari sono stati diluiti in PBS- 0.01% TWEEN 80 (Merck), sonicati per 2-3 minuti e piastrati in triplicato su agar Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson) arricchito OADC al 10%. Queste piastre sono state incubate a 37°C, in atmosfera umidificata e con il 5% di CO<sub>2</sub> per 21-24 giorni ed infine contate le colonie cresciute dopo tale periodo.

## **2.10 Microscopia confocale a fluorescenza**

Il grado di maturazione dei fagosomi contenenti *M. tuberculosis* nella cellule A549 e THP-1, è stato valutato tenendo conto del grado di co-localizzazione dei fagosomi tubercolari con i lisosomi. A questo scopo sono stati osservati due eventi che caratterizzano la maturazione del fagolisosoma: la diminuzione del pH e

l'espressione, più tardiva, della proteina LAMP-1. Il primo evento è stato rilevato mediante l'uso del colorante acidofilo Lyso Tracker red (Molecular Probes), il secondo mediante l'anticorpo murino anti-LAMP-1 Alexa fluor 647 (IgG1, clone H5G11 - Santa Cruz biotechnology inc.). Inoltre, allo scopo di verificare la presenza di PA all'interno di liposomi, questi sono stati realizzati utilizzando PA fluorescente ( $\lambda$  exc: 460nm;  $\lambda$  emi: 534nm). La microscopia confocale è stata anche usata per valutare l'efficienza d'ingresso nei macrofagi dei liposomi. Le cellule sono state quindi esposte a un ugual numero di liposomi per 90 minuti, poste su vetrino e visualizzate al microscopio, al fine di determinarne l'entità di fagocitosi delle preparazioni liposomali.

Trattamento con Lyso Tracker red. Le cellule THP-1 e A549 sono state seminate ad una concentrazione di  $2 \times 10^6$  cellule/pozzetto. Entrambi i tipi cellulari sono stati incubati con il colorante acidofilo Lyso Tracker red ad una concentrazione di 100nM per 2 ore a 37° al fine di marcare i compartimenti lisosomiali acidi. Il colorante non incorporato è stato poi rimosso mediante due lavaggi con PBS e le cellule sono state quindi risospese in terreno completo ed infettate con *M. tuberculosis* H37Rv, ad una MOI di 1 batterio per cellula. Dopo la rimozione dei batteri non fagocitati, è stato aggiunto nuovamente il Lyso Tracker red in ogni pozzetto e le cellule sono state poi lasciate ad incubare a 37°C per altri 35 minuti. Successivamente le THP-1 e A549 sono state lavate con PBS ed incubate rispettivamente con 5  $\mu$ M e 0.5  $\mu$ M di S1P o LPA, o con 1 $\mu$ M CpG a 37°C per 16-18 ore, in presenza ed in assenza di etanolo allo 0.3% che inibisce la formazione dei prodotti normalmente generati dalla PLD. In esperimenti successivi le cellule sono state trattate con liposomi aventi PSesterno/PAinterno per 16-18 ore in presenza e assenza di 3mM EGTA, chelante del  $Ca^{++}$ , al fine di valutarne il ruolo nella maturazione fagolisosomale. Dopo due lavaggi

con PBS, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4%, incubandole per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo un ulteriore lavaggio con PBS, le cellule sono state permeabilizzate aggiungendo acetone e metanolo (1:1) freddi in ghiaccio per 20 minuti, ed infine sono state lavate due volte con PBS. A questo punto la localizzazione del micobatterio è stata determinata mediante incubazione delle cellule con auramina per 20 minuti al buio, a temperatura ambiente. Dopo ciò le cellule sono state lavate 2 volte con PBS, trattate con decolorante acido-alcool allo 0.5% per 3 minuti a temperatura ambiente ed il tutto è stato seguito da un ultimo lavaggio in PBS. Le cellule sono state poi messe sui vetrini (VWR International Merck Euro lab) pretrattati con poli-L-lisina (Sigma) per 15 minuti a temperatura ambiente, e lasciate incubare per 20 minuti a 37°C. Infine è stata aggiunta una goccia di terreno H-1000 Vectashield (Vector laboratories); i bordi sono stati, quindi, sigillati con smalto.

Trattamento con Anti-LAMP-1 e Anti-LAMP-3. A differenza del trattamento appena descritto, le cellule sono state infettate senza la precedente marcatura dei lisosomi. Dopo il blocco dell'infezione, le cellule sono state stimulate, fissate e permeabilizzate come in precedenza. A questo punto la maturazione del fagolisosoma è stata evidenziata mediante l'incubazione delle cellule con l'anticorpo anti-LAMP-1 o anti-LAMP-3 (Alexa fluor 647) 1:300 per 1 ora a 4°C. L'anticorpo eccedente è stato rimosso con un lavaggio in PBS. Da questo step in poi il protocollo è identico al precedentemente descritto.

La fluorescenza dei coloranti è stata rilevata mediante un microscopio confocale a fluorescenza Leica Laser sistem associato al microscopio Leica invertito (TCS SP2). Grazie all'utilizzo combinato di un laser argon-cripton ( $\lambda=488$  nm) e di un laser elio-neon ( $\lambda=543$ nm) con bande di emissione a 505-530 nm, 580-600 nm, 600-690 nm è

stato possibile rilevare la fluorescenza dell'auramina, del Lyso Tracker Red e dell'Alexa fluor 647 rispettivamente.

### **2.11 Quantificazione di micobatteri endogeni in cellule di lavaggio broncoalveolare di pazienti con tubercolosi**

Al fine di valutare l'effetto micobattericida di LPA nei macrofagi alveolari di pazienti con tubercolosi, sono stati raccolti campioni di lavaggio bronco-alveolare (Broncho Alveolar Lavage, BAL) da 4 pazienti con tubercolosi polmonare attiva, prima del trattamento antibiotico (età 34.5+11.7, 3 maschi, 3 Caucasic). Ciascun paziente, sotto consenso informato, è stato reclutato nella divisione di malattie infettive dell'ospedale Lazzaro Spallanzani di Roma in collaborazione con il Prof. Cesare Saltini . Le cellule del BAL ( $10^6$ cell/ml) sono state risospese in terreno completo RPMI 1640, supplementato con 10% FBS, 2mM L-Glutamina, 1mM di aminoacidi non essenziali, 1mM di sodio piruvato, 5 $\mu$ g/ml di ampicillina e 2 $\mu$ g/ml di fluconazolo (Invitrogen).  $3 \times 10^6$  cellule/pozzetto sono state incubate per 48 ore in piastre da 6 in presenza o assenza di 5 $\mu$ M di LPA e analizzate come precedentemente descritto. Dopo 21 giorni è stata valutata la crescita batterica in base al numero di colonie formatesi.

### **2.12 Infezione in vivo e analisi istologica**

Topi femmine BALB/c di 8 settimane sono stati acquistati dalla Harlan (Italia), alimentati con cibo commerciale per topi e acqua *ad libitum*. I topi sono stati infettati con il ceppo MTB Erdman aerogenicamente usando una camera Glas-Col ed utilizzando per l'infezione circa 50 CFU per topo. Partendo dal giorno dopo l'infezione, i topi hanno subito 4 iniezioni di 20 nmoli di S1P nella vena retro orbitale



ad intervalli di 4 giorni. Al 14° e 28° giorno dopo l'infezione, i topi sono stati sacrificati e i loro polmoni e la milza sono stati estratti, omogeneizzati e i micobatteri contati tramite il saggio delle CFU. L'analisi istologica è stata effettuata sui lobi del polmone sinistro rimosso da ciascun topo al 14° giorno dopo l'infezione, fissato con paraformaldeide, processato e marcato con la colorazione ematossilina-eosina e colorazione Ziehl-Nielsen. Questi esperimenti sono stati effettuati in collaborazione con l'Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del S. Cuore, Roma.

### **2.13    Analisi statistica**

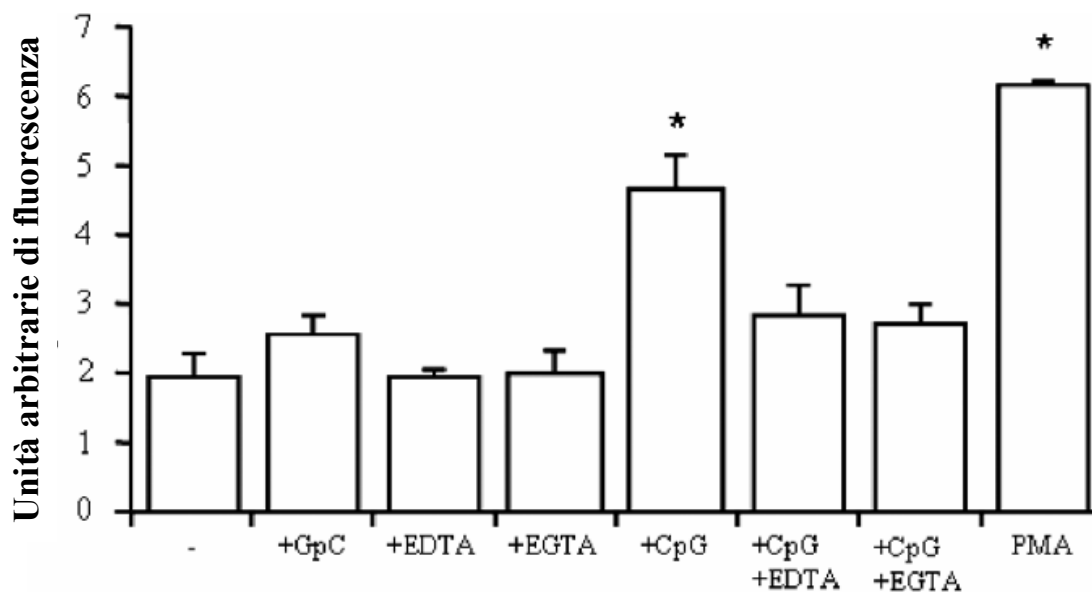
L'analisi statistica dei dati discussi in questa tesi è stata effettuata mediante il test "t" di Student. Il test Mann-Whitney è stato eseguito sui dati che non rispettavano una distribuzione normale. I dati sono stati considerati statisticamente significativi quando il valore  $p$  era minore di 0.05.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Ruolo del CpG nella risposta immunitaria antitubercolare in cellule monocito-macrofagiche

##### 3.1.1 CpG induce un aumento del $\text{Ca}^{++}$ intracellulare in cellule THP-1

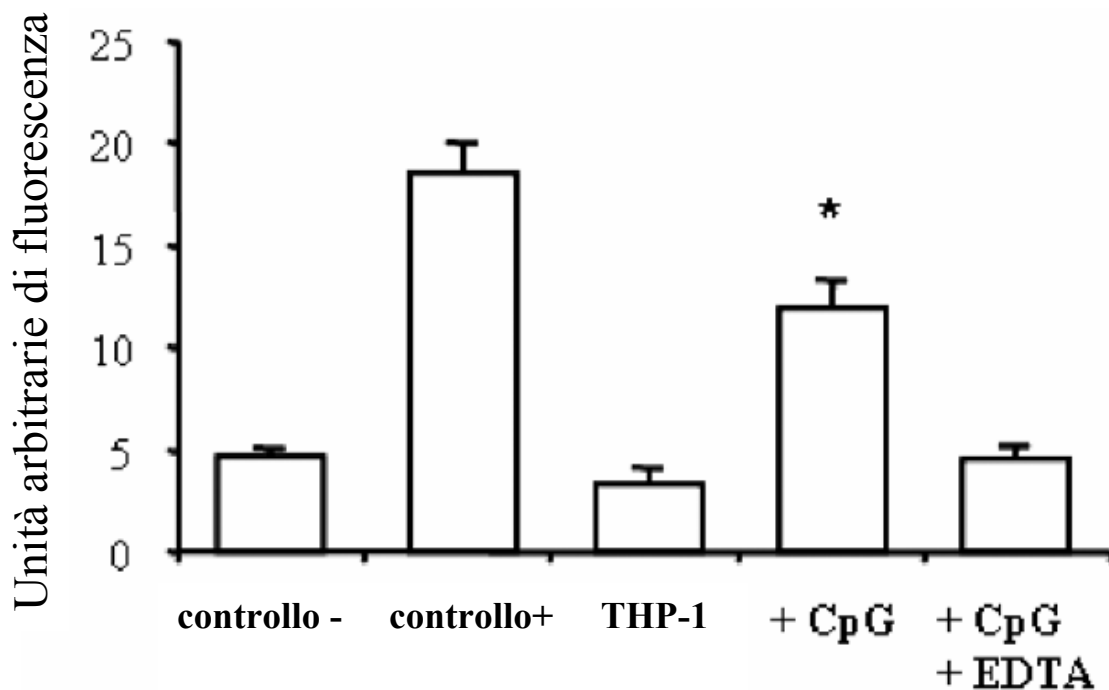
Recentemente è emerso da alcuni studi che MTB è in grado di inibire la mobilizzazione di  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare e che questa inibizione sia da mettere in relazione con l'inibizione della maturazione del fagolisosoma (*Malik ZA. et al., 2001; Malik ZA. et al., 2003*). A tal proposito la fluorescenza delle cellule THP-1 stimulate con sequenze CpG è stata monitorata per 45 minuti e l'incremento massimo della concentrazione intracellulare di  $\text{Ca}^{++}$  è stato osservato dopo 7,5 minuti dalla somministrazione dello stimolo (dato non mostrato). La figura 3.1 mostra, quindi, le concentrazioni intracellulari di calcio dopo 7,5 minuti dalla stimolazione. L'uso di EDTA e di EGTA, chelanti del  $\text{Ca}^{++}$  extracellulare, riporta a livelli basali la concentrazione del calcio nonostante la presenza di  $1\mu\text{M}$  di CpG. Inoltre non c'è alterazione neanche quando vengono somministrati i soli inibitori o il GpC. Questi dati dimostrano che l'aumento intracellulare di calcio è dovuto ad un flusso di ioni proveniente dall'esterno verso l'interno della cellula.



**Figura 3.1: CpG induce mobilitazione del Ca<sup>++</sup> nei monociti.** Le cellule THP-1 sono state marcate con 3µM di Fluo-3/AM per 60 minuti, trattate o no con 2mM di EDTA o 3mM di EGTA per 15 minuti, e poi stimulate con 1µM di CpG o GpC. I dati sono riportati come media ± d.s. di 5 diversi esperimenti. \*p<0.001 rispetto alle THP-1 non trattate.

### 3.1.2 CpG attiva la PLD Ca<sup>++</sup>-dipendente

Allo scopo di valutare il ruolo del CpG nell'attivazione della PLD Ca<sup>++</sup>-dipendente le cellule THP-1 sono state stimulate con 1µM di CpG in presenza del chelante del Ca<sup>++</sup> EDTA. I risultati mostrano che la stimolazione con sequenze CpG porta ad un incremento significativo dell'attività della PLD in cellule THP-1 (p<0.001) come è mostrato nella figura 3.2. Inoltre il trattamento con EDTA riporta a livelli quasi basali l'attività della PLD, dimostrando che il coinvolgimento del Ca<sup>++</sup> è necessario per l'attività dell'enzima.



**Figura 3.2: CpG induce l'attività della PLD Ca<sup>++</sup>-dipendente.** L'attività della PLD è stata monitorata attraverso "Amplex Red Phospholipase D detection Kit" su cellule THP-1 stimulate o no con CpG per 30 minuti. Il ruolo del Ca<sup>++</sup> extracellulare sull'attività della PLD è stato studiato aggiungendo 2mM di EDTA 15 minuti prima del CpG. L'intensità di fluorescenza è stata misurata ad una lunghezza d'onda d'eccitazione di 542nm e d'emissione di 590nm. I valori sono mostrati come medie ± d.s. di 5 esperimenti indipendenti. \*p<0.001 rispetto alle cellule THP-1 di controllo non stimulate.

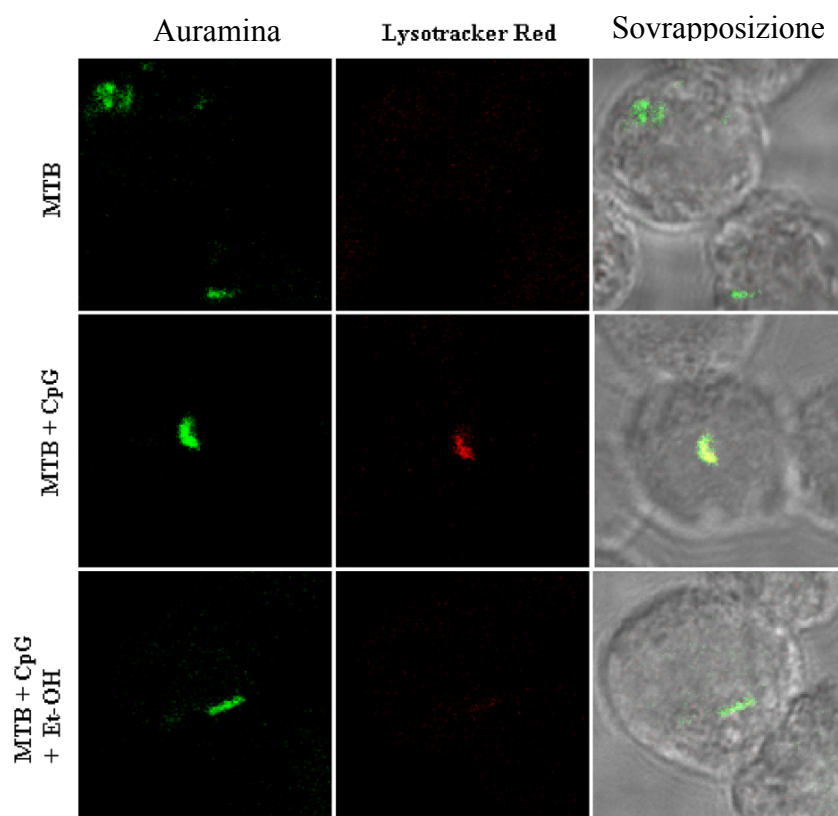
### 3.1.3 CpG favorisce la maturazione del fagolisosoma contenente MTB

Una volta all'interno della cellula, il *M. tuberculosis* ha la capacità di inibire la formazione del fagolisosoma interferendo con i processi di fusione e fissione del fagosoma con i lisosomi (Malik ZA. et al., 2003). Per valutare il ruolo del CpG in tale processo, sono stati studiati due eventi che caratterizzano la maturazione del fagolisosoma, ovvero l'abbassamento del pH e l'espressione, più tardiva, della proteina LAMP-1.

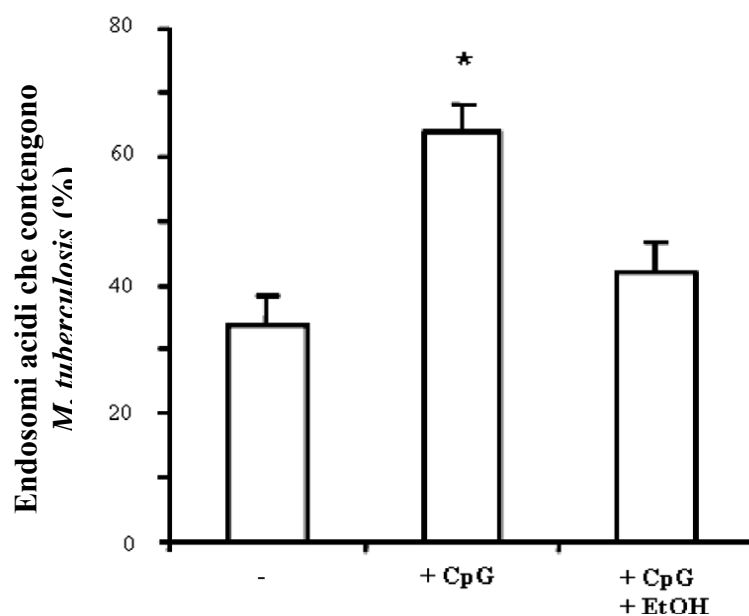
### Acidificazione degli endosomi contenenti MTB nelle THP-1

La figura 3.3 pannello A mostra come la stimolazione con 1 $\mu$ M di CpG incrementi l'acidificazione dei fagosomi contenenti MTB in cellule THP-1. Inoltre al fine di valutare il coinvolgimento della PLD nella maturazione del fagolisosoma, le cellule sono state stimulate con CpG in presenza dell'alcool primario etanolo che altera la normale attività della PLD e la conseguente produzione di PA e colina. In assenza di stimolo i bacilli tubercolari, colorati con auramina, appaiono di colore verde e non co-localizzano con i lisosomi, che appaiono rossi a causa del colorante acidofilo LysoTracker red, indicando che MTB sopravvive in vescicole endocitiche non acide. Invece, dopo la stimolazione con CpG si assiste alla co-localizzazione (giallo) dei micobatteri con il comparto acido lisosomiale. La presenza di etanolo invece riduce la capacità del CpG di indurre la maturazione del fagolisosoma e non si osserva così co-localizzazione. La figura 3.3 pannello B mostra la percentuale di bacilli tubercolari che risiedono nei vacuoli acidi, rispetto al totale dei micobatteri intracellulari. Questa analisi è stata effettuata su tre diversi esperimenti, considerando almeno 90 bacilli tubercolari per condizione. I risultati mostrano un incremento statisticamente significativo della percentuale di endosomi contenenti *M. tuberculosis* che co-localizza con i lisosomi, in seguito alla stimolazione con CpG.

### Pannello A



### Pannello B



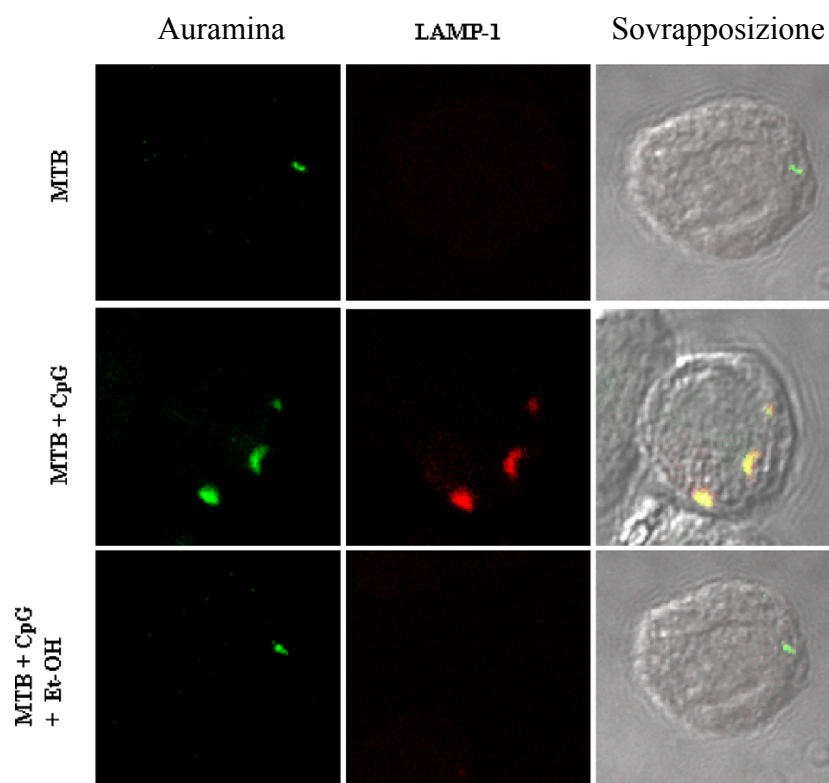
**Figura 3.3: MTB co-localizza con endosomi acidi dopo la stimolazione con CpG.** Pannello A: figura rappresentativa di 3 diversi esperimenti. Incremento dei micobatteri verdi che risiedono nei vacuoli acidi rossi dopo il trattamento con CpG. In seguito all'aggiunta dell'etanolo, invece, tale effetto viene meno. Pannello B: media in percentuale  $\pm$  d.s. di MTB che co-localizza con i fagosomi acidi, determinati dalla conta di 60 bacilli da almeno 40 macrofagi per condizione. Sono stati eseguiti 3 esperimenti diversi. \* $p < 0.001$  rispetto alle cellule di controllo infettate con MTB.

### Espressione della proteina LAMP-1 nelle cellule THP-1

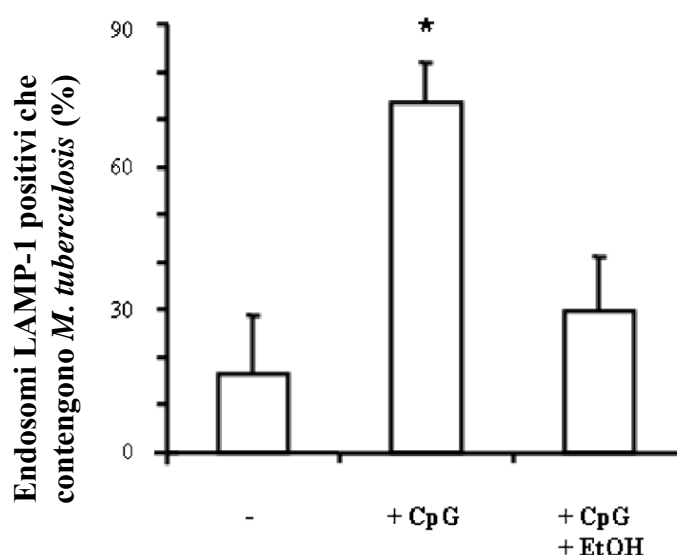
La stimolazione di cellule THP-1 con il CpG oltre a favorire l'iniziale acidificazione delle vescicole endocitiche, è responsabile anche della progressiva maturazione del fagolisosomi. Questo evento è stato evidenziato tramite il rilevamento dell'espressione della proteina LAMP-1 (Lysosome Associate Membrane protein-1), tipicamente presente nel fagolisosoma maturo (Figura 3.4 pannello A). La marcatura della proteina LAMP-1 è avvenuta tramite l'incubazione delle cellule con un anticorpo anti-LAMP-1 coniugato ad Alexa fluor 647.

La figura 3.4 pannello B mostra la percentuale di co-localizzazione del micobatterio con lisosomi esprimenti LAMP-1 nei monociti. La presenza di etanolo riduce l'espressione di LAMP-1 indotta dal CpG, confermando l'importanza della PLD nel controllo della crescita micobatterica.

## Pannello A



## Pannello B

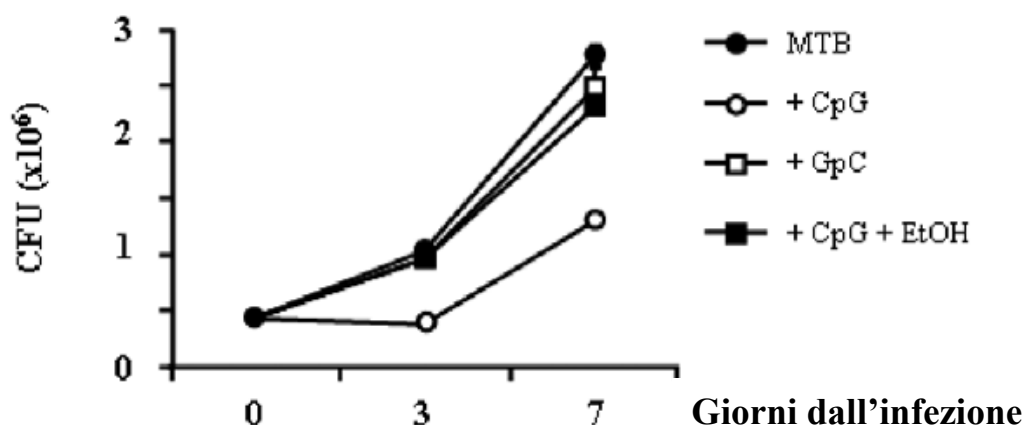


**Figura 3.4: MTB co-localizza con fagosomi LAMP-1 positivi dopo la stimolazione con CpG.**  
Pannello A: figura rappresentativa di 3 diversi esperimenti. Incremento dei micobatteri verdi che risiedono nei vacuoli LAMP-1 positivi dopo il trattamento con CpG. In presenza di etanolo, invece, tale effetto viene meno. Pannello B: media in percentuale  $\pm$  d.s. di MTB che co-localizza con i fagosomi acidi, determinati dalla conta di 60 bacilli da almeno 40 macrofagi per condizione. Sono stati eseguiti 3 esperimenti diversi. \* $p < 0.001$  rispetto alle THP-1 infettate con MTB e non trattate.



### 3.1.4 CpG determina un incremento dell'attività micobattericida dei monociti mediante il coinvolgimento della PLD

Come già accennato, il trattamento con CpG di topi infettati con MTB porta ad una notevole riduzione della crescita del *M. tuberculosis* nei polmoni (Juffermans NP. et al., 2002). Sulla base di tali premesse, abbiamo valutato la capacità di queste sequenze d'indurre un'attività microbica nelle cellule THP-1. A tale scopo è stata monitorata la crescita intracellulare del micobatterio con il saggio delle CFU. Le cellule THP-1, dopo essere state infettate, sono state stimulate con 1 $\mu$ M di CpG, in presenza ed in assenza di etanolo allo 0.3%, e con 1 $\mu$ M di GpC, ovvero con sequenze di DNA prive di effetto immunostimolatorio e usate quindi come controllo negativo. La crescita batterica è stata osservata dopo 3 e 7 giorni. La figura 3.5 mostra come il trattamento con CpG determini una riduzione della crescita di MTB in cellule THP-1, che non si osserva invece quando le cellule vengono stimulate con GpC o con CpG in presenza di etanolo.

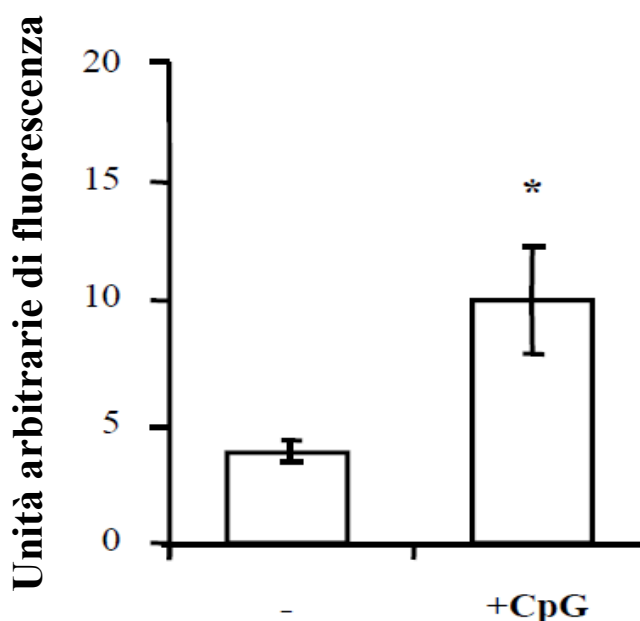


**Figura 3.5: CpG induce un'inibizione della crescita intracellulare di MTB PLD-dipendente nei monociti.** Le cellule THP-1 sono state infettate con MTB ad una MOI di 1 e incubate per 0, 3 e 7 giorni con o senza CpG, CpG+etanolo, o GpC. I risultati sono mostrati come le medie  $\pm$  d.s. di valori in triplicato e sono rappresentativi di 2 esperimenti indipendenti.

## 3.2 Ruolo del CpG nella risposta immunitaria antitubercolare in cellule epiteliali alveolari

### 3.2.1 CpG attiva la PLD in cellule A549

Abbiamo già visto che l'attività enzimatica della PLD è un processo chiave coinvolto nell'uccisione intracellulare micobatterica indotta da sequenze CpG in cellule monocito-macrofagiche. Su queste premesse abbiamo esteso l'analisi anche a cellule epiteliali alveolari, le A549, che abbiamo visto non essere più considerate una semplice componente passiva dell'immunità innata. Per prima cosa abbiamo analizzato l'attività della PLD in seguito a stimolazione con 1 $\mu$ M di CpG. Il trattamento con CpG mostra un incremento statisticamente significativo ( $p < 0.001$ ) rispetto alle sole cellule non trattate, come si evince dalla figura 3.6.

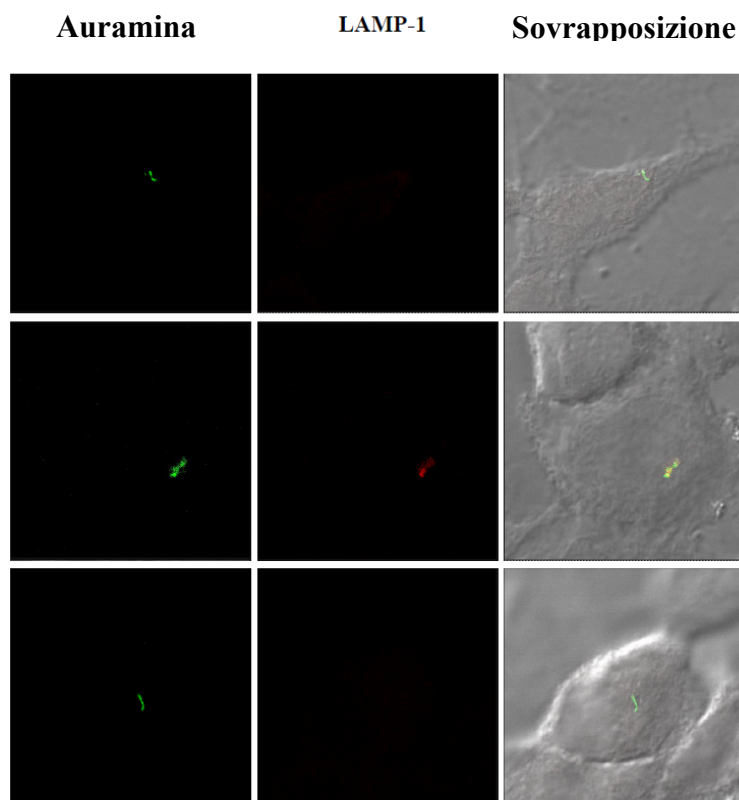


**Figura 3.6: CpG induce l'attività della PLD nelle A549.** L'attività della PLD è stata monitorata attraverso "Amplex Red Phospholipase D detection Kit" su cellule A549 stimulate o meno con CpG per 30 minuti. L'intensità di fluorescenza è stata misurata ad una lunghezza d'onda d'eccitazione di 542nm e d'emissione di 590nm. I valori sono mostrati come medie  $\pm$  d.s. di 5 esperimenti indipendenti. \* $p < 0.001$  rispetto alle cellule A549 di controllo non stimulate.

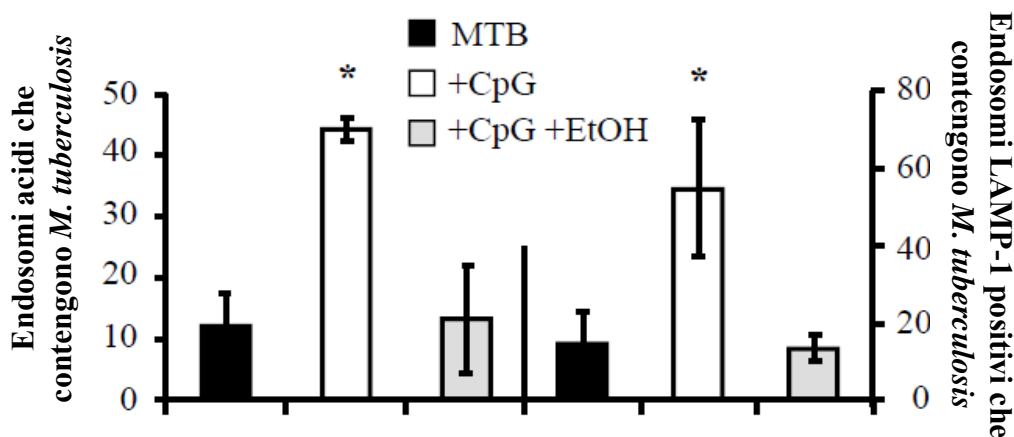
### **3.2.2 CpG favorisce la maturazione del fagolisosoma contenente MTB**

Poiché abbiamo dimostrato che l'attività della PLD è necessaria per la maturazione del fagolisosoma in seguito alla stimolazione con ligandi naturali o microbici in cellule monocito-macrofagiche, abbiamo monitorato in microscopia confocale a fluorescenza la localizzazione intracellulare di *M. tuberculosis* in cellule A549 in seguito al trattamento con 1 $\mu$ M di CpG. Nella figura 3.7 pannello A viene mostrata un'immagine rappresentativa in cui in assenza di stimolo i micobatteri endocitati appaiono verdi, indicando la presenza di endosomi immaturi. Al contrario, il trattamento con CpG promuove la maturazione del fagolisosoma evidenziando compartimenti LAMP-1 positivi, che appaiono gialli in seguito alla co-localizzazione dei bacilli verdi con i compartimenti endolisosomali maturi rossi. Inoltre tale processo risulta mediato dalla PLD, poiché la presenza di etanolo inibisce l'effetto dato dalla stimolazione con CpG. Nel pannello B della figura 3.7 viene mostrata la percentuale di co-localizzazione del micobatterio con lisosomi esprimenti LAMP-1 o marcati con il colorante acidofilo LysoTracker red in cellule dell'epitelio alveolare.

## Pannello A



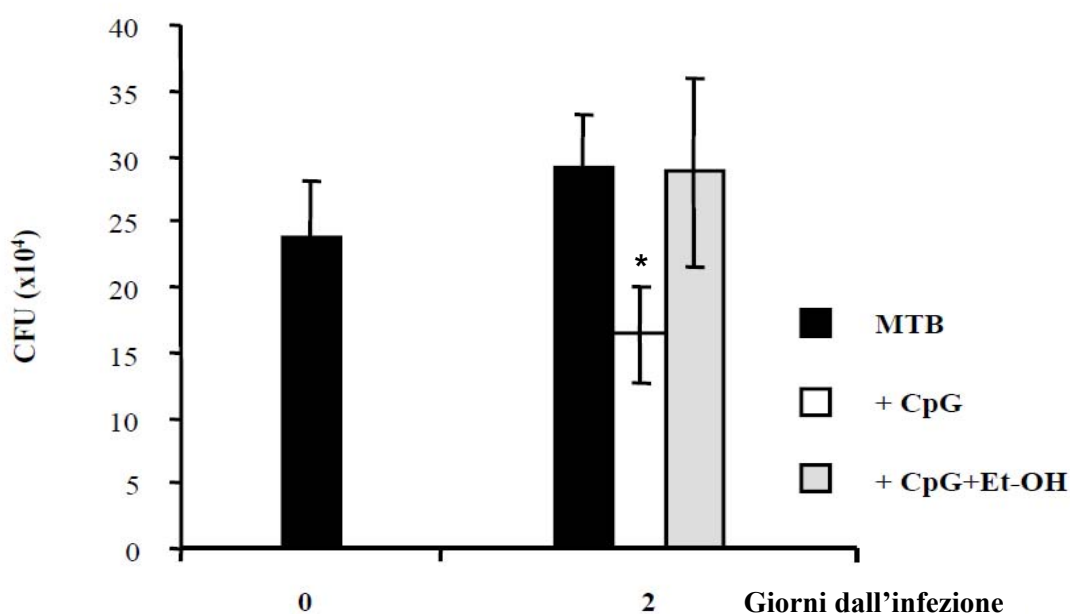
## Pannello B



**Figura 3.7: CpG promuove la maturazione dell'endolisosoma in cellule A549 infettate con MTB.** Pannello A: l'immagine, rappresentativa di 3 diversi esperimenti, mostra i micobatteri che risiedono nei vacuoli LAMP-1 positivi dopo il trattamento con CpG. In presenza di etanolo, invece, tale effetto viene meno. Pannello B: media in percentuale  $\pm$  d.s. di MTB che co-localizza con gli endosomi acidi (lato sinistro) o LAMP-1 positivi (lato destro), determinati dalla conta di 60 bacilli da almeno 40 macrofagi per condizione. Sono stati eseguiti 3 esperimenti diversi. \* $p < 0.001$  rispetto alle cellule di controllo infettate con MTB.

### 3.2.3 CpG determina un incremento dell'attività micobattericida mediante il coinvolgimento della PLD

Abbiamo a questo punto voluto valutare anche nelle A549, considerate ormai non più una semplice barriera ma una componente attiva importante del sistema immunitario, la loro capacità di controllare la crescita intracellulare di *M. tuberculosis* in cellule A549 dopo stimolazione con CpG. A tale scopo le cellule sono state infettate e stimulate o meno con 1 $\mu$ M di CpG, in presenza ed in assenza di etanolo. I risultati del saggio di CFU effettuato dopo 2 giorni dall'infezione mostrano che il trattamento con CpG induce una diminuzione statisticamente significativa della crescita micobatterica nelle A549, e che la presenza di etanolo ripristina la vitalità micobatterica ai livelli di controllo (figura 3.8).

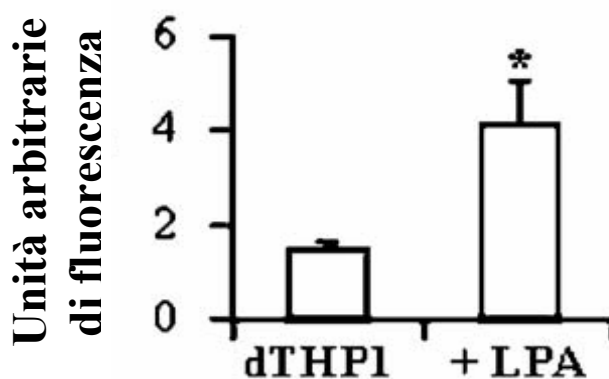


**Figura 3.8: CpG induce l'uccisione intracellulare di MTB in cellule A549.** Le cellule A549 sono state infettate con MTB ad una MOI di 1 e incubate per 0 e 2 giorni con o senza CpG, o con CpG+etanolo. I risultati di CFU sono mostrati come le medie  $\pm$  d.s. di valori in triplicato e sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. \* $p < 0.05$  rispetto sia alle cellule di controllo infettate con MTB sia che alle cellule infettate e stimulate con CpG+etanolo.

### 3.3 Ruolo di LPA nella risposta immunitaria antitubercolare in cellule monocito-macrofagiche

#### 3.3.1 LPA attiva la PLD $\text{Ca}^{++}$ -dipendente

E' stato già dimostrato che la PLD ha un ruolo importante nella risposta immunitaria verso *M. tuberculosis* (Kusner DJ. et al., 2000). È noto, infatti, che nei fagociti, l'enzima viene attivato in seguito a diversi stimoli quali ATP (Kusner DJ. et al., 2001), sequenze oligonucleotidiche non metilate di tipo CpG (Auricchio G. et al., 2003) e sfingosina 1-fosfato (S1P) (Garg SK. et al., 2004), controllando così la crescita intracellulare di MTB. Tramite fluorimetria è stato possibile valutare quindi l'attività della PLD dopo 18 ore dal trattamento con 5 $\mu$ M LPA. La figura 3.9 evidenzia un aumento significativo dell'attività enzimatica in cellule dTHP-1 stimulate con LPA rispetto a quelle non trattate ( $p=0.007$ ).

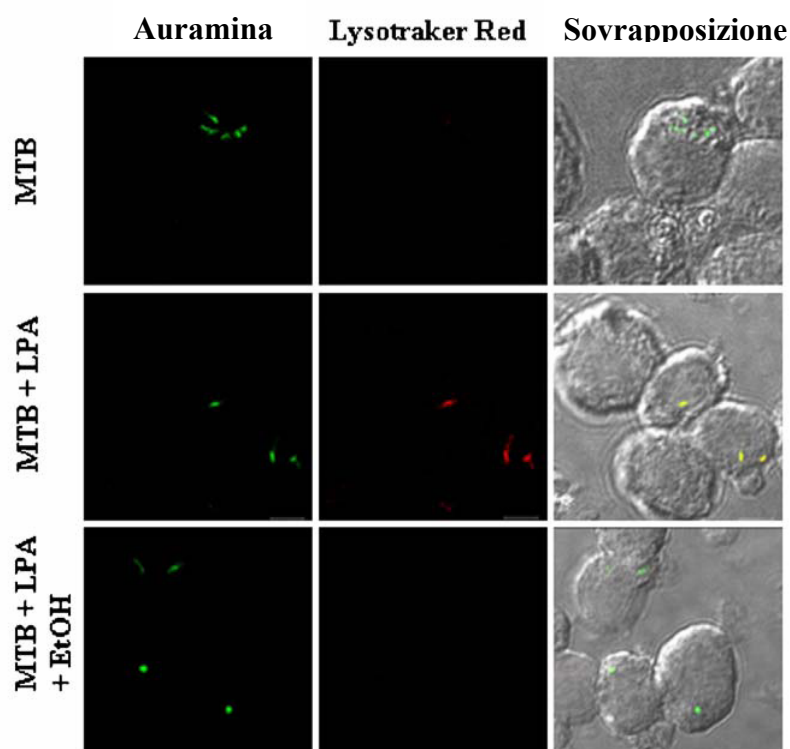


**Figura 3.9: LPA induce l'attivazione della PLD.** L'attività della PLD è stata monitorata attraverso "Amplex Red Phospholipase D detection Kit" su dTHP-1 stimulate o no con 5 $\mu$  di LPA per 18 ore. L'intensità di fluorescenza è stata misurata ad una lunghezza d'onda d'eccitazione di 542nm e d'emissione di 590nm. I valori sono stati mostrati come media  $\pm$  deviazione standard (d.s.) di 3 esperimenti indipendenti. \* $p=0.007$  rispetto alle cellule di controllo.

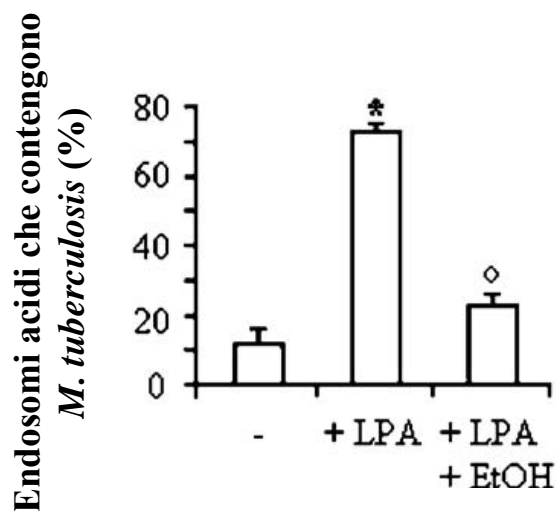
### **3.3.2 LPA favorisce la maturazione del fagolisosoma contenente MTB**

Per valutare il coinvolgimento della maturazione del fagolisosoma nel controllo intracellulare di *M. tuberculosis* intracellulare del batterio, è stata studiata la fusione dei fagosomi contenenti MTB con i lisosomi e il ruolo svolto dalla PLD in tale processo attraverso la microscopia confocale a fluorescenza. La figura 3.10 pannello A mostra che la stimolazione con LPA di cellule dTHP-1 determina l'acidificazione dei fagosomi contenenti MTB ed i batteri si presentano di colore giallo, indicando la colocalizzazione dei bacilli verdi nei lisosomi rossi. La presenza di etanolo insieme ad LPA inibisce, anche se non totalmente, l'acidificazione del compartimento endosomiale. Nella figura 3.10 pannello B è mostrata la percentuale di bacilli tubercolari presenti nei compartimenti lisosomiali delle cellule dTHP-1. I dati evidenziano un significativo incremento della percentuale di batteri, che colocalizzano in ambiente acido dopo stimolazione con 5 $\mu$ M di LPA ( $p < 0.001$ ).

### Pannello A



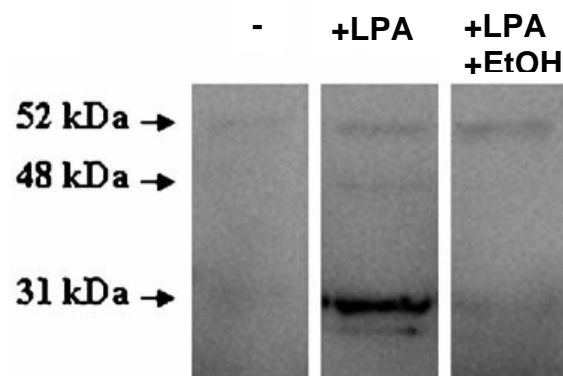
### Pannello B



**Figura 3.10: LPA induce maturazione del fagolisosoma PLD-dipendente.** Pannello A: figura rappresentativa di 3 diversi esperimenti. Si nota l'incremento dei micobatteri verdi che risiedono nei vacuoli acidi rossi dopo il trattamento con 5µM di LPA. La presenza dell'etanolo, invece, tale effetto viene meno. Pannello B: media in percentuale  $\pm$  d.s. di MTB che co-localizza con i fagosomi acidi, determinati dalla conta di 100 bacilli da almeno 60 macrofagi per campione. Sono stati eseguiti 3 esperimenti diversi. \*p<0.001, °p=0.01, rispetto alle dTHP-1 infettate con MTB.



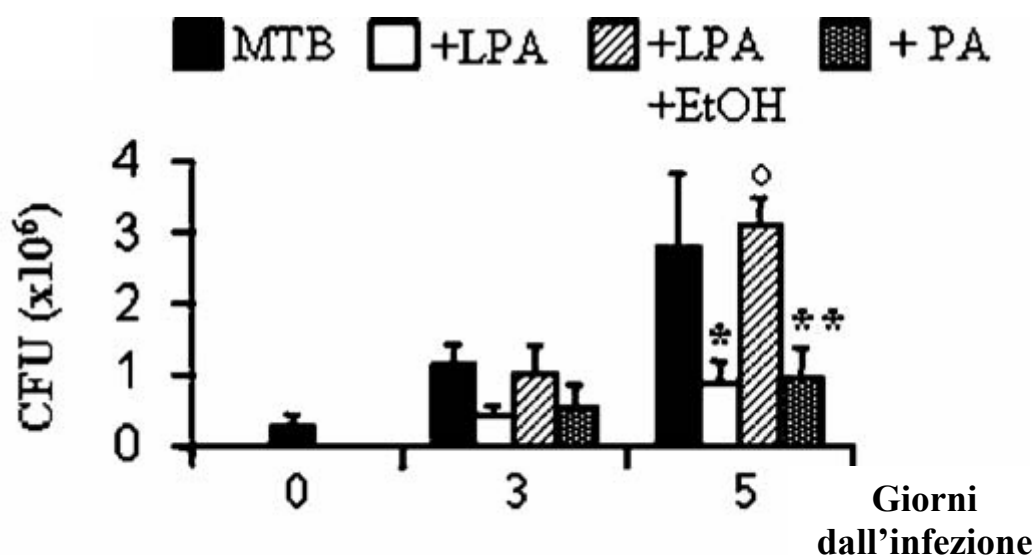
Poichè ci sono altre importanti componenti molecolari associate alla maturazione del fagolisosoma. Abbiamo monitorato anche l'espressione e la maturazione della catepsina D in seguito al trattamento con LPA (Figura 3.11). I risultati mostrano che la stimolazione delle dTHP-1 con 5  $\mu$ M di LPA aumenta l'espressione sia della forma immatura di 52kDa che di quella matura di 31kDa della catepsina D. Inoltre la maturazione verso la forma di 31kDa viene completamente inibita dall'aggiunta dell'etanolo, sottolineando il ruolo chiave della PLD in tale processo.



**Figura 3.11: LPA porta ad un aumento nell'espressione della catepsina D.** Le dTHP-1 sono state stimulate o meno con LPA o con LPA+etanolo per 24 ore. L'analisi Western blotting rivela che il trattamento con LPA aumenta l'espressione della catepsina D, sia della forma immatura di 52kDa che di quella matura di 31kDa. Tale maturazione verso la forma di 31kDa viene completamente inibita dall'aggiunta dell'etanolo.

### 3.3.3 LPA determina un incremento dell'attività micobattericida mediante il coinvolgimento della PLD

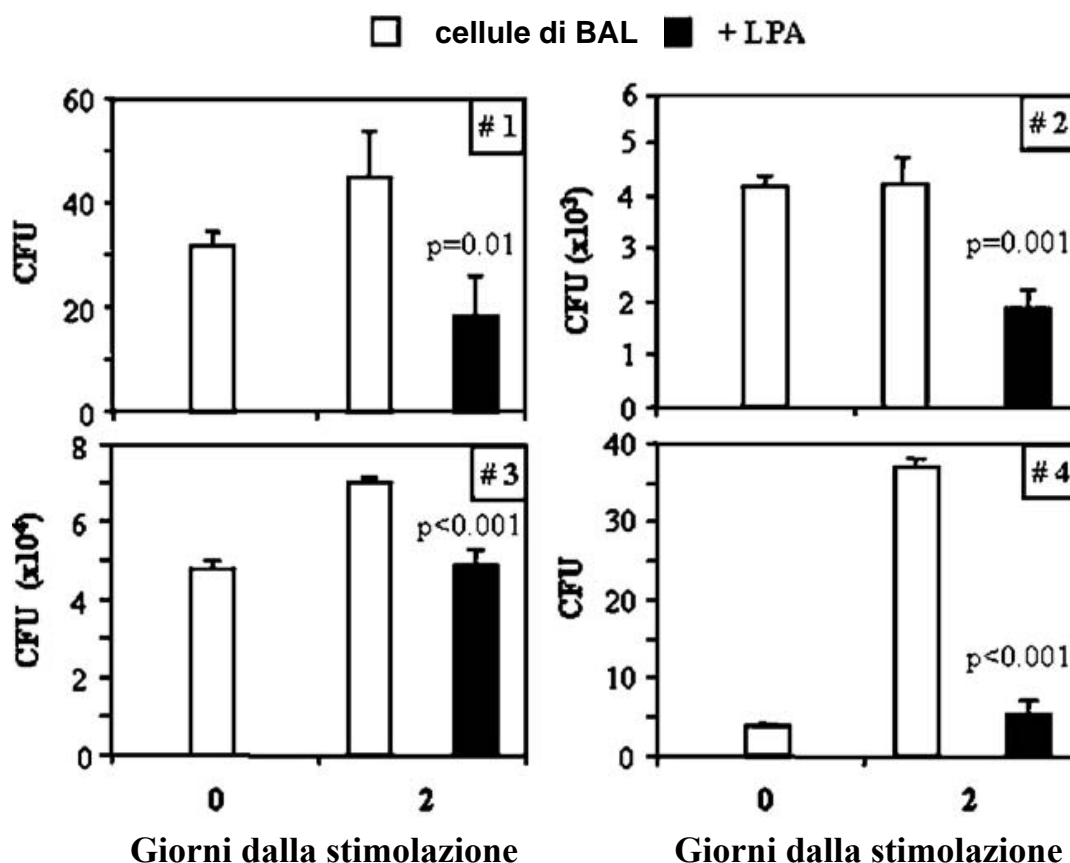
Su queste premesse, tramite il saggio delle CFU, abbiamo voluto analizzare la capacità di LPA di controllare la crescita intracellulare di MTB nei macrofagi e il ruolo della PLD in tale processo. La figura 3.12 mostra che, in cellule THP-1 differenziate e infettate con MTB, l'azione dell'etanolo 0.3% è antagonista all'azione di LPA sulla crescita batterica intracellulare. Dopo il trattamento con 5 $\mu$ M di LPA si nota infatti un decremento significativo nella vitalità micobatterica ( $p=0.008$ ); l'utilizzo dell'alcool primario invece ristabilisce la crescita batterica intracellulare. Tale coinvolgimento della PLD nell'azione microbica di LPA è stato studiato anche mediante la stimolazione delle cellule dTHP-1 con acido fosfatidico (PA), prodotto naturale dell'enzima. I risultati ottenuti mostrano che il trattamento con 5 $\mu$ M di PA ha effetti comparabili a quelli di LPA sull'uccisione micobatterica intracellulare, a dimostrazione che la PLD è coinvolta pienamente nell'azione di LPA.



**Figura 3.12: LPA induce attività antimicobatterica mediante l'azione della PLD.** Le cellule dTHP-1 sono state infettate con MTB ad una MOI 1 di e incubate per 0, 3 e 5 giorni con LPA, LPA+etanolo o PA. I risultati di CFU sono stati espressi come media  $\pm$  d.s. di valori in triplicato e sono rappresentativi di 3 diversi esperimenti. \* $p=0.008$ , \*\* $p=0.02$ , ° $p=n.s.$ , rispetto alle sole dTHP-1 infettate con MTB.

### 3.3.4 LPA induce azione micobattericida *ex vivo*

Alla luce di questi risultati ottenuti *in vitro*, abbiamo voluto verificare l'effettiva possibilità che LPA possa favorire *ex vivo* l'uccisione intracellulare del micobatterio da parte dei macrofagi alveolari di pazienti con tubercolosi. A tal fine, le cellule di lavaggio bronco-alveolare (BAL), provenienti da 4 soggetti con tubercolosi polmonare attiva, sono state poste in coltura e la crescita batterica intracellulare è stata quantificata dopo 48 ore dalla stimolazione *in vitro* con 5  $\mu$ M di LPA. La figura 3.13 mostra come in seguito al trattamento con LPA si abbia una significativa riduzione della crescita intracellulare di MTB.



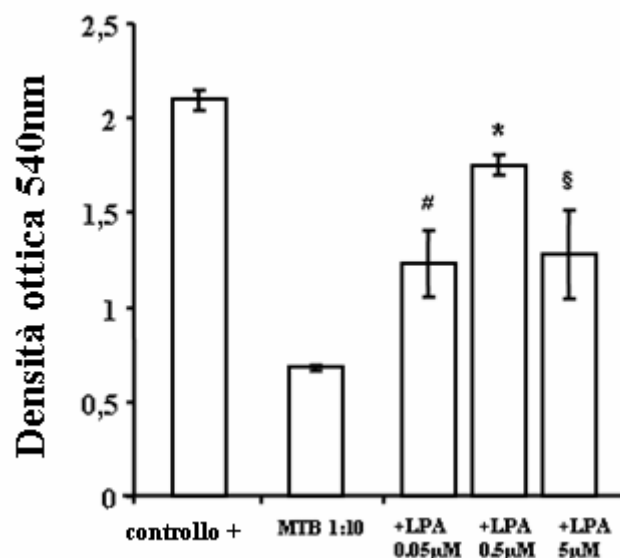
**Figura 3.13: LPA induce attività antimicobatterica in cellule di lavaggio bronco alveolare provenienti da pazienti con tubercolosi.** Il saggio delle CFU è stato condotto su cellule di BAL provenienti da 4 soggetti affetti da tubercolosi, prima (tempo 0) e dopo 48 ore (tempo 2) dalla stimolazione con LPA. I dati sono espressi come le medie  $\pm$  d.s. dei valori CFU in triplicato. Le differenze tra le cellule di BAL trattate con LPA e non, sono state analizzate con il t test di Student e i valori p sono stati mostrati in ogni quadrante.

### **3.4 Ruolo di LPA e S1P nella risposta immunitaria antitubercolare in cellule epiteliali alveolari**

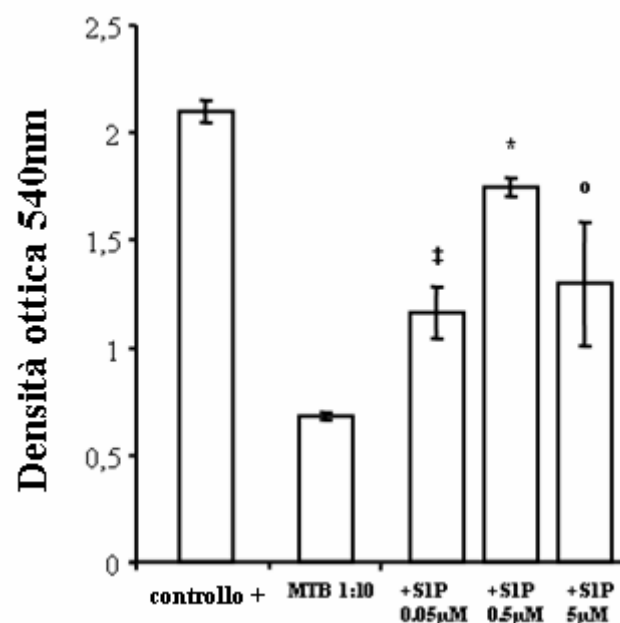
#### **3.4.1 LPA e S1P sono citoprotettive e riducono la crescita intracellulare di MTB in cellule A549**

Le cellule epiteliali alveolari rappresentano la prima barriera contro i patogeni a trasmissione aerea e contribuiscono alla risposta immunitaria innata producendo citochine, chemochine, peptidi antimicrobici e lipidi del surfattante (*Bals PS. et al., 2004*). Per prima cosa abbiamo voluto verificare il ruolo dei lisofosfolipidi sulla vitalità cellulare delle A549 durante l'infezione *in vitro* con MTB. A questo scopo la vitalità cellulare delle A549 infettate con *M. tuberculosis* e trattate con LPA e S1P è stata valutata con il saggio MTT. I risultati, mostrati in figura 3.14, indicano che il trattamento con LPA o con S1P protegge significativamente le cellule dalla citotossicità indotta da MTB a tutte le concentrazioni usate (da 0.05 a 5 $\mu$ M), ma il trattamento con 0.5 $\mu$ M è la dose ottimale alla quale tale effetto è associato.

### Pannello A



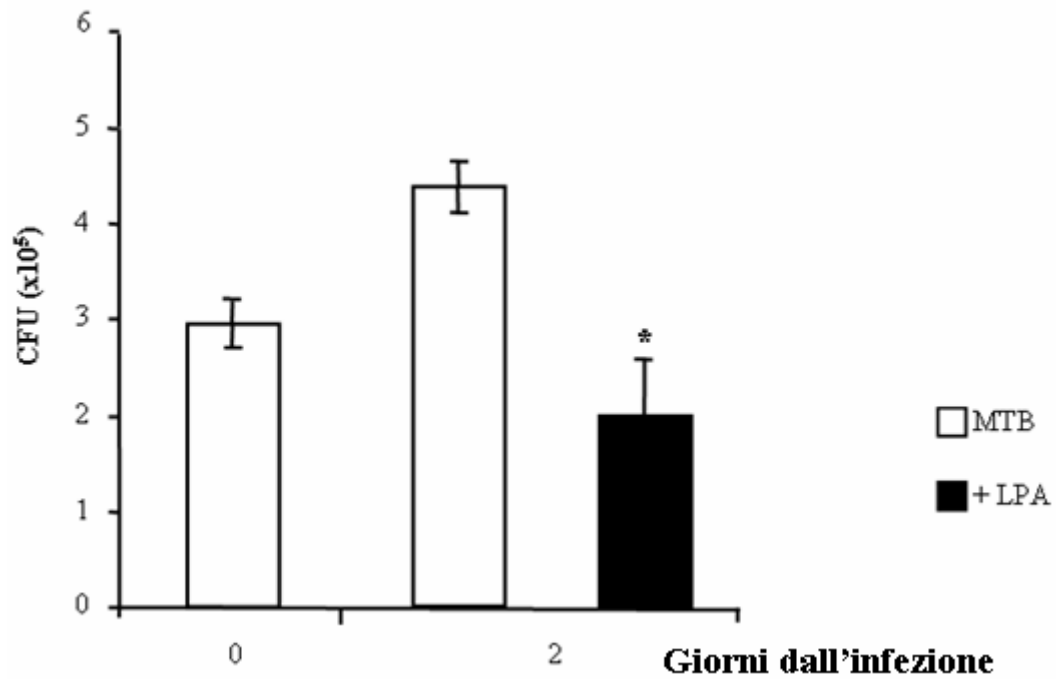
### Pannello B



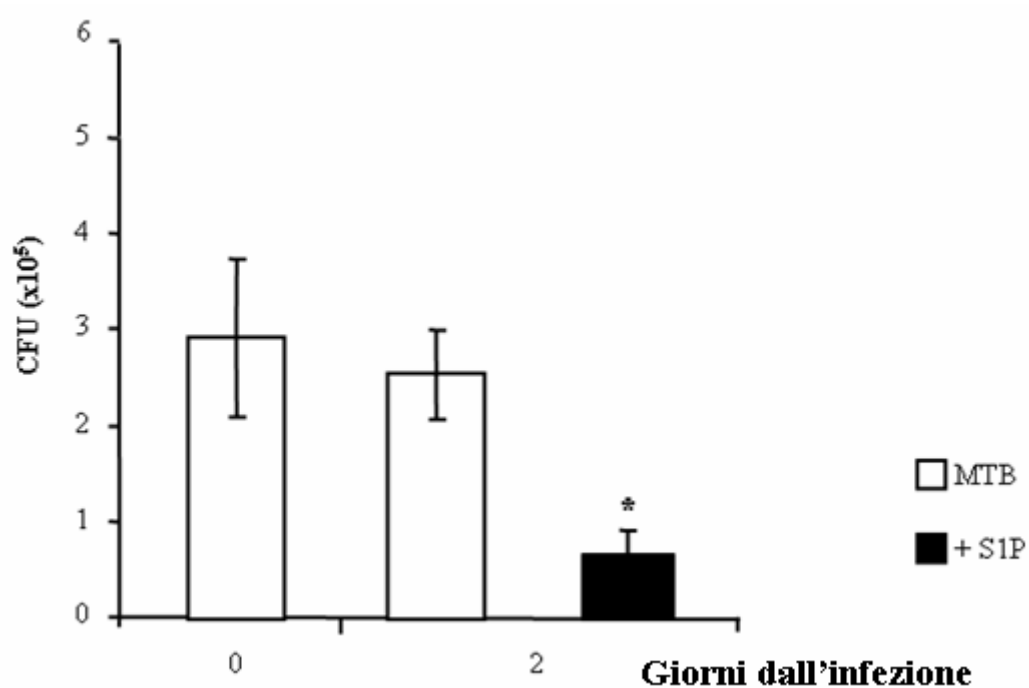
**Figura 3.14: LPA e S1P inducono un effetto citoprotettivo in cellule epiteliali alveolari infettate con MTB.** Le A549 sono state infettate con una MOI 10 di MTB e poi stimulate con 0.05, 0.5 o 5µM di LPA (Pannello A) o di S1P (Pannello B) per 2 giorni. Per valutare l'effetto citoprotettivo dei fosfolipidi, è stato eseguito il saggio MTT, come controllo positivo sono state considerate le cellule non infettate. I dati sono riportati come media  $\pm$  d.s. di 3 diversi esperimenti. \* $p < 0.001$ , # $p = 0.002$ , § $p = 0.005$ , ‡ $p = 0.001$ , ° $p = 0.01$  rispetto alle cellule infettate con MTB.

Successivamente, allo scopo di verificare se l' aumento della vitalità cellulare fosse associato ad un' aumentata capacità dei lisofosfolipidi di attivare le A549 ad uccidere MTB, abbiamo monitorato la crescita micobatterica intracellulare nelle cellule infettate e trattate con 0.5 $\mu$ M di LPA e SIP. I risultati mostrano che entrambi i fosfolipidi riducono la crescita di MTB nelle A549 (Figura 3.15).

**Pannello A**



### Pannello B

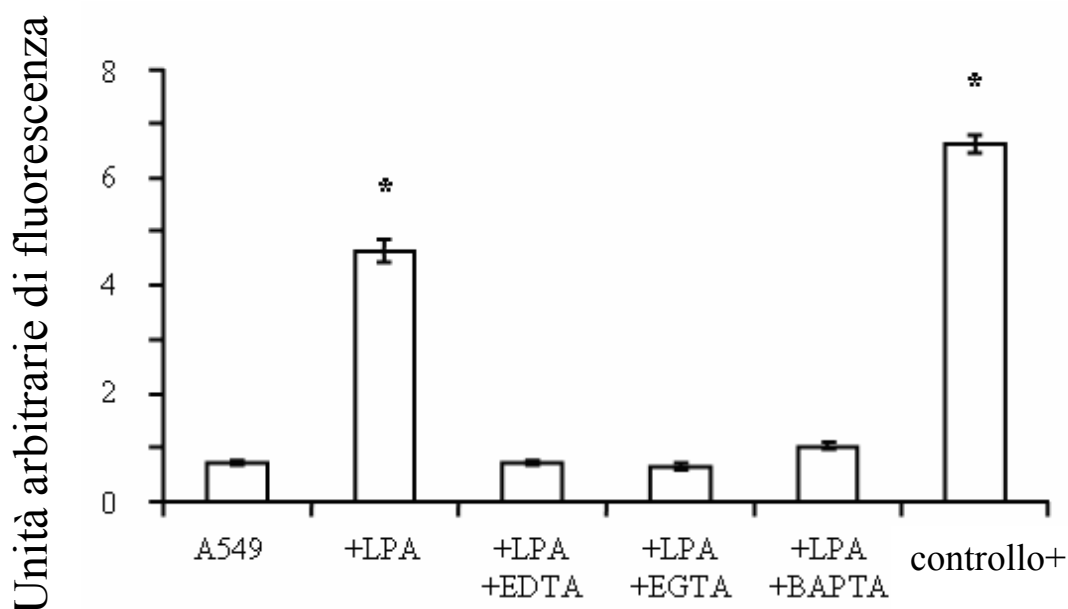


**Figura 3.15: LPA e S1P inducono attività antimicobatterica in cellule A549 infettate con MTB.** Le A549 sono state infettate con MTB ad una MOI di 1 e poi stimulate con 0.5 $\mu$ M di LPA ([Pannello A](#)) o di S1P ([Pannello B](#)) per 2 giorni. I risultati di CFU sono mostrati come le medie  $\pm$  d.s. di valori in triplicato e sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. \* $p < 0.001$  rispetto alle cellule di controllo infettate con MTB.

### 3.4.2 LPA e S1P inducono un'attivazione della PLD $\text{Ca}^{++}$ -dipendente

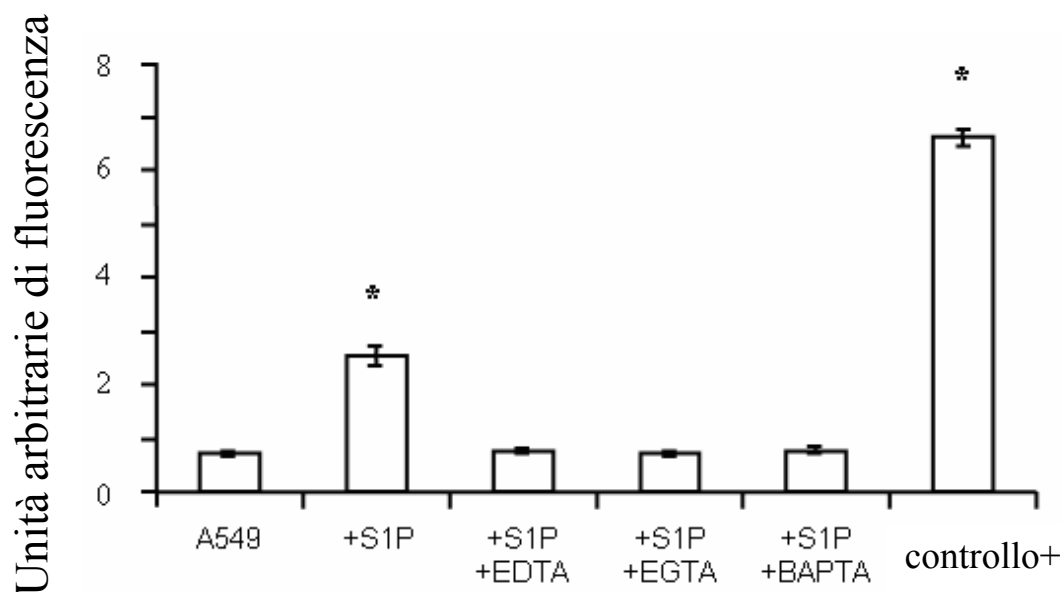
E' noto che elevate concentrazioni di  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare sono necessarie per attivare differenti vie di trasduzione del segnale tra cui quelle che avviano le attività antimicrobatteriche (Malik ZA. et al., 2000). Su queste basi abbiamo analizzato i flussi di  $\text{Ca}^{++}$  in seguito alla stimolazione con i lisofosfolipidi in cellule epiteliali alveolari. I risultati mostrano un evidente incremento di  $\text{Ca}^{++}$  citosolico nelle A549 in seguito alla stimolazione con  $0.5\mu\text{M}$  di LPA (Figura 3.16 pannello A) o con  $0.5\mu\text{M}$  di S1P (Figura 3.16 pannello B). Inoltre il trattamento con  $2\text{mM}$  di EDTA o con  $3\text{mM}$  di EGTA, chelanti intracellulare del  $\text{Ca}^{++}$ , e il trattamento con  $20\mu\text{M}$  di BAPTA-AM, chelante extracellulare del calcio, inibiscono completamente l'incremento del  $\text{Ca}^{++}$  citosolico indotto dai lisofosfolipidi.

**Pannello A**





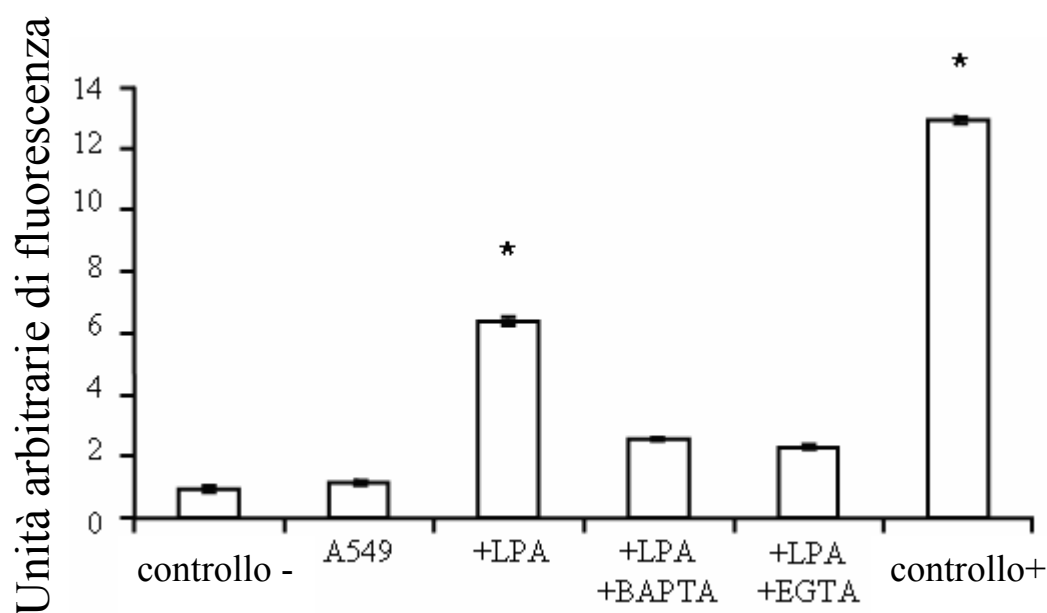
## Pannello B



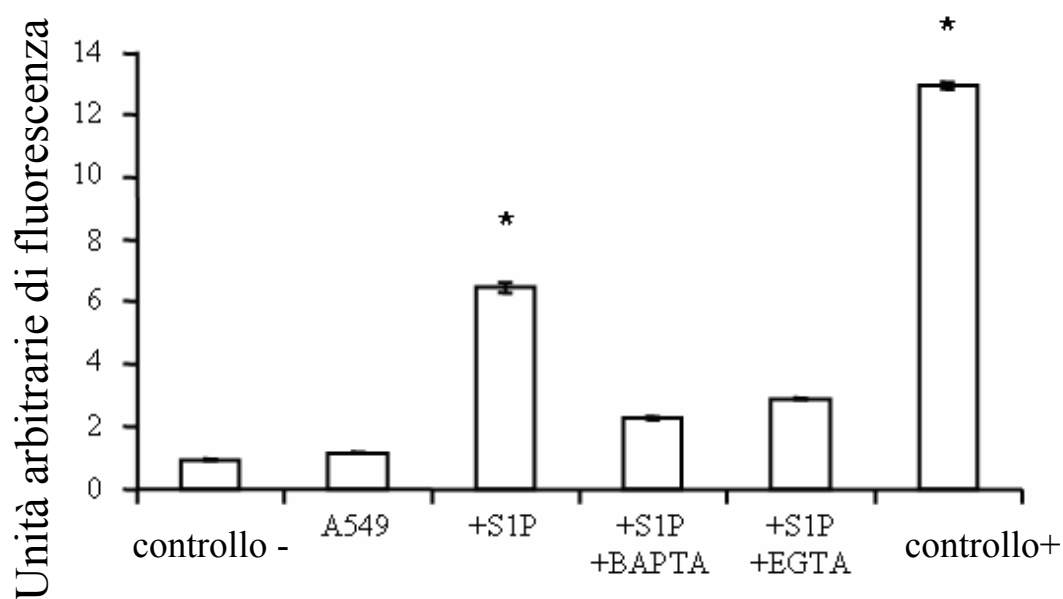
**Figura 3.16: LPA e S1P inducono mobilitazione del  $\text{Ca}^{++}$  nelle cellule epiteliali alveolari.** Le cellule A549 sono state marcate con  $3\mu\text{M}$  di Fluo-3/AM per 60 minuti, trattate o meno con  $2\text{mM}$  di EDTA o  $3\text{mM}$  di EGTA per 15 minuti o con  $20\mu\text{M}$  di BAPTA-AM per 30 minuti, e poi stimolate con  $0.5\mu\text{M}$  di LPA (Pannello A) o S1P (Pannello B). Come controllo positivo abbiamo considerato A549 lisate con TritonX100. I dati sono riportati come media  $\pm$  d.s. di 5 diversi esperimenti. \* $p < 0.001$  rispetto alle cellule non trattate.

A questo punto, abbiamo voluto analizzare l'attività della PLD, enzima chiave nei processi antimicrobici. I risultati, mostrati in figura 3.17, mostrano un incremento significativo dell'attività enzimatica in seguito al trattamento con i lisofosfolipidi, rispetto alle A549 non trattate. Inoltre, tale incremento dovuto alla stimolazione con LPA e S1P risulta essere  $\text{Ca}^{++}$ -dipendente, poiché l'attività enzimatica della PLD viene completamente inibita dai pretrattamenti con i chelanti del calcio.

### Pannello A



### Pannello B

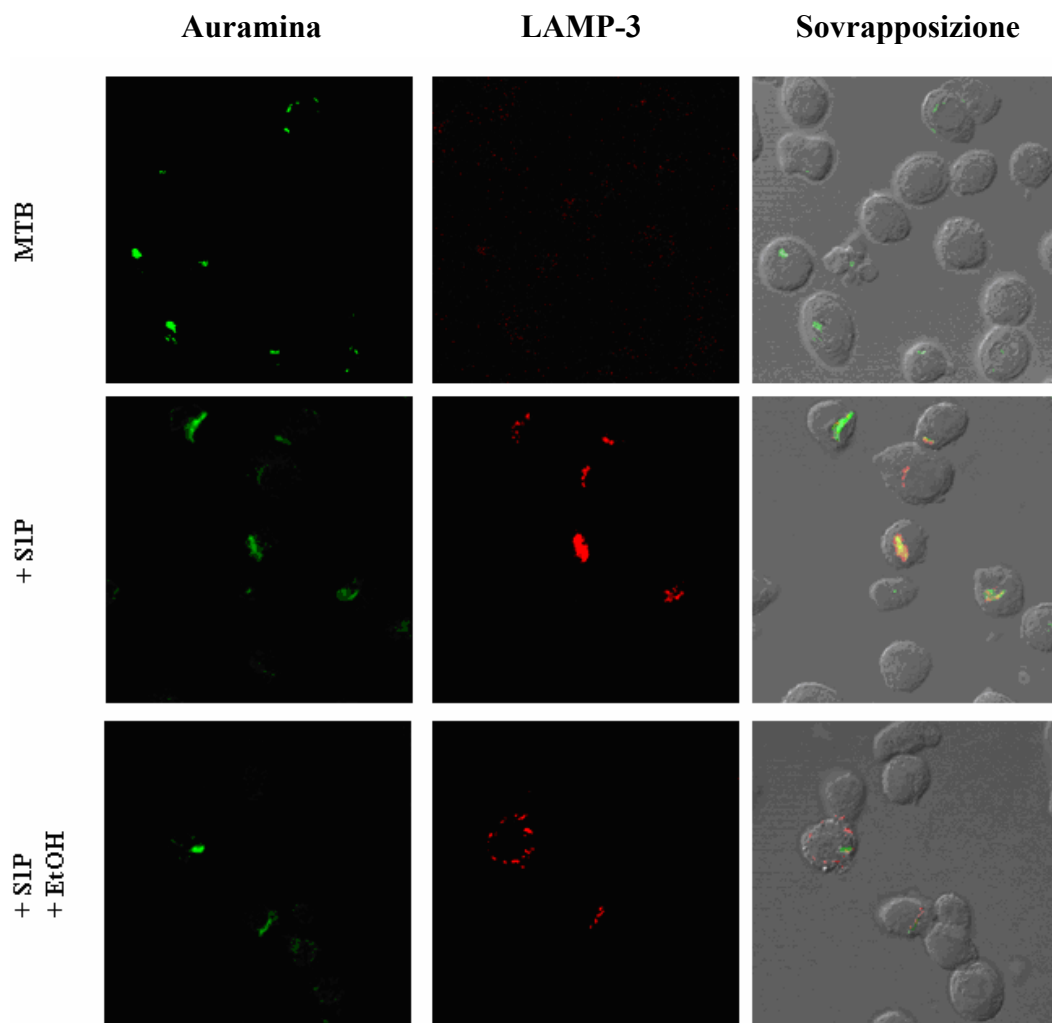


**Figura 3.17: LPA e S1P inducono l'attività della PLD  $Ca^{++}$ -dipendente in cellule A549.** L'attività della PLD è stata monitorata attraverso "Amplex Red Phospholipase D detection Kit" su cellule A549 stimulate o meno con  $0.5\mu M$  LPA (Pannello A) o con  $0.5\mu M$  S1P (Pannello B) per 18 ore. Il ruolo del  $Ca^{++}$  extracellulare sull'attività della PLD è stato studiato aggiungendo  $3mM$  di EGTA o  $20\mu M$  di BAPTA-AM, rispettivamente 15 e 30 minuti prima dei lisofosfolipidi. I controlli negativi e positivi sono forniti dal kit. L'intensità di fluorescenza è stata misurata ad una lunghezza d'onda d'eccitazione di  $542nm$  e d'emissione di  $590nm$ . I valori sono mostrati come medie  $\pm$  d.s. di 3 esperimenti indipendenti. \* $p < 0.001$  rispetto alle cellule non stimulate.

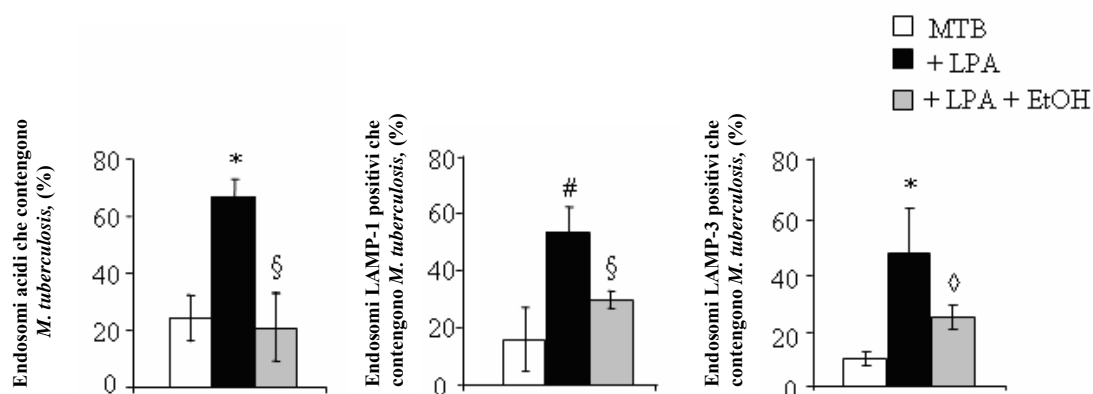
### **3.4.3 LPA e S1P inducono maturazione del fagolisosoma attraverso l'attivazione della PLD**

E' noto che la PLD è coinvolta nella biogenesi del fagolisosoma (*Garg SK. et al., 2004*); inoltre MTB persiste all'interno della cellula in endosomi precoci impedendone la maturazione (*Flynn JL., 2004; Kaufmann SH., 2001*). In tale contesto, abbiamo investigato, in microscopia confocale a fluorescenza, la capacità dei lisofosfolipidi di favorire in cellule A549 la maturazione dei fagolisosomi attraverso la marcatura con il colorante acidofilo LysoTracker red. Poiché l'acidificazione dei fagosomi non necessariamente indica la completa maturazione endolisosomale, è stata anche valutata l'espressione delle proteine LAMP-1 e LAMP-3, marcatori degli endolisosomi maturi. La figura rappresentativa 3.18, pannello A, mostra che in assenza di S1P i bacilli tubercolari risultano verdi, indicando la loro presenza nei compartimenti endosomali non maturi. Al contrario, la stimolazione con 0.5 $\mu$ M di S1P induce un incremento nella maturazione degli endosomi contenenti MTB, che appaiono gialli. Inoltre la presenza di etanolo con S1P annulla completamente tale processo. La percentuale dei bacilli tubercolari che risiedono negli endosomi acidi e negli endosomi LAMP-1 e LAMP-3 positivi in cellule stimulate con LPA o con S1P, è mostrata, rispettivamente, nei pannelli B e C della figura 3.18. In conclusione abbiamo dimostrato che la stimolazione con i lisofosfolipidi incrementa la co-localizzazione dei micobatteri in compartimenti endosomali maturi, e la presenza di etanolo annulla tale processo, indicando l'implicazione della PLD.

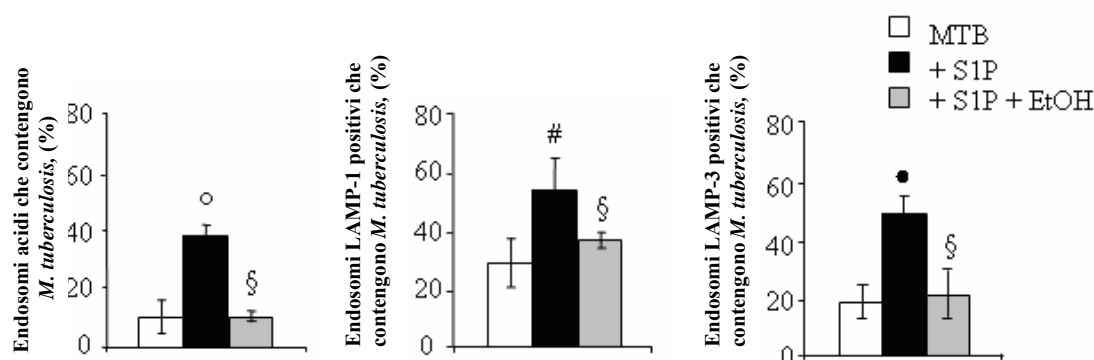
**Pannello A**



## Pannello B



## Pannello C

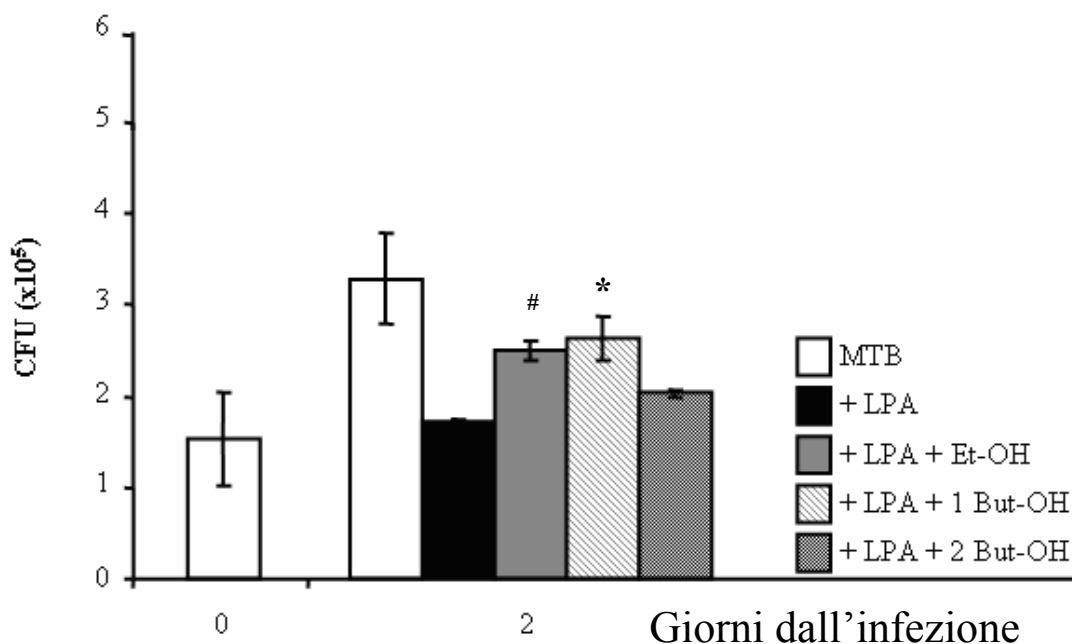


**Figura 3.18: LPA e S1P promuovono la maturazione dell'endolisosoma in cellule A549 infettate con MTB.** Pannello A: l'immagine, rappresentativa di 3 diversi esperimenti, mostra i micobatteri che risiedono nei vacuoli acidi dopo il trattamento con S1P. In presenza di etanolo, invece, tale effetto viene meno. Pannello B e C: media in percentuale  $\pm$  d.s. di MTB che co-localizza con gli endosomi acidi, LAMP-1 positivi, o LAMP-3 positivi determinati dalla conta di piú di 50 cellule per condizione. Nel pannello B le cellule sono state trattate con LPA, nel pannello C con S1P. Sono stati eseguiti 4 esperimenti diversi. \*p=0.01, <sup>o</sup>p=0.006, <sup>◊</sup>p=0.003, <sup>◊</sup>p=0.001, #p=0.03, §p=n.s. rispetto alle cellule di controllo infettate con MTB.

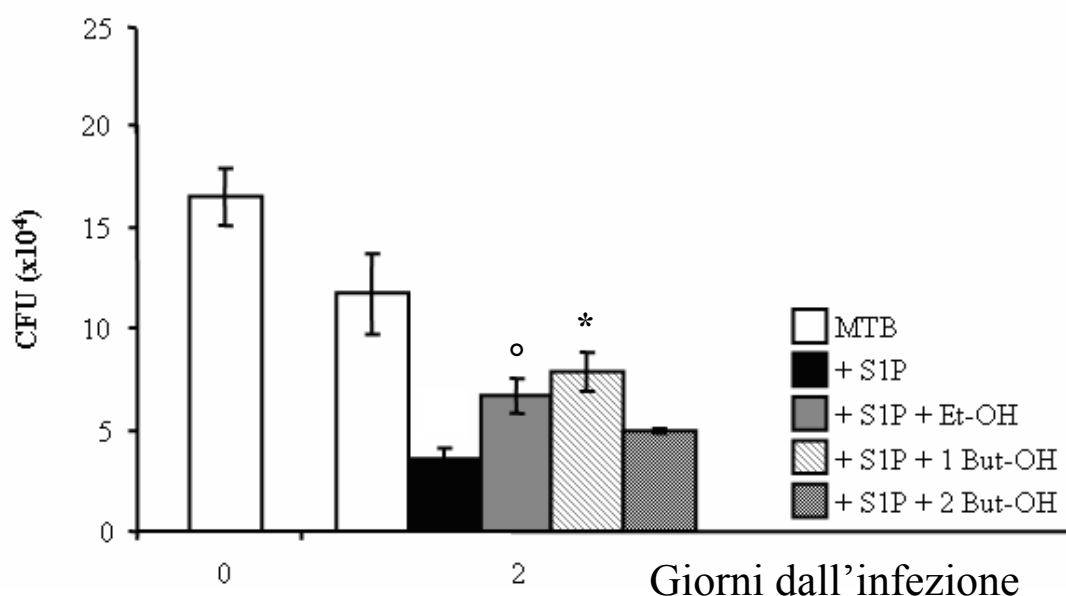
### 3.4.4 LPA e S1P inducono inibizione della crescita intracellulare di MTB attraverso l'attivazione della PLD e la maturazione del fagolisosoma

Il coinvolgimento della PLD nell'attività antimicobatterica indotta dai lisofosfolipidi è stata studiata stimolando le A549 con 0.5 $\mu$ M di LPA o con 0.5 $\mu$ M di S1P in presenza di etanolo o 1-butanolo, alcool primari che inibendo la produzione di PA mediata dall'azione della PLD portano alla formazione di fosfatidiletanolo (PetOH), composto metabolicamente inerte. I risultati, mostrati in figura 3.19, indicano che LPA e S1P inibiscono la crescita intracellulare di MTB; tuttavia i lisofosfolipidi in presenza di alcool primari, ma non con 2-butanolo (usato come controllo), incrementano significativamente la vitalità intracellulare di MTB.

**Pannello A**



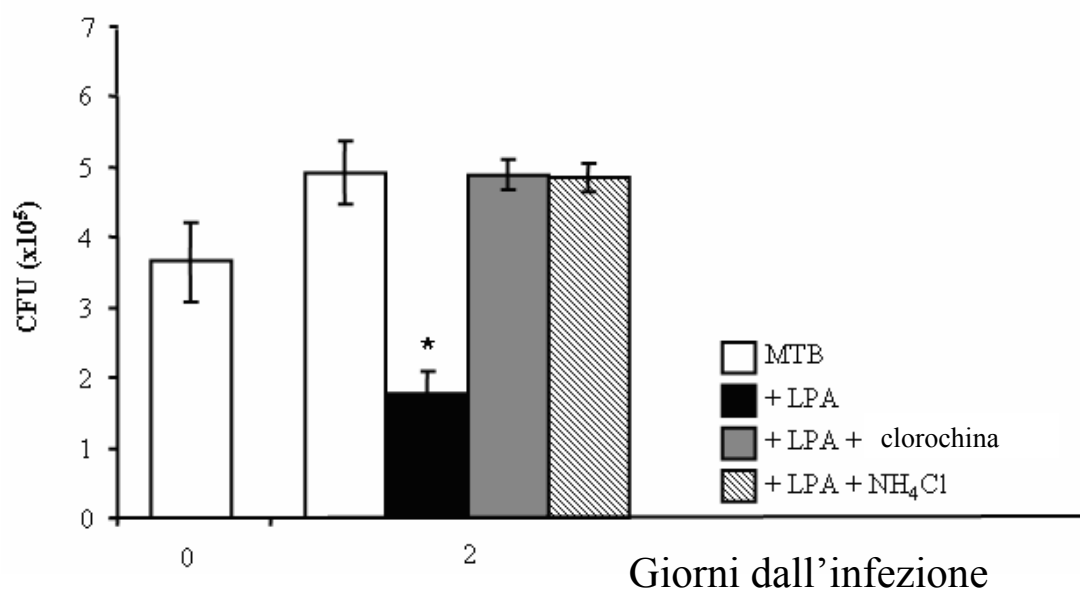
## Pannello B



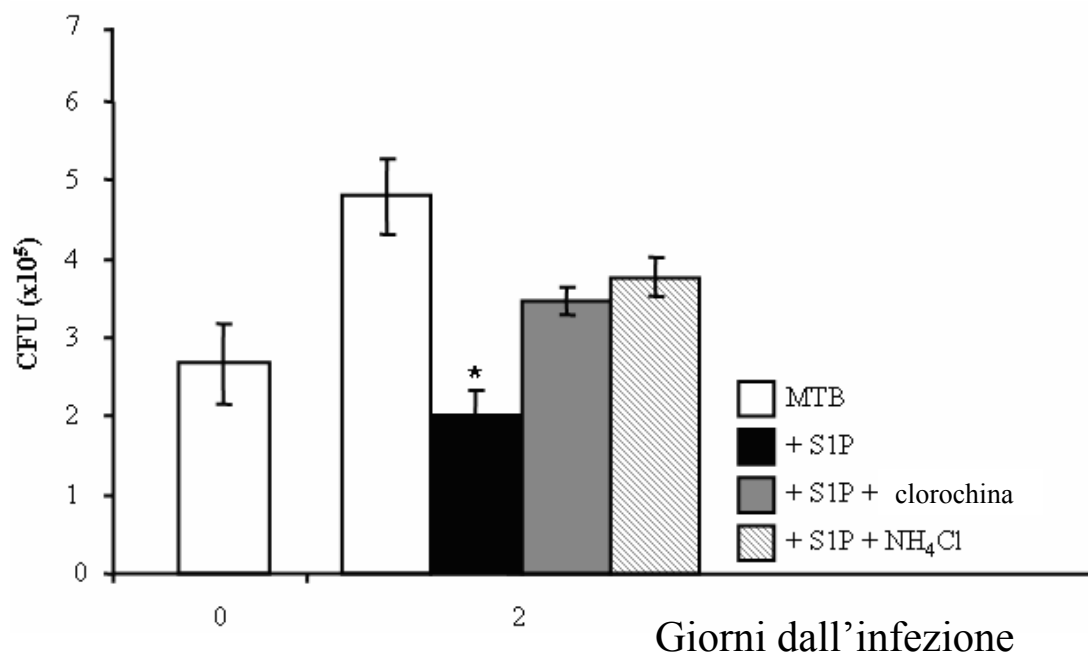
**Figura 3.19: LPA e S1P inducono l'uccisione intracellulare di MTB PLD-dipendente in cellule A549.** Le cellule A549 sono state infettate con MTB ad una MOI di 1 e incubate per 2 giorni con  $0.5\mu\text{M}$  di LPA (Pannello A) o  $0.5\mu\text{M}$  di S1P (Pannello B), in presenza di etanolo, o 1-butanolo, o 2-butanolo. I risultati di CFU sono mostrati come le medie  $\pm$  d.s. di valori in triplicato e sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. \* $p=0.001$ , # $p<0.001$  ° $p=0.003$  rispetto alle cellule infettate e trattate con i fosfolipidi.

Infine allo scopo di analizzare il coinvolgimento della maturazione del fagolisosoma, mediata dai fosfolipidi, nell'attività antimicobatterica, le cellule A549 sono state infettate con MTB e trattate con LPA e S1P in presenza di agenti lisosomotropici come cloroquina e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . I risultati mostrano come LPA e S1P inducano una riduzione della crescita intracellulare di MTB; la presenza di cloroquina e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  riporta la crescita di MTB ai livelli osservati nelle cellule infettate e non trattate (Figura 3.20).

### Pannello A



### Pannello B

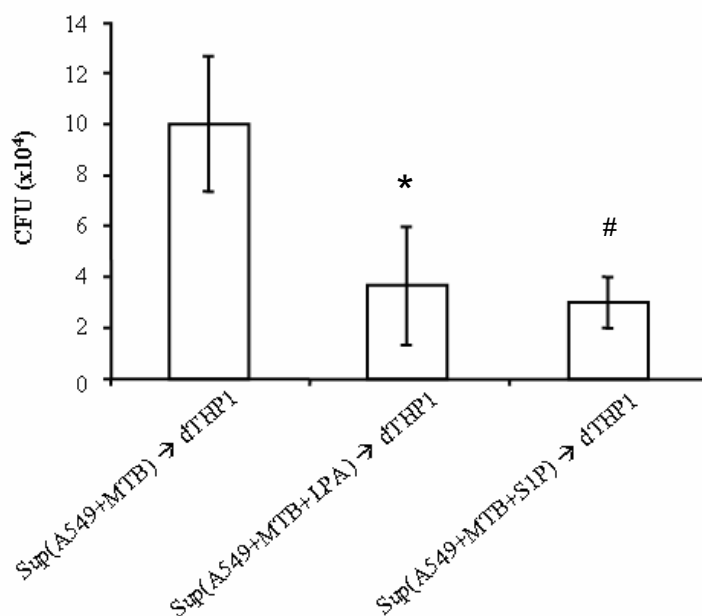


**Figura 3.20: LPA e S1P inibiscono la crescita intracellulare di MTB in cellule A549 attraverso la maturazione del fagolisosoma.** Le cellule A549 sono state infettate con MTB ad una MOI di 1 e incubate per 2 giorni con 0.5 $\mu$ M di LPA (Pannello A) o 0.5 $\mu$ M di S1P (Pannello B), con o senza cloroquina o NH<sub>4</sub>Cl. I risultati di CFU sono mostrati come le medie  $\pm$  d.s. di valori in triplicato e sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. \* $p < 0.001$  rispetto alle cellule di controllo infettate con MTB e infettate e trattate con i lisofosfolipidi pi $\dot{u}$  Cq o NH<sub>4</sub>Cl.



### 3.4.5 La stimolazione con i lisofosfolipidi di cellule epiteliali alveolari infettate con MTB riduce *in vitro* il rilascio e la disseminazione micobatterica verso i macrofagi

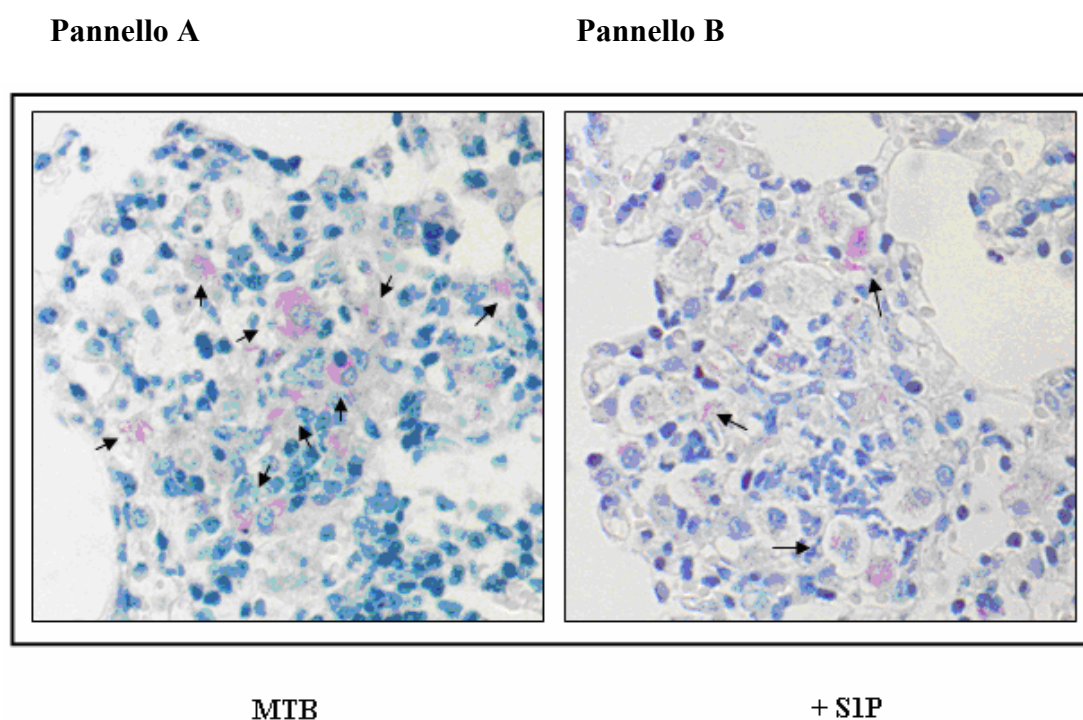
Allo scopo di verificare se il contenimento di MTB da parte delle cellule dell'epitelio alveolare possa prevenire il rilascio e la disseminazione dei micobatteri nei tessuti sottostanti e quindi evitare che l'infezione raggiunga i macrofagi sottostanti (Russell DG., 2001), le cellule A549 sono state infettate con MTB e stimulate o meno con LPA o S1P. Dopo due giorni, i supernatanti delle cellule A549 sono stati raccolti, centrifugati a 14000 rpm, ed i batteri usati per infettare cellule dTHP-1. Il saggio delle CFU è stato effettuato sui macrofagi dopo 4 giorni dall'esposizione ai batteri. I risultati, mostrati in figura 3.21, evidenziano che il trattamento delle A549 con LPA o S1P previene il rilascio dei micobatteri dalle A549 e la conseguente infezione dei macrofagi.



**Figura 3.21: la stimolazione con LPA e S1P delle cellule epiteliali alveolari riduce la disseminazione micobatterica verso i macrofagi.** Le cellule A549 sono state infettate con MTB ad una MOI di 10 e incubate per 2 giorni con 0.5µM di LPA o 0.5µM di S1P. Successivamente i supernatanti sono stati centrifugati, i pellet micobatterici sono stati risospesi in RPMI completo e somministrati alle dTHP-1 per 4 giorni. I risultati di CFU sono mostrati come le medie ± d.s. di valori in triplicato e sono rappresentativi di 2 esperimenti indipendenti. \*p=0.01, #p=0.006 rispetto alle cellule di controllo infettate con MTB.

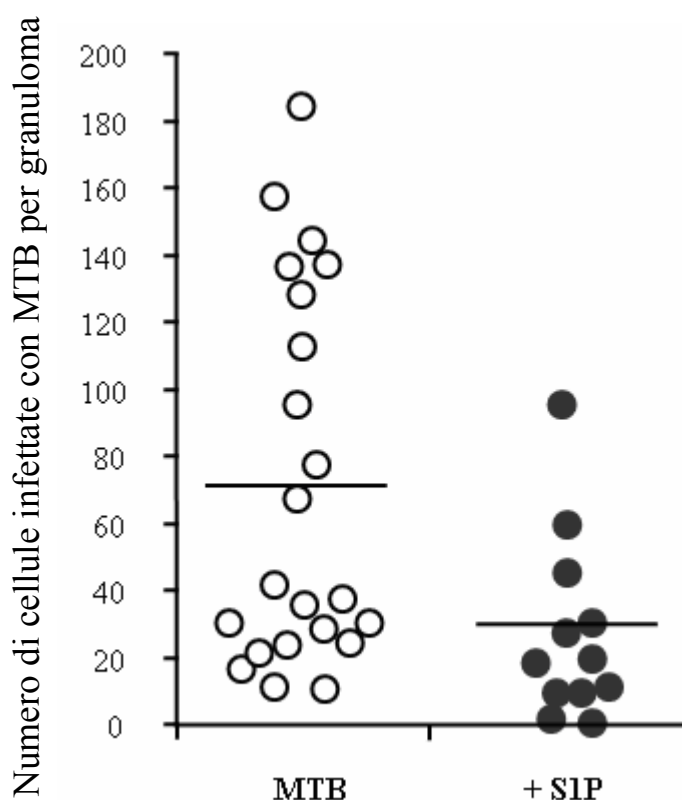
### 3.4.6 Il trattamento con S1P riduce la carica micobatterica polmonare in topi aerogenicamente infettati con *M. tuberculosis*

Le cellule epiteliali alveolari di tipo II possono promuovere la disseminazione micobatterica dopo il legame con la proteina HBHA (heparin-binding hemagglutinin) (Menozzi FD., 2005). Sulla base dei dati ottenuti *in vitro* descritti precedentemente, abbiamo valutato il possibile effetto terapeutico di S1P nel corso d'infezione primaria in topi aerogenicamente infettati con MTB, come modello di tubercolosi murina. La figura 3.22 mostra immagini rappresentative di istopatologie polmonari effettuate 14 giorni dopo l'infezione dove, nonostante non ci sia differenza nella grandezza della superficie granulomatosa, si osserva un numero inferiore di cellule contenenti i micobatteri nei topi trattati con 20 nmoli S1P (pannello B), in confronto con i topi non trattati (pannello A).

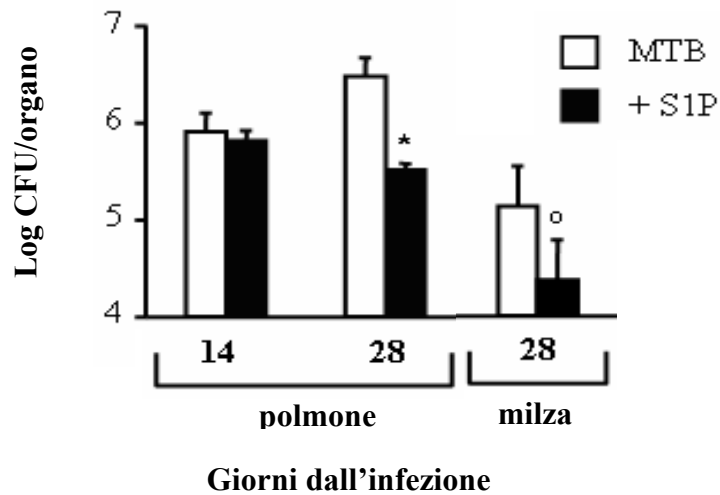


**Figura 3.22: Esame morfologico del tessuto polmonare (ingrandimento 40x) di topi infettati con MTB in seguito a trattamento con S1P.** I topi sono stati aerogenicamente infettati con *M. tuberculosis* e trattati con iniezioni intravena di S1P, somministrata a partire dal primo giorno d'infezione ed ad intervalli di 4 giorni. I polmoni sono stati recuperati dai topi infettati con MTB (Pannello A), e dai topi infettati con MTB e trattati con S1P (Pannello B), 14 giorni dopo l'infezione. I campioni sono stati fissati, processati e colorati con ematossilina-eosina; i bacilli sono stati visualizzati usando la colorazione Ziehl-Nielsen. Le frecce indicano le cellule infettate con MTB.

I risultati ottenuti attraverso l'analisi di tutti i granulomi riscontrati nei topi di controllo e in quelli trattati con S1P, sono riassunti nella figura 3.23, dove si evince un decremento statisticamente significativo nel numero delle cellule infettate con MTB per granulomi polmonari in seguito al trattamento con S1P. Questi risultati istopatologici sono associati ad una significativa riduzione delle colonie micobatteriche dopo 28 giorni dall'infezione nei polmoni (-0,96 log CFU) e nella milza (-0,77 log CFU) dei topi trattati con S1P (figura 3.24).



**Figura 3.23: S1P migliora l'istopatologia del tessuto polmonare in topi infettati aerogenicamente.** La figura mostra il numero di cellule infettate con MTB per granuloma, dopo 14 giorni dall'infezione. La linea indica il valore medio. Topi infettati con MTB in confronto con topi trattati con S1P,  $p=0.009$  secondo il test di Mann-Whitney.



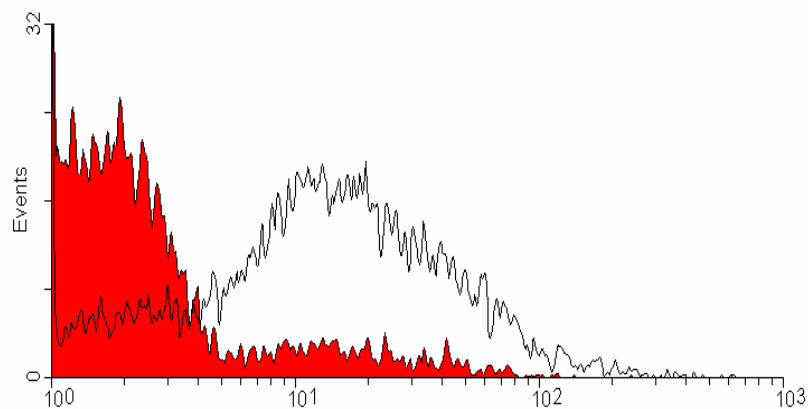
**Figura 3.24: S1P riduce la carica micobatterica polmonare e nella milza in topi aerogenicamente infettati con MTB.** La figura mostra la colonizzazione batterica nel tessuto polmonare e nella milza ai tempi indicati in topi infettati con MTB e trattati con S1P. I dati sono espressi in scala logaritmica ed indicano le riduzioni delle CFU nei topi trattati con S1P in confronto a topi controllo. Nel caso della milza dopo 14 giorni dall'infezione non sono state rilevate colonie. \*p=0.001 e °p=0.04 in comparazione con i topi infettati con MTB e non trattati.

## **3.5 Generazione di liposomi bioattivi coinvolti nella risposta antimicobatterica**

### **3.5.1 Produzione di liposomi asimmetrici**

Tutti i dati mostrati finora indicano che i diversi ligandi, d'origine naturale e microbica, sono in grado di ridurre la percentuale di vitalità dei micobatteri in cellule monocito-macrofagiche e in cellule epiteliali alveolari. In questo contesto, abbiamo ampiamente studiato il ruolo dell'enzima chiave fosfolipasi D (PLD), identificando nel suo prodotto, l'acido fosfatidico (PA), un intermedio metabolico intracellulare in grado di attivare la risposta antimicobatterica. Allo scopo di disegnare un sistema che consentisse di veicolare il PA direttamente nella cellula bersaglio macrofagica, abbiamo realizzato un liposoma che presentasse PA all'interno e fosfatidilserina (PS) all'esterno. In questo modo il PA viene veicolato dentro la cellula bersaglio dove può aumentare la capacità microbica, e inoltre la presenza di PS esterno caratterizza il liposoma come un corpo apoptotico e ne conferisce un naturale tropismo verso i macrofagi, preferenziali cellule bersaglio di *M. tuberculosis*.

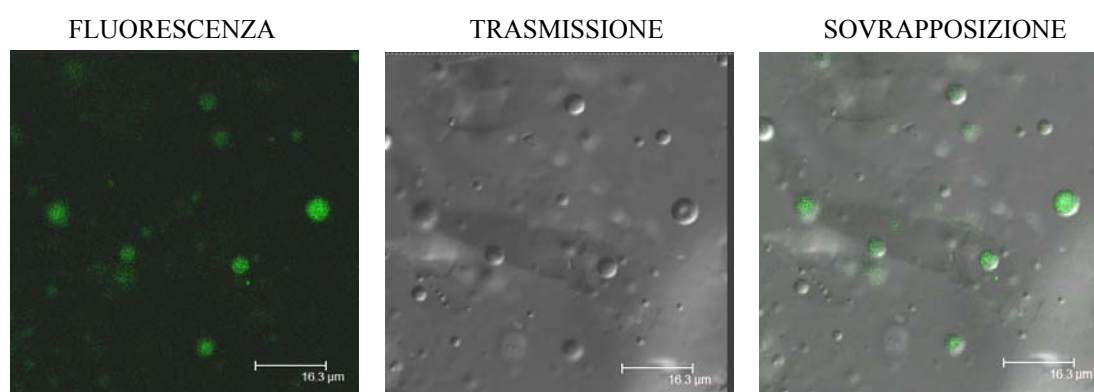
In primo luogo, abbiamo voluto verificare la presenza della PS all'esterno, marcando i liposomi con Annexina V fluorescente e analizzandoli al citofluorimetro. La figura 3.24 mostra un incremento dell'intensità di fluorescenza nei liposomi contenenti PS all'esterno rispetto al controllo non marcato.



Annexina V-FITC

**Figura 3.24: Caratterizzazione citofluorimetrica dei liposomi contenenti fosfatidilserina all'esterno.** Liposomi contenenti PS/PA sono stati marcati con Annexina V coniugata a FITC ed analizzati al citofluorimetro, sovrapponendo l'autofluorescenza dei liposomi non marcati con la fluorescenza.

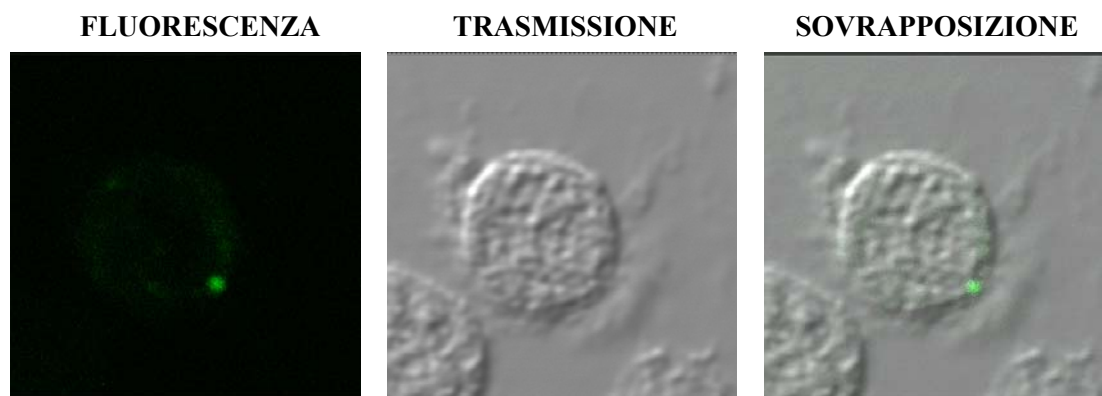
Successivamente, per verificare la presenza di acido fosfatidico all'interno delle vescicole prodotte, è stato utilizzato PA coniugato con il fluoroforo NBD ( $\lambda$ eccitazione: 460nm;  $\lambda$ emissione : 534nm ) per la composizione del foglietto interno della membrana fosfolipidica. L'analisi in microscopia confocale a fluorescenza ha mostrato la presenza di PA all'interno dei liposomi (Figura 3.25).



**Figura 3.25: Presenza di PA fluorescente nei liposomi.** In microscopia confocale a fluorescenza abbiamo analizzato liposomi costituiti da PS esterno e da PA coniugato a NBD internamente. Notiamo la presenza di acido fosfatidico in liposomi di dimensioni eterogenee.

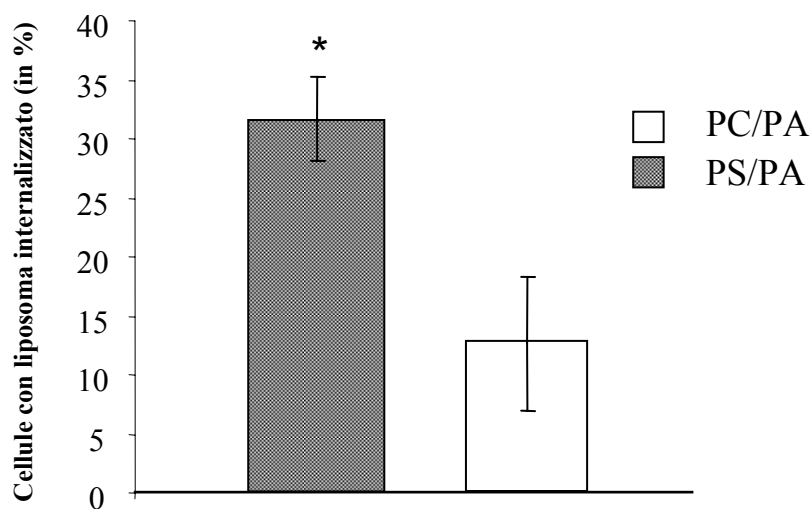
### 3.5.2 I liposomi PS/PA sono efficacemente fagocitati dai macrofagi

Allo scopo di verificare l'ingresso dei liposomi all'interno dei macrofagi, ne abbiamo studiato la fagocitosi in microscopia confocale a fluorescenza. Coerentemente alla natura fagocitica del macrofago, ci aspettavamo che sebbene questa cellula fagocitasse tutte le tipologie di vescicola, mostrasse una particolare predilezione verso quelle che presentassero all'esterno la fosfatidilserina per la loro somiglianza con i corpi apoptotici. Abbiamo quindi realizzato delle vescicole che presentassero fosfatidilserina all'esterno e acido fosfatidico fluorescente all'interno, così da poter essere monitorate in microscopia a fluorescenza. I risultati ottenuti, indicati in figura 3.26, mostrano che i liposomi vengono internalizzati all'interno dei macrofagi, come risulta dalla colorazione verde della vescicola (fluoroforo NBD).



**Figura 3.26: Localizzazione intracellulare dei liposomi.** Le cellule dTHP-1 sono state stimulate per 90 minuti con lo stesso numero di liposomi contenenti PA fluorescente ed in seguito sono state analizzate tramite microscopia confocale a fluorescenza. In questa immagine rappresentativa si nota una localizzazione citoplasmatica dei liposomi PS/PA.

Una volta confermata la presenza dei liposomi all'interno della cellula, abbiamo confrontato l'entità di fagocitosi di due preparazioni liposomali contenenti acido fosfatidico fluorescente all'interno e fosfatidilserina o fosfatidilcolina (come controllo negativo) all'esterno. I risultati indicati in figura 3.27 mostrano un aumento significativo ( $p=0.004$ ) della fagocitosi dei liposomi con PS esterno (31.7% delle cellule presentavano il liposoma PS/PA all'interno) rispetto a quelli con PC esterno (12.7% delle cellule presentavano il liposoma PC/PA all'interno).

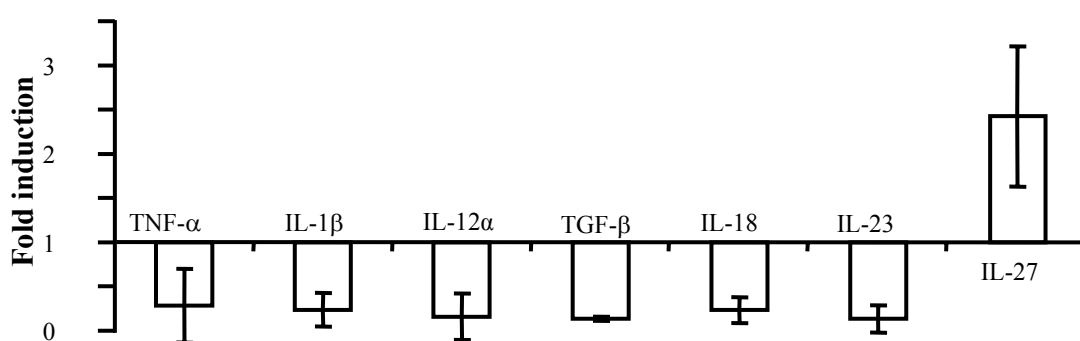


**Figura 3.27: La presenza di PS all'esterno favorisce il processo di fagocitosi.** Le cellule dTHP-1 sono state esposte a liposomi PS/PA o a liposomi PC/PA. Dopo un'incubazione di circa 90 minuti, abbiamo analizzato al microscopio confocale a fluorescenza le cellule che avevano internalizzato i liposomi col PA fluorescente rispetto al numero di cellule totali, contando almeno 100 cellule per campione. I dati sono mostrati come media  $\pm$  deviazione standard delle percentuali di cellule che avevano internalizzato almeno un liposoma rispetto alle cellule totali, ottenute in 3 esperimenti indipendenti.



### 3.5.3 I liposomi PS/PA riducono la produzione di citochine proinfiammatorie nei macrofagi

E' noto che la fagocitosi, e la successiva biogenesi del fagolisosoma all'interno dei macrofagi alveolari, sono meccanismi associati alla produzione di citochine immunoregatorie. Allo scopo di valutare l'effetto della fagocitosi dei liposomi sulla produzione di citochine da parte dei macrofagi, è stata effettuata una real time-PCR per rilevare i livelli di RNA di diverse citochine prodotte dalle cellule dTHP-1 in seguito alla stimolazione con i liposomi PS/PA. I risultati indicano che il trattamento con i liposomi asimmetrici PS/PA porta ad una riduzione nella produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 $\alpha$ , IL-23, IL-18) da parte delle cellule macrofagiche e ad un aumento nella produzione di citochine anti-infiammatorie (IL-27), con l'eccezione dell' TGF- $\beta$  (figura 3.28).



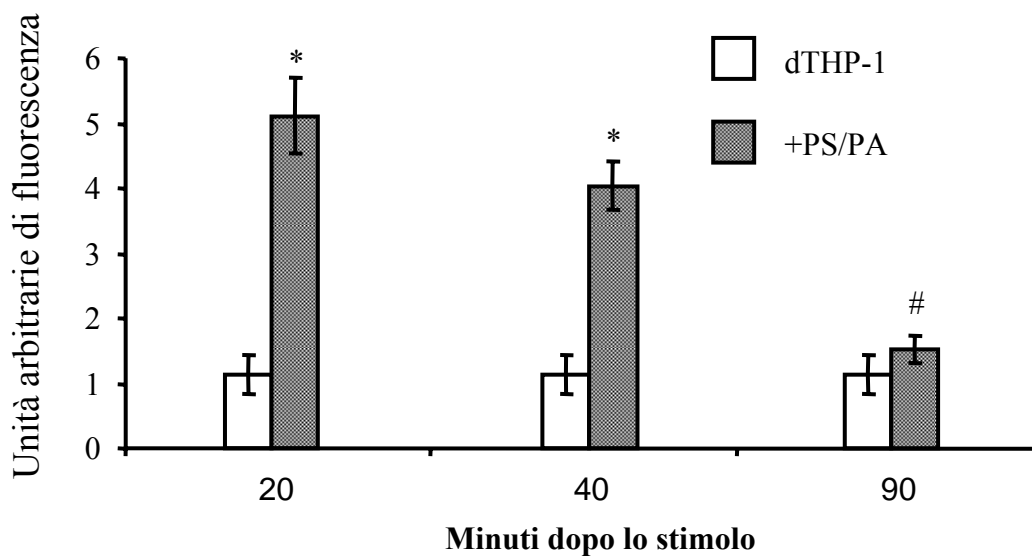
**Figura 3.27: Profilo delle citochine indotte dal trattamento con i liposomi PS/PA.** Le cellule dTHP-1 sono state stimolate con lo stesso numero di liposomi per 18 ore e in seguito sono stati analizzati i livelli di RNA di ogni citochina attraverso Real Time-PCR. Il grado d'induzione del campione rispetto al controllo negativo, rappresentato dalle sole dTHP-1, è stato calcolato attraverso la formula matematica del metodo comparativo Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), dove  $\Delta\Delta Ct$  è uguale a  $\Delta Ct_{\text{cellule indotte}} - \Delta Ct_{\text{cellule non indotte}}$ .

### **3.5.4 I liposomi PS/PA inducono la mobilizzazione del calcio intracellulare nei macrofagi umani**

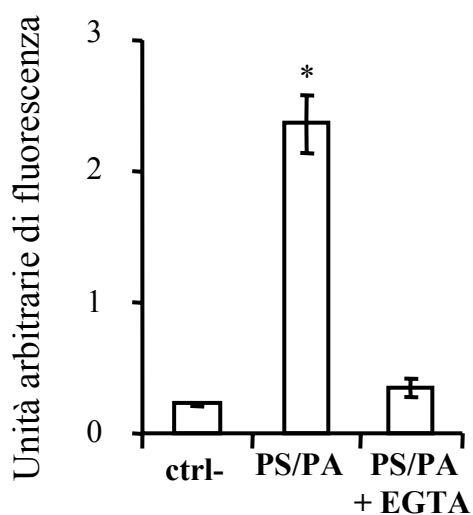
Studi recenti mostrano che *M. tuberculosis* ha la capacità di inibire la mobilizzazione intracellulare del  $\text{Ca}^{++}$  con conseguente inibizione della formazione del fagolisosoma (*Malik et al., 2000*). Inoltre, la generazione di PA tramite l'attività della PLD è spesso associata alla mobilizzazione del  $\text{Ca}^{++}$ . Su queste basi, è stato valutato se, la somministrazione di liposomi asimetrici PS/PA ai macrofagi, fosse in grado di indurre, a diversi tempi di cinetica, un aumento del  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare.

I risultati ottenuti, mostrano un aumento statisticamente significativo dei livelli di  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare, espressi in unità arbitrarie di fluorescenza, dopo 20, 40 e 90 minuti dalla stimolazione (Pannello A figura 3.28). Il trattamento con il chelante del  $\text{Ca}^{++}$  extracellulare EGTA riporta ai livelli basali il flusso di calcio anche in seguito al trattamento con i liposomi (Pannello B figura 3.28).

### Pannello A



### Pannello B

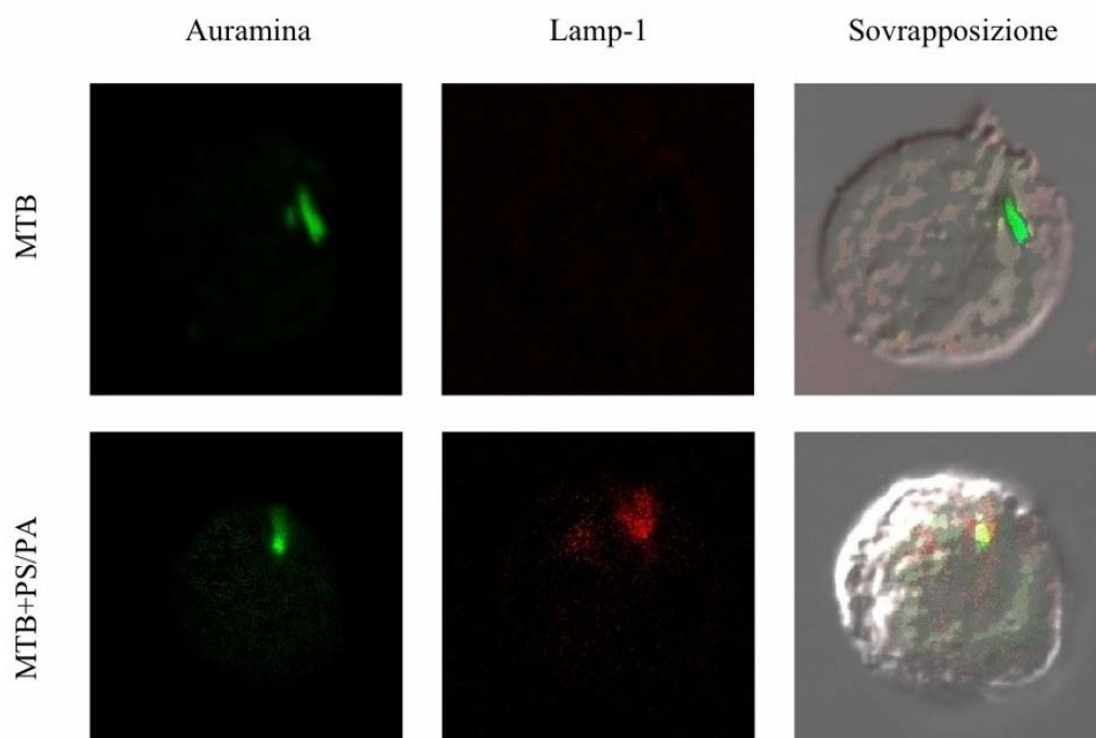


**Figura 3.28: I liposomi PS/PA inducono un aumento dei livelli di calcio intracellulare nei macrofagi.** Pannello A: le cellule dTHP-1 sono state stimolate o meno con i liposomi PS/PA per 20, 40 e 90 minuti, e sono stati valutati i livelli di calcio intracellulare espressi in unità arbitrarie di fluorescenza. \* $p=0.006$ , # $p=n.s.$  rispetto alle cellule di controllo non trattate. Pannello B: le cellule dTHP-1 sono state trattate o meno con EGTA 3 mM per 15 minuti e in seguito hanno subito la stimolazione con i liposomi PS/PA per cellula per 20 minuti. \* $p<0.001$ . Tutti i dati riportati sono espressi come media  $\pm$  dev. st. dei valori in triplicato e sono rappresentativi di tre esperimenti separati.

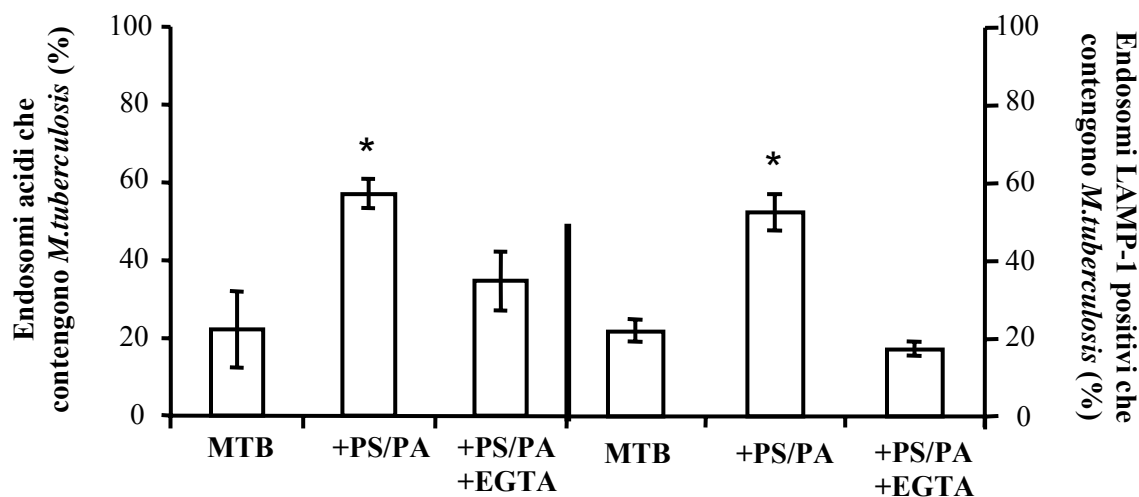
### 3.5.5 I liposomi PS/PA promuovono la maturazione del fagolisosoma

Abbiamo già visto che, per una corretta maturazione del fagolisosoma, è necessario un aumento dei livelli del  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare. E' stata, quindi, monitorata la biogenesi del fagolisosoma in cellule dTHP-1 infettate con il ceppo patogeno *M. tuberculosis* e trattate con liposomi PS/PA, in presenza o assenza del chelante del calcio extracellulare EGTA. Poiché l'acidificazione fagosomale avviene prima del completamento del processo di maturazione e potrebbe non essere caratteristica dei fagolisosomi maturi (*Sturgill-Koszycki et al., 1994*), è stata valutata anche l'espressione del LAMP-1 come marcatore fagolisosomale tardivo, oltre all'acidificazione del fagolisosoma visibile con il colorante LysoTracker red. I risultati ottenuti in microscopia confocale mostrano che il trattamento con liposomi PS/PA di macrofagi infettati con *M. tuberculosis* promuove la co-localizzazione di micobatteri (verdi) in compartimenti esprimenti LAMP-1 (rossi), che appaiono gialli alla sovrapposizione delle due fluorescenze (figura 3.29, pannello A). L'analisi quantitativa indica un aumento statisticamente significativo della percentuale di colocalizzazione di micobatteri in fagosomi esprimenti LAMP-1 (lato destro) o LysoTracker red (lato sinistro) dopo stimolazione con liposomi PS/PA rispetto al controllo. Inoltre, il trattamento con EGTA inibisce il processo di maturazione fagolisosomale indotto da liposomi PS/PA (figura 3.29, pannello B).

### Pannello A



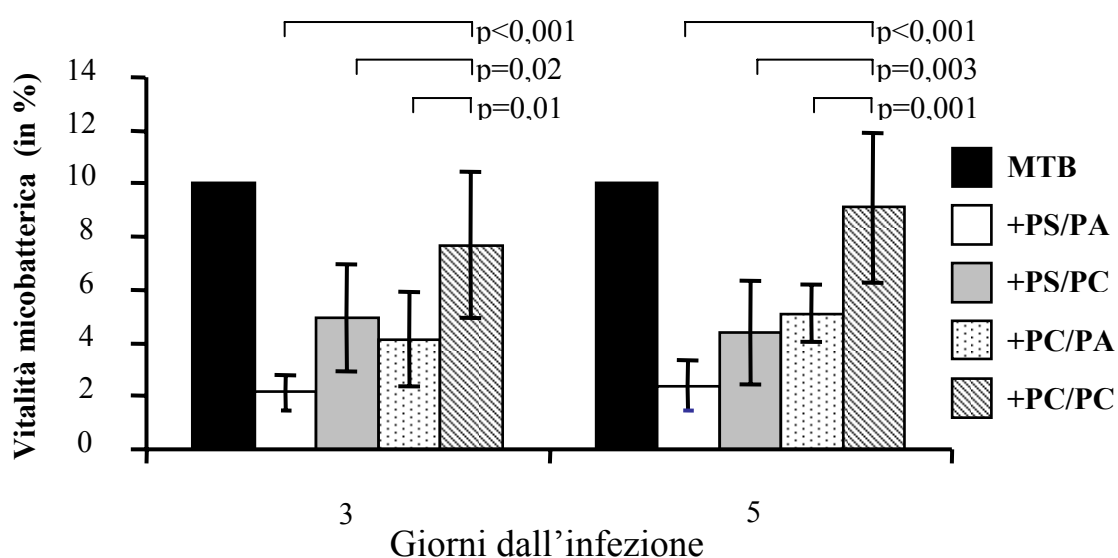
### Pannello B



**Figura 3.29: I liposomi PS/PA inducono maturazione fagolisosmale  $\text{Ca}^{++}$ -dipendente.** Pannello A: figura rappresentativa di cellule dTHP-1 infettate con MTB ad una MOI di 1, stimulate con i liposomi PS/PA per 3 ore e marcate con anticorpo monoclonale anti-LAMP-1. Pannello B: media in percentuale  $\pm$  d.s. dei micobatteri colocalizzati negli endosomi LAMP-1 positivi o negli endosomi acidi. L'analisi è stata effettuata su tre diversi esperimenti, considerando almeno 30 bacilli per campione. \*  $p < 0.0003$  rispetto al controllo non trattato.

### 3.5.6 I liposomi PS/PA inducono attività micobattericida nei macrofagi

Poiché la maturazione fagolisosomale è associata all'attivazione dei meccanismi micobattericidi, abbiamo valutato la crescita intracellulare micobatterica in seguito a stimolazione con le seguenti preparazioni liposomali: i) PS/PA; ii) PS/PC; iii) PC/PA; iv) PC/PC. La crescita micobatterica è stata monitorata attraverso saggi di CFU dopo 3 e 5 giorni dall'infezione. I risultati indicati in figura 3.30 mostrano l'assenza di qualsiasi riduzione della vitalità micobatterica intracellulare in seguito a stimolazione con liposomi PC/PC. Inoltre il trattamento con i liposomi PS/PA, e in misura minore quello con i liposomi PS/PC e PC/PA, induce un decremento statisticamente significativo della vitalità micobatterica.

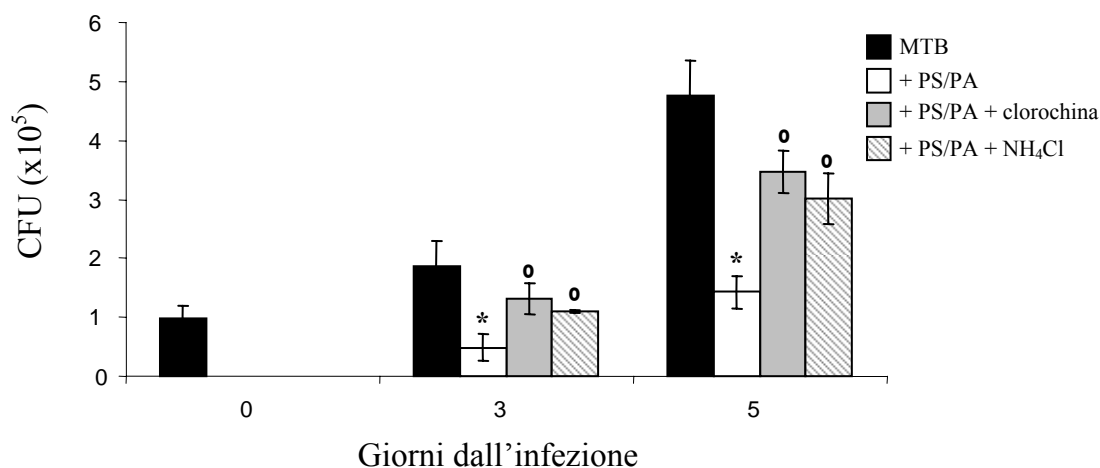


**Figura 3.30: Vitalità intracellulare di *M. tuberculosis* in dTHP-1 stimolate con diverse tipologie di liposomi.** Le cellule sono state infettate con MTB ad una MOI di 1 batterio per cellula e stimolate con liposomi PS/PA, PS/PC, PC/PA o PC/PC in triplicato. Ai tempi indicati e su ogni pozzetto di coltura è stato eseguito in triplicato il saggio delle CFU. I dati sono espressi come valori percentuali medi  $\pm$  d.s. di tutti i valori ottenuti rispetto al controllo negativo rappresentato dai soli macrofagi infettati. La percentuale della vitalità intracellulare di MTB è stata calcolata come segue: [(CFU derivanti dalle cellule dTHP-1 infettate con MTB e trattate con i liposomi/ CFU derivanti dalle cellule dTHP-1 infettate con MTB) x 100].

### 3.5.7 L'uccisione intracellulare di MTB indotta dai liposomi PS/PA è mediata dalla maturazione del fagolisosoma

Allo scopo di valutare il coinvolgimento della maturazione del fagolisosoma nell'attività antimicobatterica indotta dai liposomi PS/PA, le cellule dTHP-1, infettate con *M. tuberculosis*, sono state stimulate con due agenti lisosomotropici, come la cloroquina (Cq) o il cloruro d'ammonio (NH<sub>4</sub>Cl) e trattate con i liposomi PS/PA. L'attività antimicobatterica è stata valutata attraverso un saggio di CFU dopo 3 ore dall'infezione, e dopo 3 e 5 giorni dai trattamenti.

I risultati indicano che la presenza dei due agenti inibenti la maturazione del fagolisosoma, porta ad un incremento statisticamente significativo della crescita micobatterica intracellulare rispetto alle cellule trattate con i soli liposomi PS/PA, annullando, sebbene non completamente, l'effetto indotto da questi ultimi (figura 3.31).



**Figura 3.31: La maturazione del fagolisosoma è coinvolta nell'uccisione intracellulare micobatterica indotta dai liposomi PS/PA.** Le cellule dTHP-1 sono state infettate con MTB (MOI:1), trattate con i liposomi PS/PA e con o senza 10 $\mu$ M di Cq e 20mM di NH<sub>4</sub>Cl. Le CFU sono espresse come media  $\pm$  d.s. dei valori in triplicato e sono rappresentative di 3 esperimenti separati. \* p<0.001 rispetto alle cellule infettate con MTB e non trattate; <sup>o</sup>p<0.001 rispetto alle cellule infettate e trattate con PS/PA.

## 4. DISCUSSIONE

Il successo evolutivo di *M. tuberculosis* risiede nella sua capacità di sopravvivere e replicarsi in un ambiente a lui ostile, riuscendo ad evitare la risposta immunitaria. Tale fenomeno è strettamente legato al complesso equilibrio che si viene ad instaurare tra l'ospite e il patogeno e che determina l'esito dell'infezione stessa (Medzhitov R. et al., 1997). Com'è ben noto, le vie aeree sono il primo sito d'ingresso e di contatto per il micobatterio, che viene veicolato principalmente dall'aria inspirata (Diamond G. et al., 2000). In questo contesto la prima linea di difesa dell'organismo umano è costituita dalla risposta immunitaria innata esplicita in primo luogo dalle cellule dell'epitelio alveolare, di cui è dimostrata la produzione, oltre che di muco, anche di chemochine di diversa natura, citochine, peptidi antimicrobici e proteine del surfattante (Travis SM. et al., 2001), e dai macrofagi alveolari che fagocitano i microbi determinandone l'uccisione mediante la maturazione del fagolisosoma e l'attivazione di enzimi proteolitici (Orme I., 2004). Nelle prime fasi dell'interazione tra l'ospite umano e *M. tuberculosis* le cellule epiteliali alveolari sono cruciali per l'esito dell'infezione. Durante tale interazione, infatti, tali cellule possono influenzare l'esito dell'infezione primaria iniziando una risposta infiammatoria tramite la produzione di MCP-1 e IL-8 (Lin Y. et al., 1998) e promuovendo la disseminazione micobatterica dopo il legame con l'HBHA (Menozzi FD. et al., 2005) o in seguito a morte cellulare (Danelishvili L. et al., 2003). E' noto che le cellule A549 possono indurre l'uccisione intracellulare di MTB producendo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  o NO (Roy S. et al., 2004) e inoltre possono produrre  $\beta$ -defensina-2, molecola in grado di svolgere attività antimicobatteriche, in seguito all'infezione tubercolare (Rivas-Santiago B. et al., 2005). Le cellule epiteliali alveolari partecipano alla formazione del granuloma e al contenimento del micobatterio durante le fasi effettive della risposta



immunitaria adattativa, attraverso la presentazione di antigeni micobatterici alle cellule T CD4<sup>+</sup> antigene-specifiche (Debbabi H. et al., 2005). Tuttavia, il ruolo delle cellule epiteliali alveolari nel contenere la crescita intracellulare micobatterica durante le fasi iniziali dell'infezione, prima che si instauri la risposta immunitaria adattativa, non è stata ancora pienamente chiarito. Inoltre a più di quarant'anni dalla scoperta della rifampicina non sono stati fatti grandi passi in avanti nella lotta contro la tubercolosi. Attualmente tra i principali ostacoli al controllo della malattia, annoveriamo la pandemia dell'infezione da HIV e la concomitante infezione con MTB, la scarsa aderenza dei pazienti a regimi terapeutici antibiotici molto lunghi (6-8 mesi) e l'insorgenza di ceppi micobatterici farmaco-resistenti (Pai M. et al., 2007; Golan DE. et al., 2006). Alla luce di queste problematiche diventa cruciale identificare ligandi molecolari in grado di controllare la crescita intracellulare del micobatterio e trovare un sistema per veicolare molecole bioattive all'interno di cellule tipicamente bersaglio di *M. tuberculosis*. In questo contesto il primo obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare, in cellule della linea monocito-macrofagica e in cellule epiteliali alveolari, il ruolo di ligandi microbici quali le sequenze CpG, e di ligandi naturali come LPA e S1P nella risposta immunitaria innata antimicobatterica. E' noto in letteratura il ruolo dei TLRs come mediatori dell'immunità innata e la capacità dei PAMPs di indurre un'attività microbicide (Iwasaki A. et al., 2004). In questo contesto abbiamo voluto valutare il ruolo delle sequenze CpG nella risposta antimicobatterica in cellule della linea monocito-macrofagica. I motivi CpG non metilati sono sequenze oligonucleotidiche presenti all'interno del DNA batterico che, attraverso il riconoscimento da parte del TLR-9, sono in grado di attivare il sistema immunitario stimolando sia l'immunità innata che quella adattativa antigene-specifica (van Crevel R. et al., 2002). Inoltre è stato

dimostrato che il trattamento con CpG è in grado di aumentare le difese dell'ospite in un modello di tubercolosi murina (*Juffermans NP. et al., 2002*) e di indurre un'attività antimicobatterica in macrofagi umani infettati da MTB (*Auricchio G. et al., 2003*). Poiché i monociti circolanti indifferenziati rappresentano uno tra i bersagli preferenziali di MTB (*Manca C. et al., 2004*), abbiamo studiato il ruolo delle sequenze CpG nel coinvolgimento della PLD nell'attività micobattericida dei monociti. I nostri risultati mostrano che la stimolazione con CpG innesca in cellule THP-1 un aumento dei flussi di  $Ca^{++}$  extracellulari che portano all'attivazione della PLD. È noto in letteratura che l'aumento della concentrazione del  $Ca^{++}$  nelle cellule fagocitiche è essenziale per l'attivazione dei meccanismi di difesa antimicrobici, quali la produzione di NO, di ROI, di citochine infiammatorie come il TNF- $\alpha$  (*Denlinger LC. et al., 1996; Watanabe N. et al., 1996*). Inoltre, è noto che MTB è in grado di ridurre i livelli di  $Ca^{++}$  nei macrofagi umani (*Malik ZA. et al., 2003*). L'attivazione della PLD  $Ca^{++}$ -dipendente in seguito alla stimolazione con CpG, suggerisce che le sequenze CpG potrebbero essere in grado di ripristinare quei segnali inibiti dal micobatterio e che l'ambiente extracellulare è quindi importante per l'attivazione della risposta immunitaria innata antimicobatterica PLD-dipendente. E' ben noto che la maturazione fagolisosomiale contribuisce all'attività micobattericida (*Kusner DJ. et al., 2000; Auricchio G. et al., 2003; Garg SK. et al., 2004*). I risultati mostrati in questa tesi indicano che l'attivazione della PLD, in seguito alla stimolazione con CpG, porta a maturazione del fagolisosoma e all'uccisione intracellulare del micobatterio. Infatti, la specifica inibizione dell'enzima attraverso l'etanolo annulla completamente gli effetti dati dalla stimolazione con le sequenze CpG. Alla luce di questi risultati abbiamo esteso l'analisi alle cellule epiteliali alveolari di tipo II e abbiamo dimostrato che la stimolazione con sequenze CpG induce, anche in questa

linea cellulare, maturazione del fagolisosoma e l'uccisione intracellulare di MTB attraverso un meccanismo mediato dalla PLD.

Recentemente nel nostro laboratorio è stato dimostrato che il fosfolipide S1P riduce, in modelli d'infezione *in vitro*, la crescita intracellulare di *M. smegmatis* e di MTB tramite l'attivazione della fosfolipasi D macrofagica e la maturazione del fagolisosoma (Garg SK. *et al.*, 2004). In questo contesto abbiamo valutato anche il ruolo di LPA, strutturalmente analogo alla S1P, nella risposta immunitaria innata antimicobatterica. LPA è un lisofosfolipide che come la stessa S1P lega specifici recettori appartenenti della famiglia Edg, espressi in diversi tipi cellulari, tra cui i macrofagi alveolari. LPA, inoltre, è noto essere un importante fattore di crescita, prodotto dalle piastrine, da cellule cancerose e tessuto adiposo ed ha azione sulla crescita di neuroni, di cellule endoteliali, linfociti e macrofagi (Shen Z. *et al.*, 1998). I primi risultati ottenuti in questa Tesi mostrano che LPA è capace di indurre attività micobattericida nei macrofagi umani; questa attività è mediata dall'enzima PLD che promuove l'uccisione intracellulare del micobatterio favorendo la maturazione del fagolisosoma. L'identificazione della PLD come enzima chiave nel processo molecolare microbicida LPA-dipendente, deriva da diverse evidenze sperimentali quali: i) l'aumento dell'attività enzimatica della PLD in seguito al trattamento con LPA, ii) il recupero della crescita micobatterica intracellulare e del blocco della maturazione fagolisosomiale in presenza di etanolo, inibitore della generazione PLD-dipendente di PA e iii) l'inibizione della crescita micobatterica intracellulare utilizzando PA, prodotto fisiologico e metabolicamente attivo della PLD. In letteratura è noto, che il PA, sintetizzato in seguito all'attivazione della PLD, è un importante mediatore della maturazione fagolisosomiale in diversi modelli sperimentali d'uccisione intracellulare micobatterica, dopo stimolazione delle cellule

con ATP (*Kusner DJ. et al., 2000*), CpG (*Auricchio G. et al., 2003*), e S1P (*Garg SK. et al., 2004*) ed è nota la stretta relazione tra l'attivazione della PLD e il processo di fagocitosi. La biogenesi del fagolisosoma sia un processo caratterizzato da eventi di fusione/fissione ("kiss and run model"), attraverso i quali i fagosomi subiscono solo una transiente e parziale fusione con gli organelli endocitotici, che permette il trasferimento di specifiche molecole di membrana tra il fagosoma e la vescicola endosomiale (*Desjardins M., 1995; Desjardins M. et al., 1994*). Il meccanismo attraverso cui la PLD regola il traffico di membrane endocitiche non è noto, ma potrebbe prevedere sia una diretta azione enzimatica sulle fosfatidilcoline delle membrane vescicolari, modificandone l'architettura, sia un'azione indiretta attraverso PA, come secondo messaggero lipidico, sull'attivazione di proteine di membrana. Queste due possibilità non sono mutuamente esclusive e possono coesistere (*Fallman M. et al., 1992*). Inoltre i nostri risultati mostrano che LPA è in grado di aumentare l'espressione e la maturazione della catepsina D. Tale maturazione sembra essere controllata dall'attività della PLD, poiché la presenza d'etanolo inibisce quasi completamente la formazione della forma matura da 31kDa. Poiché è noto che la PLD regola il traffico intracellulare delle vescicole (*Roth MG. et al., 1997*), i nostri risultati potrebbero essere spiegati dal fatto che la maturazione della catepsina D è dipendente dalla presenza del pH acido lisosomiale (*Richo GR. et al., 1994*) e quindi dalla fusione tra gli endosomi ed i lisosomi. Recentemente abbiamo dimostrato che la quantità di S1P nelle mucose polmonari di pazienti con tubercolosi è significativamente minore rispetto a quella presente in soggetti di controllo affetti da patologie polmonari non correlate alla TB e che la stimolazione con S1P di cellule di lavaggio broncoalveolare, provenienti da pazienti con tubercolosi, riduce la crescita intracellulare di micobatteri endogeni (*Garg SK. et al., 2006*). I dati presenti in questa Tesi indicano che anche la

stimolazione con LPA di cellule di BAL provenienti da pazienti con TB inibisce la crescita intracellulare micobatterica. Tali risultati assumono una forte rilevanza in quanto le cellule provenienti da lavaggi broncoalveolari (neutrofili, macrofagi, linfociti, e cellule epiteliali) sono cronicamente infettate con i micobatteri endogeni e inoltre rappresentano il microambiente cellulare presente nel polmone profondo nel corso della malattia attiva. Su queste basi è quindi possibile ipotizzare un ruolo protettivo dei lisofosfolipidi nel potenziare la risposta immunitaria innata antitubercolare. Alla luce di questi risultati possiamo quindi affermare che in cellule della linea monocito-macrofagica il lisofosfolipide LPA induce l'attivazione dell'enzima PLD che a sua volta promuove la maturazione del fagolisosoma inibendo così la crescita intracellulare di MTB. Questa via di trasduzione del segnale è stata caratterizzata anche in cellule epiteliali alveolari in seguito alla stimolazione con LPA e S1P. In questo contesto abbiamo dimostrato che i lisofosfolipidi LPA e S1P possono proteggere le cellule epiteliali alveolari di tipo II dalla citotossicità indotta da MTB e potenziare la risposta antimicobatterica portando all'uccisione intracellulare del micobatterio. I nostri risultati mostrano che MTB replica rapidamente ed è citotossico per le cellule epiteliali alveolari suggerendone un coinvolgimento nel contesto della risposta immunitaria innata antimicobatterica ed un possibile ruolo nella patogenesi della tubercolosi (*Bermudez LE. et al., 1996*). Inoltre, abbiamo dimostrato che la maturazione fagosomiale indotta dai lisofosfolipidi è mediata dall'attivazione della PLD  $Ca^{++}$ -dipendente, la cui importanza è già stata ampiamente discussa. Come abbiamo precedentemente sottolineato, una delle caratteristiche dei micobatteri patogeni è la loro capacità di arrestare il normale processo di maturazione fagosomiale ed interferire con il traffico endosomiale, sopravvivendo in vacuoli non acidificati (*Flynn JL., 2004; Kaufmann SH., 2001*). I nostri risultati mostrano che

l'acidificazione di compartimenti endosomiali è necessaria per l'uccisione intracellulare di MTB indotta da LPA e S1P. Infatti, il trattamento con agenti lisomiotropici come cloroquina o NH<sub>4</sub>Cl, che incrementano il pH e possono essere considerati inibitori dell'acidificazione lisosomiale, aumenta in maniera significativa la vitalità del micobatterio nelle A549. Il contenimento dei micobatteri all'interno di cellule epiteliali alveolari può giocare un ruolo importante nel prevenire la disseminazione e controllare l'infezione primaria prima del coinvolgimento dei fagociti reclutati al sito d'infezione. La disseminazione dei bacilli tubercolari dal sito dell'infezione primaria costituisce, infatti, un passaggio cruciale nella patogenesi della tubercolosi (*Balasubramanian V. et al., 1994*). Precedentemente avevamo dimostrato che il trattamento con S1P riduce la carica micobatterica polmonare in topi infettati intravena con alte dosi di micobatteri (*Garg SK. et al., 2004*). In questa Tesi, invece, è stato analizzato il ruolo di S1P durante l'infezione aerogena con basse dosi di micobatteri; in questo contesto le cellule epiteliali alveolari possono svolgere un ruolo importante nella disseminazione del patogeno (*Bermudez LE. et al., 1996*). I risultati qui riportati mostrano una diminuzione significativa del numero di cellule infettate per granuloma in seguito al trattamento con S1P durante le prime fasi dell'infezione primaria *in vivo*. I dati ottenuti sono relativi al 14° giorno dopo l'infezione aerogena, quando i micobatteri mostrano un picco nell'espressione della HBHA (*Debbabi H. et al., 2005*). Questa espressione conferisce al batterio la capacità di infettare le cellule epiteliali alveolari, passaggio necessario per la disseminazione micobatterica (*McDonough KA. et al., 1995; Pethe K. et al., 2001*). In questo contesto è noto che il processo della disseminazione può avvenire attraverso tre meccanismi non mutuamente esclusivi (*Russell DG., 2001*): il primo prevede che i macrofagi infettati possano migrare in diverse aree o organi attraverso i vasi sanguigni; il secondo

coinvolge il diretto legame e l'entrata dei batteri negli pneumociti, transcitosi attraverso gli spazi alveolari e il passaggio ai macrofagi reclutati dai vasi sanguigni; il terzo meccanismo prevede il legame diretto e l'entrata negli pneumociti con conseguente lisi, reazione infiammatoria e danno tissutale, facilitando così la diffusione dei batteri nel flusso sanguigno. I nostri risultati sono coerenti con il modello secondo il quale i lisofosfolipidi presenti nel microambiente extracellulare possono proteggere le cellule epiteliali alveolari dall'effetto citopatico indotto da MTB, presumibilmente aumentando la loro capacità micobattericida e quindi prevenendo il rilascio e la disseminazione dei batteri ai macrofagi appena reclutati nel tessuto polmonare. Sulla base dei risultati espressi in questa tesi, è plausibile ipotizzare, che la composizione lipidica del surfattante alveolare possa influenzare la risposta immunitaria antimicrobica innata dei macrofagi e delle cellule epiteliali alveolari. Infine, poiché è noto che tali cellule rappresentano il sito preferenziale di infezione per MTB nelle fasi latenza della malattia (*Hernandez-Pando R. et al., 2000*), le evidenze espresse in questa Tesi secondo le quali, oltre al CpG d'origine microbica, anche ligandi naturali, come LPA e S1P, possano attivare meccanismi microbicidi in cellule epiteliali alveolari in corso di infezione con MTB, sono rilevanti. Questi risultati dunque, nella loro totalità, mostrano come molecole d'origine microbica e ligandi naturali, con in comune una via di trasduzione del segnale, possano produrre segnali protettivi sia per le cellule dell'immunità innata "convenzionali" (monociti-macrofagi), sia per quelle "non convenzionali" (cellule epiteliali alveolari), limitando la replicazione micobatterica e la diffusione durante le prime fasi dell'interazione ospite-patogeno e prima dell'attivazione della risposta immunitaria antigene-specifica dell'ospite.

Sulla base di questo primo gruppo di risultati ed avendo identificato per tutti i nostri ligandi un intermedio enzimatico (PLD) comune responsabile dell'attivazione della risposta antimicobatterica, abbiamo valutato la possibilità di potenziare la risposta immunitaria innata veicolando l'acido fosfatidico, prodotto metabolicamente attivo della PLD, all'interno di liposomi asimmetrici simili a corpi apoptotici. E' noto che in corso d'infezione da *M. tuberculosis* una delle risposte che il macrofago attiva è l'induzione di morte cellulare per apoptosi (Ciaramella A. et al., 2004) che può avvenire nelle prime fasi dell'infezione ed è associata a particolari modificazioni della membrana cellulare, quali la perdita di espressione del CD14 e l'acquisizione sulla superficie esterna delle molecole di fosfatidilserina (Santucci MB. et al., 2000). L'espressione di questi fosfolipidi rappresenta un segnale fondamentale per la fagocitosi dei risultanti corpi apoptotici da parte dei fagociti circostanti (Depraetere V., 2000) ed è in genere associata ad assenza d'infiammazione (Almeida CJ. et al., 2005) e all'attivazione dei meccanismi micobattericidi (Fratazzi C. et al., 1997). Su queste basi, abbiamo ideato un liposoma che, esprimendo PS all'esterno, potesse essere facilmente fagocitato non solo dai macrofagi ma anche da tutti quei tipi cellulari che sono in grado di fagocitare corpi apoptotici, quali i fibroblasti, cellule epiteliali e cellule endoteliali (Almeida CJ. et al., 2005) che sono stati descritti come potenziali cellule bersaglio dell'infezione micobatterica soprattutto nella fase della latenza (Hernandez-Pando R. et al., 2000). Dai dati ottenuti in questa Tesi si evince che la presenza di PS all'esterno permette un migliore riconoscimento per la fagocitosi da parte di macrofagi e ne suggerisce l'utilizzo per veicolare molecole di interesse biologico all'interno della cellula bersaglio in assenza di segnali proinfiammatori (Otsuka M. et al., 2007). La patologia tubercolare è caratterizzata, infatti, da un danno tissutale indotto dalla produzione, da parte delle cellule del



sistema immunitario, di citochine pro-infiammatorie (*Raja A., 2004*). Considerando la natura immunopatologica della malattia, un approccio immunoterapeutico razionale dovrebbe, in linea di principio, potenziare la risposta antimicrobica mantenendo bassa la risposta infiammatoria immunopatologica. I nostri risultati mostrano una riduzione della produzione di citochine pro-infiammatorie e ad un aumento nella produzione di citochine anti-infiammatorie da parte dei macrofagi stimolati con i liposomi PS/PA. In particolare abbiamo osservato una riduzione nella produzione del TNF- $\alpha$ , dell'IL-1 $\beta$ , dell'IL-12 $\alpha$ , dell'IL-18, dell'IL-23 e del TGF- $\beta$  ed un aumento nella produzione dell'IL-27. Di particolare interesse è l'IL-27, poiché la sua produzione è stata associata ad una riduzione del danno tissutale e ad una maggiore sopravvivenza in un modello di tubercolosi murina (*Cooper AM. et al., 2007*). Abbiamo già menzionato i diversi meccanismi che MTB attua per persistere e replicare all'interno della cellula bersaglio, tra i quali l'inibizione della maturazione del fagolisosoma (*Kusner DJ., 2005*) e della mobilizzazione intracellulare del Ca<sup>++</sup> (*Malik ZA. et al., 2001*). I risultati presentati in questa Tesi dimostrano che i liposomi PS/PA sono in grado di incrementare i livelli di Ca<sup>++</sup> citosolico in cellule dTHP-1, suggerendo che il PA veicolato all'interno della cellula tramite le molecole di fosfatidilserina esterne è in grado di attivare questi segnali in maniera analoga al PA prodotto intracellularmente dalla PLD in seguito alla stimolazione con i nostri ligandi e di ripristinare, quindi, un segnale fondamentale per una corretta risposta antimicobatterica. Su queste basi abbiamo inoltre dimostrato che i liposomi PS/PA sono in grado di promuovere, in maniera statisticamente significativa, la maturazione fagolisomale. Inoltre, in presenza di chelanti extracellulari del Ca<sup>++</sup>, quali l'EGTA, tale processo viene inibito, suggerendo la dipendenza dalla presenza di questi ioni nel microambiente extracellulare. Come abbiamo già discusso, la maturazione del fagolisosoma è

associata all'attivazione di meccanismi micobatterici intracellulari, che possono coinvolgere la produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno e dell'azoto e l'attivazione di idrolasi fagosomali pH dipendenti (*Raja A., 2004*). I dati presentati in questa Tesi dimostrano che sia le preparazioni liposomali PS/PC che PC/PA sono in grado di diminuire in maniera significativa la vitalità micobatterica. Questo risultato può essere spiegato dal fatto che anche i liposomi con PC esterno possono veicolare il PA all'interno della cellula sebbene in maniera meno efficiente dei liposomi con PS. Inoltre, è noto che la fagocitosi di corpi apoptotici contenenti PS esterno è in grado di attivare meccanismi micobattericidi nel macrofago (*Fratazzi C. et al., 1997*). Tuttavia, l'effetto micobattericida incrementa in maniera additiva, quando i liposomi sono costituiti da PS esterno e PA interno, dove i segnali per una più efficiente fagocitosi sono combinati con quelli in grado di promuovere la maturazione fagolisosomale. Inoltre il ruolo della maturazione del fagolisosoma, indotta dai liposomi PS/PA, nell'uccisione intracellulare micobatterica, è stato valutato tramite l'uso di due agenti lisosomotropici, come cloroquina e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Questi due agenti lisosomotropici aumentano il pH all'interno degli endosomi contenenti *M. tuberculosis* e possono essere considerati inibitori della maturazione del fagolisosoma (*Crowle AG. et al., 1991*). I dati mostrati in questa Tesi dimostrano come il trattamento dei macrofagi con questi agenti lisosomotropici ripristina, sebbene non completamente, la vitalità micobatterica intracellulare. E' noto già dagli anni 70 che i liposomi (*Angel A., 1970*) possono contenere farmaci utili nel trattamento del cancro, delle infezioni batteriche e fungine (*Goyal P. et al., 2005*). Le preparazioni liposomiali possono essere utili anche nello sviluppo di vaccini (*Gregoriadis G., 1999*) e in tecniche di imaging diagnostico (*Parac-Vogt TN. et al., 2006*). Inoltre, già da tempo i liposomi sono utilizzati nella pratica clinica per la terapia genica (*Karmali PP. et al., 2006*) o nella terapia del

cancro nasofaringeo (*Kajiwara E. et al., 2007*). Al fine di veicolare molecole di interesse all'interno di sistemi complessi, attualmente una branca dell'industria biotecnologica si occupa della realizzazione di modelli liposomici composti da singoli o doppi strati lipidici che circondano una soluzione acquosa contenente il principio attivo. Tuttavia, questi liposomi non sono molto efficienti nel veicolare il farmaco all'interno della cellula bersaglio, poiché vengono generalmente bloccati, prima, dalle cellule del sistema immunitario. In quest'ultima parte della Tesi abbiamo quindi messo a punto un sistema di produzione di liposomi caratterizzati da doppi strati lipidici asimmetrici allo scopo di inserire nello strato interno lipidi che devono essere veicolati nella cellula ospite senza essere rilevati all'esterno (*Pautot S. et al., 2003*). In questo contesto, i liposomi costruiti ed utilizzati nel nostro studio rappresentano una piattaforma tecnologica all'interno della quale è possibile modificare la composizione fosfolipidica interna a seconda del *pathway* molecolare che si intende attivare, consentendo l'inserimento anche di molecole quali CpG, LPA e S1P che, essendo dotati di recettori largamente distribuiti su ogni tipo cellulare, attiveranno una risposta generalizzata ed aspecifica. I nostri liposomi inoltre, grazie alla presenza di fosfatidilserina nello strato esterno, sono in grado di essere efficacemente riconosciuti e fagocitati da parte dei macrofagi come corpi apoptotici, permettendo di intervenire direttamente su quelle cellule che vengono infettate da *M. tuberculosis*, potenziandone in maniera mirata, le capacità micobattericide. Inoltre, tali preparazioni liposomali possono essere somministrate per via aerosolica (*Vyas SP. et al., 2007*) offrendo il vantaggio, rispetto ai comuni farmaci, di ridurre gli effetti collaterali generati da una somministrazione sistemica e di garantire la diretta somministrazione del farmaco nel tessuto polmonare. In conclusione, alla luce dei risultati presentati in questa Tesi, la versatilità del nostro modello liposomale rende possibile veicolare all'interno del

fagocita differenti molecole che possono essere coinvolte non solo nell'attivazione dei segnali antimicrobici ma anche nella risposta infiammatoria e nell'attività di presentazione antigenica, come acido arachidonico e leucotrieni (*Cabral GA., 2005*), suggerendo un ampio spettro di possibilità immunomodulanti.

## 5. RINGRAZIAMENTI

Il più grande ringraziamento che sento di dover fare va alla mia famiglia e a Danilo, che hanno saputo starmi vicino in ogni momento, per quanto sia stato difficile e faticoso. Alla mia mamma, che ha saputo cogliere, anche nei miei silenzi, tutte le mie preoccupazioni e le mie ansie, e ha sempre saputo tranquillizzarmi e incoraggiarmi con un sorriso. Al mio papà, che ha sempre creduto in me e che “sotto i baffi”, senza mai esitazioni, mi ha trasmesso la forza e la tenacia per andare avanti. Alla mia “sorellina”, che s’è sorbita i miei lunghi sfoghi a cena e prendendomi in giro, come solo lei sa fare, ha saputo farmi sorridere...anche di me stessa! Al mio Danilo, che nonostante i miei numerosi “attacchi di panico”, è riuscito a starmi accanto sempre e ad infondermi la serenità di cui avevo bisogno. Ogni attimo è stato con me, pronto a consolarmi, capirmi, spesso mettendo da parte i suoi problemi, facendomi sentire una persona speciale, il centro del suo mondo. A tutti loro va il mio ringraziamento più sentito e sincero, perché mai ce l’avrei fatta senza avere il loro appoggio e il loro amore incondizionato.

Un grazie speciale va al Prof. Maurizio Fraziano, che mi ha iniziato 6 anni fa al mondo della ricerca, riponendo sin da subito fiducia in me e nelle mie possibilità, a lui va la mia stima come persona e come ricercatore. Che dire poi di tutti i miei colleghi del laboratorio di Immunologia e Patologia Molecolare dell’ Università degli Studi di Roma “TorVergata”, presso cui ho sempre lavorato?! La mia “mamma”, la Dr.ssa Marilina B. Santucci, un’amica con cui ho condiviso sin dall’inizio ogni momento, ogni dubbio, ogni preoccupazione, ogni attimo d’allegria, ogni confidenza; è sempre stata il mio punto di riferimento dalla disponibilità incondizionata, da cui non ho mai voluto “tagliare il cordone ombelicale”! Il Dr. Luciano Giacò, da sempre compagno di ventura, caffè al Ginseng e chiacchierate, sempre pronto a dare consigli sinceri e

spassionati! L' On. e Dr. Gianluca Quintiliani...voilà..., il mio dirimpettaio di scrivania, l'amico capace di strapparti sempre un sorriso con la sua contagiosa allegria ma anche il collega sempre pronto a darti una mano quando ne hai bisogno, insomma un "saponcino" su cui si può contare...e non è poco! Grazie a Francesco, alle sue torte e ai suoi manicaretti che spesso ci hanno allietato il pranzo! Un ringraziamento va inoltre a tutti coloro che si sono avvicinati nel nostro laboratorio, alle "Doriane", ai colleghi dello Stabulario e del CNR, ai fisici del Gemelli, e a tutte le persone con cui ho avuto il piacere di lavorare. Infine un grazie di cuore va ai miei amici di sempre, vicini e lontani, all'insostituibile Alessia e all'amica di sempre Silvia...le spalle su cui ho riso e pianto, le compagne di una vita, che mi hanno sempre dimostrato di esserci e in ogni occasione ho avuto il loro impagabile sostegno! E poi un grazie anche a me...no?! Hai visto Emanuela...non ci credevi e invece ce l'hai fatta...in fondo non devi essere così male! Coraggio...sempre...perché ricorda: prima o poi gira per tutti!!!

## 6. BIBLIOGRAFIA

**Aderam A., Ulevitch RJ.** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*; 406:782-787. 2000.

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

**Aliprantis AO., Yang RB., Mark MR., Suggett S., Devaux B., Radolf JD., Klimpel GR., Godowski P., Zychlinsky A.** Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science*; 285: 736-739. 1999.

**Almeida CJ., Linden R.** Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance. *Rev. Cell Mol. Life Sci.*; 62: 1532-1546. 2005.

**Angel A.** Studies on the compartmentation of lipid in adipose cells. I. Subcellular distribution, composition, and transport of newly synthesized lipid: liposomes. *J. Lipid. Res.*; 11: 420-432. 1970.

**Armstrong JA., Hart PD.** Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J. Exp. Med.*; 142: 1-16. 1975.

**Asano K., Chee CBE., Gaston B., Lilly CM., Gerard C., Stemler JS.** Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *PNAS USA*; 91: 10089-10093. 1994.

**Auricchio G., Garg SK., Martino A., Volpe E., Ciaramella A., De Vito P., Baldini PM., Colizzi V., Fraziano M.** Role of macrophage phospholipase D in natural or CpG-induced antimycobacterial activity. *Cell. Microbiol.*; 5: 9136-920. 2003.

**Balasubramanian V., Wiegshaus EH., Taylor BT., Smith DW.** Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization. *Tuber. Lung Dis.*; 75: 168-178. 1994.

**Bals R., Hiemstra, PS.** Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur. Resp. J.*; 23: 327-333. 2004.

**Bandoh K., Aoki J., Hosono H., Kobayashi S., Kobayashi T., Murakami-Murofushi K., Tsujimoto M., Arai H., Inoue K.** Molecular cloning and characterization of a novel human G protein-coupled receptor, Edg 7, for lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*; 274: 27776-27785. 1999.

**Banno Y., Takuwa Y., Akao Y., Okamoto H., Osawa Y., Naganawa T., Nakashima S., Suh PG., Nozawa Y.** Involvement of phospholipase D in sphingosine 1-phosphate-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt in Chinese hamster ovary cells overexpressing EDG3. *J. Bio.l Chem.*; 276: 35622-35628. 2001.

**Bauer S., Kirschning CJ., Hacker H., Redecke V., Hausmann S., Akira S., Wagner H., Lipford GB.** Human TLR-9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motifs recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 98: 9237- 9242. 2001.

**Bermudez LE., Goodman J.** Mycobacterium tuberculosis invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect. Immun.*; 4: 1400-1406. 1996.

**Birchler T., Seibl R., Büchner K., Loeliger S., Seger R., Hossle JP., Aguzzi A., Lauener RP.** Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur. J. Immunol.*; 31: 3131-3137. 2001.

**Bird A.** CpG island as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet.*; 3: 342. 1987.

**Bloom B.** Immune mechanism of protection. *Tuberculosis*; 24: 395-396. 1991.

**Boguslawski G., Grogg JR., Welch Z., Ciechanowicz S., Sliva D., Kovala AT., McGlynn P., Brindley DN., Rhoades RA., English D.** Migration of vascular smooth muscle cells induced by sphingosine 1-phosphate and related lipids: potential role in the angiogenic response. *Exp. Cell Res.*; 274: 264-274. 2002.

**Braff MH., Bardan A., Nizet V., Gallo RL.** Cutaneous defense mechanism by antimicrobial peptides. *J. Invest. Dermatol.*; 125: 9-13. 2005.

**Branda RF., Moore AL., Lafayette AR., Mathews L., Hong R., Zon G., Brown T., McCormack JJ.** Amplification of antibody production by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J. Lab. Clin. Med.*; 128: 329-338. 1996.

**Brennan PJ., Draper P.** Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Tuberculosis: Pathogenesis, protection, and control*. B.R.Bloom, ed., ASM, Washington, D.C.; 271-284. 1994.

**Brennan PJ.** Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*; 83: 92-97. 2003.

**Brightbill HB., Libraty DH., Krutzik SR., Yang RB., Belisle JT., Bleharski JR., Maitland M., Norgard MV., Plevy SE., Smale ST., Brennan PJ., Bloom BR., Godowski PJ., Modlin RL.** Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*; 285: 732-736. 1999.

**Briken V., Porcelli SA., Besra GS., Kremer L.** Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol. Microbiol.*; 53: 391-403. 2004.

**Brinkmann V., Davis MD., Heise CE., Albert R., Cottens S., Hof R., Bruns C., Prieschl E., Baumruker T., Hiestand P., Foster CA., Zollinger M., Lynch KR.** The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.*; 277: 21453-21457. 2002.



**Cabral GA.** Lipids as bioeffectors in the immune system. *Rev. Life Sci.*; 77: 1699-1710. 2005.

**Canaday DH., Ziebold C., Noss EH., Chervenak KA., Harding CV., Boom WH.** Activation of human CD8<sup>+</sup> alpha beta TCR<sup>+</sup> cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. *J. Immunol.*; 162: 372-3799. 1999.

**Chan J., Fan XD., Hunter SW., Brennan PJ., Bloom BR.** Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.*; 59: 1755-1761. 1991.

**Chan J., Flynn JL.** Nitric oxide in *Mycobacterium tuberculosis* infection. In *Nitric Oxide and Infection*, ed F. Fang : 281-310. 1999.

**Chatterjee D., Lowell K., Rivoire B., Mcneil MR., Brennan PJ.** Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biological. chemistry.*; 267: 6234-6239. 1992.

**Chun J., Welner JA., Fukushima N., Contos JJ., Zhang G., Kimura Y., Dubin A., Ishii I., Hecht JH., Akira C., Kaushal D.** Neurobiology of receptor-mediated lysophospholipid signaling-from the first lysophospholipid receptor to roles in nervous system function and development. *Ann. NYAcad Sci.*; 905:110-107. 2000.

**Ciaramella A., Cavone A., Santucci MB., Bocchino M., Galati D., Martino A., Auricchio A., Stewart GR., Neyrolles O., Young DB., Coalizzi V., Fraziano M.** Cell wall associated 19-kDa lipoprotein induces apoptosis and IL-1 $\beta$  release in the course of mycobacterial infection. *J. Infect. Dis.*; 190: 1167-76. 2004.

**Ciaramella A., Martino A., Cicconi R., Colizzi V., Fraziano M.** Mycobacterial 19 kDa lipoprotein mediates *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis in monocyte-macrophage at early stages of infection. *Cell Death Differ.*; 7: 1270-1272. 2000.

**Clemens DL., Horwitz MA.** Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J. Exp. Med.*; 181: 257-270. 1995.

**Cohen-Gonsaud M., Barthe P., Bagneris C., Henderson B., Ward J., Roumestand C., Keep NH.** The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes. *Nature Struct. Mol. Biol.*; 12: 270-273. 2005.

**Cohen-Gonsaud M., Barthe P., Pommier F., Harris R., Driscoll PC., Keep NH., Roumestand C.** (1)H, (15)N, e (13)C chemical shift assignments of the resuscitation promoting factor domain of Rv1009 from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biomol. NMR.*; 30: 373-374. 2004.

**Cole ST., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon SV., Eiglmeier K., Gas S., Barry CE. 3rd, Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Barrell BG.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*; 393: 537-544. 1998.

**Cooper AM., Solache A., Khader SA.** Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Curr. Opin. Immunol.*; 19: 441-447. 2007.

**Corrotte M., Chasserot-Golaz S., Huang P., Du G., Ktistakis NT., Frohman MA., Vitale N., Bader MF., Grant NJ.** Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis. *Traffic*; 7: 365-377. 2006.

**Cosma CL., Sherman DR., Ramakrishnan L.** The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*; 57: 641-676. 2003.

**Crowle AJ., Dahl R., Ross E., May MH.** Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infect. Immun.*; 59: 1823-1831. 1991.

**Crubezy E., Ludes B., Poveda JD., Clayton J., Crouau J., Crouau-Roy B., Montagnon D.** Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5,400 years old. *Acad. Sci. III Nov.*; 321: 941-951. 1998.

**Cuvillier O., Pirianov G., Kleuser B., Vanek PG., Coso OA., Gutkind S., Spiegel S.** Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*; 381: 800-803. 1996.

**Da Silva RP., Hall BF., Joiner KA., Sacks DL.** CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes in human macrophage. *J. Immunol.*; 143: 617-622. 1989.

**Daeron M.** Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.*; 15: 203-234. 1997.

**Dahl KE., Shiratsuchi H., Hamilton BD., Ellner JJ., Toossi Z.** Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*; 64: 399-405. 1996.

**Danelishvili L., McGarvey J., Li YJ., Bermudez LE.** *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell. Microbiol.*; 5: 649-660. 2003.

**Debbabi H., Ghosh S., Kamath AB., Alt J., deMello DE., Dunsmore S., Behar SB.** Primary type II alveolar epithelial cells present microbial antigens to antigen specific CD4+ T cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*; 289: 274-279. 2005.

- Denlinger LC., Fisette PL., Garis KA., Kwon G., Vazquez-Torres A., Simon AD., Nguyen B., Proctor RA., Bertics PJ., Corbett JA.** Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *J. Biol. Chem.*; 271: 337-342. 1996.
- Depraetere V.** "Eat me" signals of apoptotic bodies. *Nat. Cell. Biol.*; 2:104. 2000.
- Deretic V., Fratti RA.** *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol. Microbiol.*; 31: 1603-1609. 1999.
- Desai NN., Zhang H., Olivera A., Mattie ME., Spiegel S.** Sphingosine-1-phosphate, a metabolite of sphingosine, increase phosphatidic acid levels by phospholipase D activation. *J. Biol. Chem.*; 267: 23122-23128. 1992.
- Desjardins M., Huber LA., Parton RG., Griffiths G.** Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. S. Biol.*; 124: 677-688. 1994.
- Desjardins M.** Biogenesis of phagolysosomes: the "kiss and run" hypothesis. *Trends Cell Biol.*; 5: 183-186. 1995.
- Diamond G., Legarda D., Ryan LK.** The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol. Rev.*; 173: 27-38. 2000.
- Diel R., Nienhaus A., Lange C., Meywald-Walter K., Forßbohm M., Schalberg T.** Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir. Res.*; 7:77-86. 2006.
- DiVirgilio F., Meyer BC., Greenberg S., Silverstein SC.** Fc receptor mediated phagocytosis occurs in macrophages at exceedingly low cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels. *J. Cell Biol.*; 106: 657-666. 1988.
- Doetsch RN.** Benjamin Marten and his "New Theory of Consumptions". *Microbiol. Rev.*; 42: 521-528. 1978.
- Ducati RD., Ruffino-Netto A., Basso LA., Santos DS.** The resumption of consumption. A review on tuberculosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 101: 697-714. 2006.
- English D.** Phosphatidic acid: a lipid messenger involved in intracellular and extracellular signalling. *Rev. Cell Signal.*; 8: 341-347. 1996.
- Exton JH.** Regulation of Phospholipase D. *Bioch. bioph.l acta rev.*; 1439: 121-133. 1999.

- Fallman M., Gullberg M., Hellberg C., Andersson T.** Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase. *J. Biol. Chem.*; 267: 2656-63. 1992.
- Fenhalls G., Wong A., Bezuidenhout J., Van Helden P., Bardin P., Lukey PT.** In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Infect. Immun.*; 68: 2827-2836. 2000.
- Ferrari G., Langen H., Naito M., Pieters J.** A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*; 97: 435-447. 1999.
- Flynn JL.** Mutual attraction: does it benefit the host or the bug? *Nat. Immunol.*; 5: 778-779. 2004.
- Fourcade O., Simon MF., Viodè C., Rugani N., Leballe F., Ragab., Fouriè B., Sarda L., Chap H.** Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane vesicles shed from activated cells. *Cell*; 80: 919-927. 1995.
- Fratazzi C., Arbeit RD., Carini C., Remold HG.** Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J. Immunol.*; 158: 4320-4327. 1997.
- Fratti RA., Chua J., Vergne I., Deretic V.** *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 9: 5437-5442. 2003.
- Gaits F., Fourcade O., Le Balle F., Gueguen G., Gaigè B., Gassama-Diagne A., Fauvel J., Salles JP., Mauco G., Simon MF., Chap H.** Lysophosphatidic acid as phospholipid mediator : pathways of synthesis. *FEBS Lett.*; 410: 54-58. 1997.
- Garcia-Perez BE., Mondragon-Flores R., Luna-Herrera J.** Internalization of *Mycobacterium tuberculosis* by macropinocytosis in non-phagocytic cells. *Microb. Pathog.*; 35: 49-55. 2003.
- Garg SK., Santucci MB., Panitti M., Pucillo L., Bocchino M., Okajima F., Bisene PS., Saltic C., Fraziano M.** Does sphingosine 1-phosphate play a protective role in the course of pulmonary tuberculosis? *Clin. Imm.*; 121: 260-264. 2006.
- Garg SK., Volpe E., Palmieri G., Mattei M., Galati D., Martino A., Piccioni M., Valente E., Bonanno E., De Vito P., Baldini PM., Spagnoli L., Colizzi V., Fraziano M.** Sphingosine 1-phosphate induces antimicrobial activity both in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis.*; 189: 2129-2138. 2004.

**Garg, SK., Santucci MB., Seghrouchni F., Saltini C., Bisen PS., Colizzi V., Fraziano M.** Tuberculosis therapeutics: Past achievements, present road blocks and future perspectives. *Lett. Drug Des. Discov.*; 1: 314-328. 2004.

**Garin J., Diez R., Kieffer S., Dermine JF., Duclos S., Gagnon E., Sadoul R., Rondeau C., Desjardins M.** The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.*; 152: 165–180. 2001.

**Gatfield J., Pieters J.** Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*; 288: 1647-1650. 2000.

**Goetzl EJ.** Pleiotypic mechanisms of cellular response to biologically active lysophospholipids. *Prost. Other Lipid Mediat.*; 64: 11-20. 2001.

**Golan DE., Tashjian AH.** Principi di farmacologia. Le basi fisiopatologiche della terapia. 2006.

**Goyal P., Goyal K., Vijaya Kumar SG., Singh A., Katare OP., Mishra DN.** Liposomal drug delivery systems--clinical applications. *Acta. Pharm. Rev.*; 55:1-25. 2005.

**Gregoriadis G.** DNA vaccines: a role for liposomes. *Rev. Curr. Opin. Mol. Ther.*; 1: 39-42. 1999.

**Grogan A., Reeves E., Keep N., Wientjes F., Totty NF., Burlingame AL., Hsuan JJ., Segal AW.** Cytosolic phox proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils. *J. Cell Sci.*; 110: 3071-81. 1997.

**Henderson RA., Watkins SC., Flynn JL.** Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*; 159: 635-643. 1997.

**Hernandez-Pando R., Jeyanathan M., Mengistu G., Aguilar D., Orozco H., Harboe M., Rook GA., Bjune G.** Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet.*; 356: 2133-2138. 2000.

**Hirsch CS., Ellner JJ., Russel DJ., Rich EA.** Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor alpha mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J. Immunol.*; 152: 743-753. 1994.

**Hla T., Lee MJ., Ancellin N., Paik JH., Kluk MJ.** Lysophospholipids--Receptor Revelations. *Science*; 294: 1875-1878. 2001.

**Hla T., Lee MJ., Ancellin N., Paik JH., Kluk MJ.** Sphingosine-1-phosphate: extracellular mediator or intracellular second messenger? *Biochem. Pharmacol.*; 58: 201-217. 1999.

- Hmama Z., Gabathuler R., Jefferies WA., de Jong G., Reiner NE.** Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. *J. Immunol.*; 161: 4882-4893. 1998.
- Hobson JP., Rosenfeldt HM., Barak LS., Olivera A., Poulton S., Caron MG., Milstien S., Spiegel S.** Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science*; 291: 1800-1803. 2001.
- Hopper DW., Ragan SP., Hooks SB., Lynch KR., Macdonald TL.** Structure-activity relationship of lysophosphatidic acid: conformationally restricted backbone mimetics. *J. Med. Chem.*; 42: 963-970. 1999.
- Horner AA., Widhopf GF., Burger JA., Takabayashi K., Cinman N., Ronaghy A., Spiegelberg HL., Raz E.** Immunostimulatory DNA inhibits IL-4-dependent IgE synthesis by human B cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 108: 417-423. 2001.
- Hornuss C., Hammermann R., Fuhrmann M., Juergens UR., Racké K.** Human and rat alveolar macrophages express multiple EDG receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 429: 303-308. 2001.
- Houde M., Bertholet S., Gagnon E., Brunet S., Goyette G., Laplante A., Princiotta MF., Thibault P., Sacks D., Desjardins M.** Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*; 425: 402-406. 2003.
- Huang P, Frohman MA.** The potential for phospholipase D as a new therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets.*; 11: 707-716. 2007.
- Idzko M., Panther E., Crinti S., Morelli A., Ferrari D., Herouy Y., Dichmann S., Mockenhaupt M., Gebicke-Haerter P., Di Virgilio F., Girolomoni G., Nargauer J.** Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses. *FASEB J.*; 16: 625-627. 2002.
- Igarashi Y.** Functional roles of sphingosine, sphingosine 1-phosphate, and methylsphingosines: in regard to membrane sphingolipid signaling pathways. *J. Biochem.*; 122: 1080-1087. 1997.
- Ishii KJ., Takeshita F., Gursel I., Gursel M., Conover J., Nussenzweig A., Klinman DM.** Potential role of phosphatidylinositol 3 kinase, rather than DNA-dependent protein kinase, in CpG DNA-induced immune activation. *J. Exp. Med.*; 196: 269-274. 2002.
- Iwasaki A., Medzhitov R.** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*; 5: 987-995. 2004.
- Jaconi ME., Lew DP., Carpentier JL., Magnusson KE., Sjogren M. Stendahl O.** Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J. Cell Biol.*; 110: 1555-1564. 1990.

**Jang BC., Lim KJ., Known YK., Shin SW., Kim SC., Jung TY., Kwon TK., Cho JW, Baek WK., Kim SP., Suh MH., Suh SI.** Up-regulation of human  $\beta$ -defensin 2 by interleukin-1 $\beta$  in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK and NF-kB. *BBRC*; 320: 1026-1033. 2004.

**Jolly PS., Rosenfeldt HM., Milstien S., Spiegel S.** The roles of sphingosine-1-phosphate in asthma. *Mol Immunol.*; 38: 1239-1945. 2002.

**Juffermans NP., Leemans JC., Florquin S., Verbon A., Kolk AH., Speelman P., van Deventer SJ., van der Poll T.** CpG oligodeoxynucleotides enhance host defense during murine tuberculosis. *Infect. Immun.*; 70: 147-152. 2002.

**Jung HC., Eckmann L., Yang SK., Panja A., Fierer J., Morzycka-Wroblewska E., Kagnoff MF.** A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.*; 95: 55-65. 1995.

**Kajiwara E., Kawano K., Hattori Y., Fukushima M., Hayashi K., Maitani Y.** Long-circulating liposome-encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy. *J. Control Release*; 120: 104-110. 2007.

**Karmali PP., Chaudhuri A.** Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: Resolved issues, open questions, and future promises. *Med. Res. Rev.*; 10: 1-27. 2006.

**Kaufmann SH.** *Fundamental Immunology 4<sup>th</sup> edn.* 1335-1371. 1999.

**Kaufmann SH.** How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat. Rev. Immunol.*; 1:20-30. 2001.

**Kimura T., Sato K., Kuwabara A., Tomura H., Ishiwara M., Kobayashi I., Ui M., Okajima F.** Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chemistry.*; 276: 31780-3785. 2001.

**Kline JN., Waldschmidt TJ., Businga TR., Lemish JE., Weinstock JV., Thorne PS., Krieg AM.** Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J. Immunol.*;160: 2555-2559. 1998.

**Klinman DM., Barnhart KM., Conover J.** CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine*; 17: 19-25.1998.

**Knutson KL., Hmama Z., Herrera-Velit P., Rochford R., Reiner NE.** Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1. *J. Biol. Chem.*; 273: 645-652. 1998.

- Korchak HM., Vosshall LB., Zagon G., Ljubich P., Rich AM., Weissmann G..** Activation of the neutrophil by calcium-mobilizing ligands. I. A chemotactic peptide and the lectin concanavalin A stimulate superoxide anion generation but elicit different calcium movements and phosphoinositide remodelling. *J. Biol. Chem.*; 263: 11090–11097. 1988.
- Kumar R., Dwivedi A., Kumar P., Kohli N..** Tuberculous meningitis in BCG vaccinated and unvaccinated children. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*; 76: 1550-1554. 2005.
- Kusner DJ., Adams J..** ATP-induced Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase D. *J. Immunol.*; 164: 379-388. 2000.
- Kusner DJ., Barton JA..** ATP stimulates human macrophages to kill intracellular virulent *Mycobacterium tuberculosis* via calcium-dependent phagosome-lysosome fusion. *J. Immunol.*; 167: 3308-3315. 2001.
- Kusner DJ..** Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. *Clin. Immunol.*; 114: 239-247. 2005.
- Ladel CH., Szalay G., Riedel D., Kaufmann SH..** Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Infect. Immun.*; 65:1936-1938. 1997.
- Le Balle F., Simon MF., Meijer S., Fourcade O., Chap H..** Membrane sidedness of biosynthetic pathways involved in the production of lysophosphatidic acid. *Adv. Enzyme Regul.*; 39: 275-284. 1999.
- Le Cabec V., Cols C., Maridonneau-Parini I..** Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect. Immun.*; 68: 4736. 2000.
- Lee H., Liao JJ., Graeler M., Huang MC., Goetzl EJ..** Lysophospholipid regulation of mononuclear phagocytes. *Rev. Biochim. Biophys. Acta.*; 1582: 175-177. 2002.
- Lennon-Dumenil AM., Bakker AH., Maehr R., Fiebiger E., Overkleeft HS., Roseblatt M., Ploegh HL., Lagaudriere-Gesbert C..** Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J. Exp. Med.*; 196: 529–540. 2002.
- Lin Y., Zhang M., Barnes PF..** Chemokine production by human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*; 66: 1121-26. 1998.
- Liscovitch M., Czarny M., Fiucci G., Tang X..** Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Rev. Biochem. J.*; 345: 401-415. 2000.



**Locati M., Riboldi E., Bonocchi R., Transidico P., Bernasconi S., Haribabu B., Morris A., Mantovani A., Sozzoni S.** Selective induction of phospholipase D1 in pathogen-activated human monocytes. *Biochem. J.*; 358: 119-125. 2001.

**Luttrell LM., Hawes BE., van Biesen T., Luttrell DK., Lansing TJ., Lefkowitz RJ.** Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor-and G $\beta\gamma$  subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*; 271: 19443-19450. 1996.

**Lynch KR., Im DS.** Life on the edge. *Trends Pharmacol. Sci.*; 20: 473-475. 1999.

**Maeda N., Nigou J., Herrmann JL., Jackson M., Amara A., Lagrange PH., Puzo G., Gicquel B., Neyrolles O.** The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.*; 278: 5513-5516. 2003.

**Malek RL., Toman RE., Edsall L., Wong S., Chiu J., Letterle CA., Van Brocklyn JR., Milstien S., Spiegel S., Lee NH.** Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 276: 5692-5699. 2001.

**Malik ZA., Denning GM., Kusner DJ.** Inhibition of Ca<sup>++</sup> signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with decreased phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J. Exp. Med.*; 191: 287-303. 2000.

**Malik ZA., Iyer SS., Kusner DJ.** *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. *J. Immunol.*; 166: 3392-3401. 2001.

**Malik ZA., Thompson CR., Hashimi S., Porter B., Iyer SS., Kusner DJ.** *Mycobacterium tuberculosis* blocks Ca<sup>2+</sup>-signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. *J. Immunol.*; 170: 2811-2815. 2003.

**Manca C., Reed MB., Freeman S., Mathema B., Kreiswirth B., Barry CE.III, Kaplan G.** Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Infect. Immun.*; 72: 5511-5514. 2004.

**Mandala S., Hajdu R., Bergstrom J., Quackenbush E., Xie J., Milligan J., Thornton R., Shei GJ., Card D., Keohane C., Rosenbach M., Hale J., Lynch CL., Rupprecht K., Parsons W., Rosen H.** Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science*; 269: 346-349. 2002.

**Mandala SM., Thornton R., Galve-Roperh I., Poulton S., Peterson C., Olivera A., Bergstrom J., Kurtz MB., Spiegel S.** Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *PNAS USA*; 97: 7859-7864. 2000.

**Mariano M.** The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*; 37: 161-176. 1995.

**McCluskie MJ., Davis HL.** Oral, intrarectal and intranasal immunizations using CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Vaccine*; 19: 413-422. 2000.

**McCluskie MJ., Davis HL.** CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J. Immunol.*; 161: 4463-4466. 1998.

**McDonough KA., Kress Y.** Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*; 63: 4802-4811. 1995.

**Medzhitov R., Janeway CA. Jr.** Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*; 9: 4-9. 1997.

**Menzio FD., Reddy VM., Cayet D., Raze D., Debrie AS., Dehouck MP.** *Mycobacterium tuberculosis* heparin binding haemagglutinin adhesion (HBHA) triggers receptor mediated transcytosis without altering the integrity of tight junction. *Microbes Infect.*; 8: 1-9. 2005.

**Menzio FD., Rouse JH., Alavi M., Laude-Sharp M., Muller J., Bischoff R., Brennan MJ., Locht C.** Identification of a heparinbinding hemagglutinin present in mycobacteria. *J. Exp. Med.*; 184: 993-1001. 1996.

**Miyakawa Y., Ratnakar P., Gururuaj Rao A., Costello ML., Mathieu-Costello O., Lehrer RI., Catanzaro A.** In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*; 64: 926-932. 1996.

**Moldoveanu Z., Love Homan L., Huang WQ., Krieg AM.** CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine*; 16: 1216-1224. 1998.

**Moolenaar WH.** Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Rev. Exp. Cell Res.*; 253: 230-238. 1999.

**Motoashi K., Shibata S., Ozaki Y., Yatomi Y., Igarashi Y.** Identification of lysophospholipids receptors in human platelets: the relation of two agonists, lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *FEBS Lett.*; 468: 189-193. 2000.

**Muller WA., Steinman RM, Cohn ZA.** Membrane proteins of the vacuolar system III. Further studies on the composition and recycling of endocytic vacuole membrane in cultured macrophages. *J. Cell Bio.*; 96: 29-36. 1983.

**Muno D., Kominami E., Mizuochi T.** Generation of both MHC class I- and class II-restricted antigenic peptides from exogenously added ovalbumin in murine phagosomes. *FEBS Lett.*; 478: 178-182. 2000.

**Murata N., Sato K., Kon J., Tomura H., Okajima F.** Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate by radioreceptor-binding assay. *Anal. Biochem.*; 282:115-120. 2002.

**Murata N., Sato K., Kon J., Tomura H., Yanagita M., Kwabara A., Ui M., Okajima F.** Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem. J.*; 3: 809-815. 2000.

**Olivera A., Spiegel S.** Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*; 365: 557-560. 1993.

**Orme I.** Adaptive immunity to Mycobacteria. *Microbiology*; 7: 58-61. 2004.

**Otsuka M., Negishi Y., Aramaki Y.** Involvement of phosphatidylinositol-3-kinase and ERK pathways in the production of TGF- $\beta$ 1 by macrophages treated with liposomes composed of phosphatidylserine. *FEBS letters*; 581: 325-330. 2007.

**Pagès C., Simon MF., Valet P., Saulnier-Blanche JS.** Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prost. Other Lipid Mediat.*; 64: 1-10. 2001.

**Pai M., Mohan A., Dheda K., Leung CC., Yew WW., Christopher DJ., Sharma SK.** Lethal interaction: the colliding epidemics of tobacco and tuberculosis. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.*; 5: 385-391. 2007.

**Parac-Vogt TN., Kimpe K. Laurent S., Pierart C., Elst LV., Muller RN., Binnemans K.** Paramagnetic liposomes containing amphiphilic bisamide derivatives of Gd-DTPA with aromatic side chain groups as possible contrast agents for magnetic resonance imaging. *Eur. Biophys. J.*; 35: 136-44. 2006.

**Pautot S., Frisken BJ., Weitz DA.** Engineering asymmetric vesicles. *PNAS USA*; 100: 10718-10721. 2003.

**Payne SG., Milstien S., Spiegel S.** Sphingosine 1-phosphate: dual messenger function. *FEBS Let.t.*; 531: 54-57. 2002.

**Perisic O., Wilson MI., Karathanassis D., Bravo J., Pacold ME., Ellson CD., Hawkins PT., Stephens L., Williams RL.** The role of phosphoinositides and phosphorylation in regulation of NADPH oxidase. *Adv. Enzyme Regul.*; 44: 279-298. 2004.

**Peterson PK., Gekker G., Hu S., Sheng WS., Anderson WR., Ulevitch RJ., Tobias PS., Gustafson KV., Molitor TW., Chao C.** CD-14 receptors-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia. *Infect. Immun.*; 63: 1598-1602. 1995.

**Pethe K., Alonso S., Biet F., Delogu G., Brennan MJ., Loch C., Menozzi FD.** The heparin 19 binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for mycobacterial dissemination. *Nature*; 412: 190-194. 2001.

**Porcelli SA, Modlin RL.** The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipid and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.*; 17: 297-329. 1999.

**Pyne S., Pyne NJ.** Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem. J.*; 349: 385-402. 2000.

**Raja A.** Immunology of tuberculosis. *Rev. Indian J. Med. Res.*; 120: 213-232. 2004.

**Rich EA., Torres M., Sada F., Finegan CK., Hamilton BD., Toossi Z.** *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. *Tuber. Lung Dis.*; 78: 247-255. 1997.

**Richo GR., Comer GE.** Structural requirements of procathepsin D activation and maturation. *J. Biol. Chem.*; 269: 14806-14812. 1994.

**Rivas-Santiago B., Schwander SK., Sarabia C., Diamond G., Klein-Patel ME., Hernandez-Pando R., Ellner JJ., Sada E.** Human  $\beta$ -defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.*; 73: 4505-4511. 2005.

**Roach TI., Barton CH., Chatterjee D., Blackwell JM.** Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE and TNF- $\alpha$ . *J. Immunol.*; 150: 1886-1896. 1993.

**Robbins RA., Barnes PJ., Springall DR.** Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *BBRC*; 203: 209-218. 1994.

**Roland R., Yoshio K., Ikuya Y.** Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid containing glycolipids. *A. Review Microbiol. Immunol.*; 45 (12): 801-811. 2001.

**Roth MG., Sternweis PC.** The role of lipid signaling in constitutive membrane traffic. *Curr. Opin. Cell. Biol.*; 9: 519-526. 1997.

**Roy S., Sharma S., Sharma M., Aggarwal R., Bose M.** Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: an in vitro correlate of innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*; 112: 471-480. 2004.

**Russell DG.** *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; 2: 569-586. 2001.

**Salo WL., Aufderheide AC., Buikstra J., Holcomb TA.** Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 91: 2091-2094. 1994.

**Sano T., Baker D., Viràg T., Wada A., Yatomi Y., Kobayashi T., Igarashi Y., Tigyi G.** Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J.Biol. Chem.*; 277: 21197-21206. 2002.

**Santucci MB., Amicosante M., Cicconi R., Montesano C., Casarini M., Giosuè S., Bisetti A., Colizzi V., Fraziano M.** Mycobacterial tuberculosis induce apoptosis in monocyte-macrophage: early membrane modifications and intracellular mycobacterial viability. *J. Infect. Dis.*; 181: 1506-1509. 2000.

**Santucci MB., Bocchino M., Garg SK., Marruchella A., Colizzi V., Saltini C., Fraziano M.** Expansion of CCR5+ CD4+ T-lymphocytes in the course of active pulmonary tuberculosis. *Eur. Respir. J.*; 24: 638-643. 2004.

**Saunders BM., Frank AA., Orme IM., Cooper AM.** Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect. Immun.*; 68: 3322-3326. 2000.

**Schaible UE., Collins HL., Kaufmann SH.** Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. *Adv. Immunol.*; 71: 267-377. 1999.

**Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark SC., Dinarello CA.** Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*; 75: 40-4. 1990.

**Schlesinger LS.** Macrophages phagocytosis of virulent but not attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J. Immunol*; 150: 2920-2930.1993.

**Schorey JS., Cooper AM.** Macrophage signalling upon mycobacterial infection: the MAP kinases lead the way. *Cell Microbiol.*; 5: 133-142. 2003.

**Shafer RW., Edlin BR.** Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: perspective on the past decade. *Clin. Infect. Dis.*; 4: 683-704. 1996.

**Shen Z., Belinson J., Morton RE., Xu Y.** Phorbol 12-myristate 13-acetate lysophosphatidic acid secretion from ovarian and cervical cancer cells but not from breast or leukemia cells. *Gynecol. Oncol.*; 71: 364-368. 1998.

**Shiloh M., Nathan CF.** Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of Salmonella and mycobacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*; 3: 35-42. 2000.

**Shirota H., Sano K., Hirasawa N., Terui T., Ohuchi K., Hattori T., Shirato K., Tamura G.** Novel roles of CpG oligodeoxynucleotides as a leader for the sampling and presentation of CpG-tagged antigen by dendritic cells. *J. Immunol.*; 167: 66-74. 2001.

**Siegel RE.** Clinical observation in Hippocrates: an essay on the evolution of the diagnostic art. *J. Mt. Sinai Hosp. N.Y.*; 31: 285-303. 1964.

**Smith I.** Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular determinants of Virulence. *Clin. Microbiol. Rev.*; 16: 463-496. 2003.

**Spargo BJ., Crowe LM., Ioneda T., Beaman BL., Crowe JH.** Cord Factor inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 88: 737-740. 1991.

**Spiegel S., Merrill AH.** Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.*; 10: 1388-1397. 1996.

**Spiegel S., Milstien S.** Sphingosine-1-phosphate, a key cell signalling molecule. *J. Biol. Chem.*; 277: 25851-25854. 2002.

**Spiegel S., Milstien S.** Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett.*; 47: 55-57. 2000.

**Stenger S., Mazzaccaro RJ., Uyemura K., Cho S., Barnes PF., Rosat JP., Sette A., Brenner MB., Porcelli SA., Bloom BR., Modlin RL.** Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science*; 276: 1684-1687. 1997.

**Stewart GR., Robertson BD., Young DB.** Tuberculosis: a problem with persistence. *Nature Rev. Microbiol.*; 1: 97-105. 2003.

**Strohmeier GR., Fenton MJ.** Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes Infect*; 1: 709-711. 1999.

**Stuckey JA., Dixon JE.** Crystal of phospholipase D family member. *Natstruct. Biol.*; 6: 278-284. 1999.

**Sturgill-Koszycki S., Schlesinger PH., Chakraborty P., Haddix PL., Collins HL., Fok AK., Allen RD., Gluck SL., Heuser J., Russell DG.** Lack of acidification in mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*; 263: 678-81. 1994.

**Sur S., Wild JS., Coudhury BK., Sur N., Alam R., Klinman DM.** Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.*; 162: 6284-6291. 1999.

**Tailleux L., Neyrolles O., Honore-Bouakline S., Perret E., Sanchez F., Abastado JP., Lagrange PH., Gluckman JC., Rosenzweig M., Herrmann JL.** Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells *J. Immunol.*; 170: 1939-1948. 2003.

**Takuwa Y., Takuwa N., Sugimoto N.** The Edg family of G protein-coupled receptors for lysophospholipids: Their signaling properties and biological activities. *J. Biochem.*; 131: 151-155. 2002.

**Tigyi G., Miledi R.** Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.*; 267: 21360-21367. 1992.

**Toossi Z., Ellner JJ.** The role of TGF beta in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*; 87:107-114. 1998.

**Travis SM., Singh PK., Welsh MJ.** Antimicrobial peptides and proteins in the innate defense of the airway surface. *Curr. Opin. Immunol.*; 13: 89-95. 2001.

**Tsai B., Ye Y. and Rapoport TA.** Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; 3: 246-255. 2002.

**Ulrichs T., Kosmiadi GA., Trusov V., Jorg S., Pradi L., Titukhina M., Mishenko V., Gushina N., Kaufmann SH.** Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J. Pathol.*; 204: 217-228. 2004.

**van Crevel R., Ottenhoff THM., Van der Meer JWM.** Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microb. Reviews*; 15: 294-309. 2002.

**van Dijk MCM., Postma F., Hilkmann H., Jalink K., van Blitterswijk WJ., Moolenaar WH.** Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho, and Ca<sup>2+</sup> signaling pathways. *Curr. Biol.*; 8: 386-392. 1998.

**van Vendhoven PP., Mannaerts GP.** Subcellular localization and membrane topology of sphingosine-1-phosphate lyase in rat liver. *J. Biol. Chem.*; 266: 12502-12507. 1991.

**van Heyningen TK., Collins HL., Russell DG.** IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. *J. Immunol.*; 158: 330-337. 1997.

**Viera OV., Botelho RJ., Grinstein S.** Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. J.*; 366: 689-704. 2002.

**Vignal C., Guerardel Y., Kremer L., Masson M., Lagrand D., Mazurier J., Ellass E.** Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF-alpha and IL-8 secretion by a CD14-Toll-like receptor 2-dependent mechanism. *J. Immunol.*; 171: 2014-2023. 2003.

**von Andrian UH., Mackay CR.** T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.*; 343: 1020-1034. 2000.

**Vyas SP., Khatri K.** Liposome-based drug delivery to alveolar macrophages. *Exp. Opin. Drug Deliv.*; 4: 95-99. 2007.

**Wang DA., Lorincz Z., Bautista DL., Liliom K., Tigyi G. Parrill AL..** A single amino acid determines lysophospholipid specificity of the S1P<sub>1</sub> (EDG1) and LPA<sub>1</sub> (EDG2) phospholipid growth factor receptors. *J. Biol. Chem.*; 276: 49213-49220. 2001.

**Wang F., Van Broeklyn JR., Hobson JP., Movafagh S., Zukowska-Grojec Z., Milstien S., Spiegel S..** Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor: potential involvement in angiogenesis. *J. Biol. Chem.*; 274: 35343-35350. 1999.

**Watanabe N., Suzuki J., Kobayashi Y..** Role of calcium in tumor necrosis factor- $\alpha$  production by activated macrophages. *J. Biochem.*; 120: 1190-1195. 1996.

**World Health Organization:** Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. *World Health Organization Report 2008*.

**Worth RG., Kim MK., Kindzelskii AL., Petty HR., Schreiber AD..** Signal sequence within Fc $\gamma$ RIIA controls calcium wave propagation patterns: apparent role in phagolysosome fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 100: 4533-4538. 2003.

**Xu S., Cooper A., Sturgill-Koszycki S., van Heyningen T., Chatterjee D., Orme I., Allen P., Russell DG..** Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol.*; 153: 2568-2578. 1994.

**Yamamoto S., Yamamoto T., Takaoka T., Kuramoto E., Yano O., Tokunaga T..** Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J. Immunol.*; 148: 4072-4076. 1992.

**Yatomi Y., Ohmori T., Rile G., Kazama F., Okamoto H., Sano T., Satoh K., Kume S., Tigyi G., Igarashi Y., Ozaki Y..** Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood*; 96: 3431-3438. 2000.

**Yi AK., Tuetken R., Redford T., Waldschmidt M., Kirsch J., Krieg AM..** CpG motifs in bacterial DNA activates leucocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Immunol.*; 160: 4755-4761. 1998.

**Zhang Y., Yang Y., Woods A., Cotter RJ., Sun Z..** Resuscitation of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by phospholipids or specific peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 284: 542-547. 2001.



## 7. PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

Lettera d'accettazione del lavoro in stampa su  
*International Journal of Immunopathology and Pharmacology*

MS: 0951

23rd January 2009

TITLE: Exploiting immunotherapy in Mycobacterium tuberculosis-infected mice:

Sphingosine 1-phosphate treatment results in a protective or detrimental effect depending on the stage of infection

Authors: M. Sali, G. Delogu, E. Greco, S. Rocca, V. Colizzi, G. Fadda and M. Fraziano

Dear Dr Fraziano,

I am happy to inform you that the above manuscript has been found to be acceptable for publication in the International Journal of Immunopathology and Pharmacology.

Once the paper is sent to print you will receive page proofs from the publisher shortly before publication.

Thank you for having submitted this manuscript.

Yours sincerely,

Prof. Pio Conti

Editor -in-Chief

# **Exploiting immunotherapy in *Mycobacterium tuberculosis*-infected**

**mice:**

**Sphingosine 1-phosphate treatment results in a protective or detrimental effect**

**depending on the stage of infection**

Sali M. <sup>1</sup>, Delogu G. <sup>1</sup>, Greco E. <sup>2</sup>, Rocca S. <sup>3</sup>, Colizzi V. <sup>2</sup>, Fadda G. <sup>1</sup>, Fraziano M. <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Catholic University of the Sacred Heart, 00168 Rome, Italy

<sup>2</sup> Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", 00133 Rome, Italy

<sup>3</sup> Institute of General Pathology, Pathological Anatomy and Veterinary Obstetrics-Surgery Clinics, University of Sassari, 07100 Sassari, Italy

Abstract: 119 words

Text: 3260 words

\* Corresponding author:

Maurizio Fraziano, PhD

Department of Biology,

University of Rome "Tor Vergata"

Via della Ricerca Scientifica - 00133 – Rome - Italy

Tel.: 00-39-06-72594235

Fax: 00-39-06-72594224

E-mail: [fraziano@bio.uniroma2.it](mailto:fraziano@bio.uniroma2.it)

## Summary

Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a natural lysophospholipid able to enhance antimycobacterial innate immune response. In the present study, we have addressed the possible therapeutic role of S1P administered, during primary or acute infection in mice aerogenically infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Results show that the administration of S1P during primary infection significantly reduces the presence of MTB infected cells within pulmonary granulomas and mycobacterial burden in the lung and in the spleen. However, if S1P treatment was started during acute infection, a detrimental effect was observed in terms of pulmonary histopathology and mycobacterial burden in the lung and in the spleen. Altogether, these results show that S1P can exert a therapeutic effect as a treatment of primary infection, only.

**Legend:** Sphingosine 1-phosphate (S1P), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), Tuberculosis (TB), Lysophosphatidic acid (LPA), Colony Forming Unit (CFU), Isoniazide (INH).

**Keywords:** Tuberculosis, primary infection, acute disease, mice, immunotherapy

## Introduction

Tuberculosis (TB) is a global disease causing about 2 millions deaths annually (1). It is estimated that one-third of the world population is latently infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), with a 10% overall risk of reactivation during lifetime. Although protective immune response comprises both innate and adaptive immunity (2), a clear pattern of molecular correlates associated with the containment of infection is still lacking (3). Recently, an important role for lipids in innate antimycobacterial immune response is emerging. Lipids can be involved in both stimulatory and inhibitory signalling networks in the phagosomal membrane and, doing so, some of them ( $\square$ 2-fatty acids) may promote intracellular mycobacterial survival/replication whereas other (sphingomyelin, phosphatidylinositol, ceramide, Sphingosine) induce phagolysosome maturation and intracellular mycobacterial killing (4). We have recently reported that two structurally correlated lysophospholipids, Lysophosphatidic acid (LPA) and Sphingosine 1-phosphate (S1P), known to be involved in a wide spectrum of biological processes and to share common signal transduction pathways after binding with cognate lysophospholipid receptors (5), can activate antimycobacterial response *in vitro* in human macrophages by promoting a phospholipase D (PLD) dependent phagolysosome maturation (6, 7). In this context, it is noteworthy that i) the lung is one of the organs containing the highest amount of S1P in mice ( $29.11 \pm 1.44$  nmol/g organ) (8), ii) S1P concentration in airway mucosal surface of TB patients is significantly less in comparison with non-TB lung disease control patients and ( $47.5 \pm 36.2$  nM *versus*  $2623 \pm 1576$  nM, expressed as mean  $\pm$  standard error) (9), iii) S1P or LPA stimulation of bronchoalveolar lavage cells harvested from TB patients significantly inhibits intracellular growth of endogenous mycobacteria (7, 9). These findings suggest the possibility that lysophospholipids present in alveolar surfactant may play a role in the innate control of mycobacterial infection.

On these grounds, we assessed the therapeutic value of S1P in mice aerogenically infected with low doses of MTB at different stages of infection. The results reported herein show that S1P, administered early after infection, results in a significant decrease of pulmonary mycobacterial burden and improvement of histopathology. In contrast, a significant exacerbation of pulmonary microbiological and histopathology parameters was observed if S1P treatment was started during acute phase of mycobacterial infection.

## **Materials and Methods**

**Bacteria.** Pathogenic *M. tuberculosis* Erdman strain was grown in Middlebrook 7H9 broth supplemented with albumin, dextrose, and catalase. Mycobacteria were then harvested, suspended in sterile phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, aliquoted and stored at -80°C until use. Before infection, aliquots of strain was grown on 7H10 plates to titre the bacteria after thawing.

**In vivo infection and histopathology analysis.** Eight-week-old BALB/c female mice were obtained from Harlan (Italy), kept under barrier conditions, and fed commercial mouse feed and water *ad libitum*. All animal experiments were performed using protocols approved by the Catholic University Ethical Committee. Five mice per group were aerogenically infected with MTB Erdman strain using a Glas-Col chamber. One day post-infection, five mice were sacrificed to verify pulmonary mycobacterial colonization which resulted to be about 50 Colony Forming Unit (CFU) of bacteria per mouse. The therapeutic value of S1P was assessed in MTB infected mice during primary (protocol A) or acute (protocol B) infection (10), as follows:

**Protocol A (primary infection treatment).** As from of day 1 post infection, mice received four injections of 20 nmoles of S1P, suspended in 50 µl sterile saline, at four day intervals via the retro-orbital vein, as a treatment of primary infection. The amount of S1P inoculated in mice has been chosen on the basis of previously published dose dependence results, indicating 20 nmoles as the most effective dose in mice (6), and of preliminary toxicology studies showing absence of significant differences in body weights and in serum urea, uric acid and transaminase levels between mice receiving S1P or saline, according to the same, above described, schedule of treatment (data not shown). At days 14 and 28 post infection, the mice were sacrificed and their lungs and spleens removed, homogenized in a sterile saline and the mycobacteria enumerated by CFU assay (6). Histological analysis was carried out on left lung lobes removed from each mouse at the same time points post infection, fixed with neutral buffered paraformaldehyde, processed and stained with hematoxylin-eosin and Ziehl-Nielsen stain, and then analysed under light microscopy at 10x and 40x magnification.

**Protocol B (acute infection treatment).** As from of day 23 post infection, mice received four injections of 20 nmoles of S1P, suspended in 50 µl sterile saline, at four day intervals via the retro-orbital vein, as a treatment of acute disease. Two further groups of mice were added in comparison with protocol A and consisted of mice receiving isoniazide (INH) alone (used at 25 mg/kg of body weight), as positive treatment control, and mice receiving INH plus S1P, to assess the possible adjuvant therapeutic activity of S1P. INH was administered 5 days per week by oral gavage as from of day 23 up to day 53 post infection. At days 23 (before treatments) and 53 post infection, groups of 5 mice were sacrificed and colony forming units and histopathology analysis was carried out as described in protocol A.

*Statistics.* Comparison of groups was carried out using Student's t test as appropriate for normally distributed data. Mann-Whitney test was performed for data that were not distributed normally.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### *S1P treatment of primary mycobacterial infection reduces pulmonary mycobacterial burden, histopathology and mycobacterial dissemination.*

Anti-mycobacterial innate immunity plays a crucial role in the control of primary infection. S1P is a component of alveolar surfactant whose levels are reduced during pulmonary tuberculosis (8) and has been shown to induce antimycobacterial response *in vitro* in human macrophages (6), *ex vivo* in bronchoalveolar cells from tuberculosis patients (8), and *in vivo* in mice intravenously infected with MTB (6). On these grounds, we have evaluated the possible therapeutic effect of S1P treatment during primary infection in mice aerogenically infected with MTB, as a more reliable model of murine tuberculosis. Treatment was started as from of day 1 post infection and mycobacterial burden and histopathology were assessed at day 14 and day 28 post infection. Analysis of pulmonary histopathology at day 14 post infection shows that although no significant differences were detected in terms of granuloma size between MTB infected mice (mean  $\pm$  SE:  $24834 \pm 7668 \mu\text{m}^2$ ) and MTB-infected S1P-treated mice ( $20472 \pm 4253 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0.05$ ), S1P treatment was able to significantly decrease the number of MTB infected cells per pulmonary granulomas (Fig. 1, panels A and B). The early S1P-induced improvement in pulmonary histopathology was associated with a significant reduction of mycobacterial burden in the lung ( $-0.96 \log \text{CFU}$ ) and in the spleen ( $-0.77 \log \text{CFU}$ ) at day 28 post infection (Fig. 2A) and no detectable colonies were revealed in the spleen at day 14 after infection. The histopathology analysis performed at day 28 post infection revealed the presence of granulomatous pneumonia (Fig. 2B, left side) with diffuse interstitial and alveolar macrophage infiltrate presenting intracellular acid fast bacilli (Fig. 2B, right side) in MTB infected mice. On the contrary, S1P treatment reduced both the inflammatory infiltrate (Fig. 2C, left side) and the presence of macrophages containing acid fast bacilli (Fig. 2C, right side).

### *S1P treatment of acute mycobacterial disease exacerbates microbiological and histopathology parameters.*

In order to evaluate the therapeutic efficacy of S1P during acute disease, treatment of MTB infected mice was started at day 23 post infection, as described for acute infection treatment (10) and pulmonary and spleen mycobacterial burden and pulmonary histopathology were evaluated at day 53 post infection. Results show a significant increase in pulmonary mycobacterial colonies following S1P treatment ( $+1.23 \log \text{CFU}$ ) (Fig. 3A). Histopathology analysis revealed that S1P treatment induced the presence of very severe lesions involving almost the whole of parenchyma (Fig. 3C, left side), and with a higher acid fast bacilli load (Fig. 3C, right side) in comparison with untreated MTB infected mice (Fig. 3B). Finally, S1P induced microbiological and histopathological exacerbation reflected a significant increase in mycobacterial dissemination in the spleen ( $+1.57 \log$ ) in comparison with MTB infected control mice (Fig. 4). As expected, INH treatment significantly reduced pulmonary mycobacterial burden and concomitant S1P/INH treatment did not modify the outcome both in the lung (Fig. 3A) and in the spleen (Fig. 4).

## Discussion

Primary infection occurs when aerosol-droplet nuclei containing a small number of bacilli are inhaled and subsequently phagocytosed by alveolar macrophages and/or alveolar epithelial cells. At this time, pulmonary microenvironment and its interplay with local innate immune response determines the outcome of primary infection which is, in the vast majority of cases, associated with infection containment (11). It is well known that granuloma is essential for bacilli containment, as activated inflammatory cells enclose mycobacteria, preventing dissemination and transmission of the pathogen (12). In this context, the identification of molecular signals capable of fully activating the intracellular containment apparatus may lead to the development of new and original anti-TB treatments. We have identified S1P as a natural lipid ligand able i) to enhance *in vitro* antimycobacterial activity in human macrophages (6), ii) to induce intracellular mycobacterial killing in bronchoalveolar lavage cells from TB patients (8), and iii) to reduce pulmonary mycobacterial burden and histopathology in mice intravenously infected with MTB (6). In the present study, we have addressed the possible therapeutic role played by S1P, during primary infection or acute disease by using mice aerogenically infected with MTB, as a more reliable model of murine tuberculosis. Results show that the S1P treatment results in about ten fold reduction of mycobacteria in the lungs and reduced histopathology when treatment started during primary infection. In this context, aberrant surfactant phospholipid composition can be observed in a number of respiratory infections in children, where it has been linked to disease and respiratory failure (13). On the contrary, when S1P treatment is started at day 21 after infection (model of acute murine tuberculosis) a significant increase in pulmonary mycobacterial burden is observed, showing that a possible therapeutic effect of S1P is possible during primary mycobacterial infection, only. The pleiotropic feature of S1P, which may differentially modulate the activity of multiple cell types, including macrophages and T cells, may explain such dichotomous effect. Thus, during primary infection, antimycobacterial immune surveillance is prevalently exerted by innate immune cells (11), like macrophages, which may be activated by S1P and may directly reduce mycobacterial burden, dissemination and histopathology. However, when the infection is productively established, the containment of bacilli inside granulomas depends on the correct interaction between innate and Th1-mediated adaptive immunity (14). Indeed, S1P has been reported to inhibit T cell recruitment to inflamed peripheral tissue by retaining cells inside draining lymph nodes (15). Also, S1P is required for optimal regulatory T cells activation (16) which in turn may negatively regulate MTB specific IFN- $\gamma$  secreting Th1 cell activation (17) and antimicrobial activity of macrophages (18).

Several other small molecules have been reported to enhance innate antimycobacterial immune response by simultaneously acting as negative regulators of antigen specific T cell response. In particular,  $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> has been reported to induce antimycobacterial activity in MTB infected monocytes through a mechanism mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and dependent by the NADPH-dependent phagocyte oxidase activity (19) and by the production of the cathelicidin LL-37 (20, 21). However,  $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> shows anti-inflammatory properties due to its capability to i) reduce antigen specific T cell proliferation (22), ii) activate regulatory T cells (23), and iii) induce tolerogenic dendritic cells (24). It has been suggested that this dichotomous effect may help to control sunlight-induced inflammation, especially through UVB spectrum, by simultaneously increasing local antimicrobial activity (25). Similarly, it is plausible to hypothesize that S1P present in

alveolar lining fluid may play an important role in pulmonary physiology by activating innate antimicrobial response and by preserving tissue integrity of a such uniquely vulnerable organ, constantly exposed to environmental microorganisms (26). Taken as a whole, these results suggest that S1P can act as differential regulator of host defense responses at the intersection of innate and adaptive immune systems and that it can either play a protective role during the early phases of host-pathogen interaction or cause detrimental effects during the next stages, when the contribution of antigen specific immune response is required to effectively control infections. In this context, identification of the protective cellular and molecular mechanisms operating at the different stages of infection is crucial for exploiting successful antitubercular immunotherapy.

### **Acknowledgements.**

The present study was supported financially by the Italian Ministry for Universities (COFIN 2006 and MIUR 60%).

### **References**

- 1 WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva, 2006: WHO/HTM/TB/2006.362.
- 2 Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93-129
- 3 Fletcher HA. Correlates of immune protection from tuberculosis. *Curr Mol Med* 2007; 7: 319-25.
- 4 Anes E, Kühnel MP, Bos E, Moniz-Pereira J, Habermann A, Griffiths G. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 793-802.
- 5 Ishii N, Fukushima XY, Chun J. Lysophospholipid receptors: signalling and biology. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73: 321-54.]
- 6 Garg SK, Volpe E, Palmieri G, Mattei M, Galati D, Martino A, Bonanno E, De Vito P, Baldini PM, Spagnoli LG, Colizzi V, Fraziano M. Sphingosine 1-phosphate induces antimicrobial activity both *in vitro* and *in vivo*. *J Infect Dis* 2004; 189: 2129– 2138.
- 7 Garg SK, Valente E, Greco E, Santucci MB, De Spirito M, Papi M, Bocchino M, Saltini C, Fraziano M. Lysophosphatidic acid enhances antimycobacterial activity both *in vitro* and *ex vivo*. *Clin Immunol* 2006; 121: 23-28.
- 8 Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Okajima F. Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate by radioreceptor-binding assay. *Anal Biochem* 2000; 282: 115-20.
- 9 Garg SK, Santucci MB, Panitti M, Pucillo L, Bocchino M, Okajima F, Saltini C, Fraziano M. Does pulmonary sphingosine 1-phosphate play a protective role in the course of pulmonary tuberculosis? *Clin Immunol* 2006; 121:260-4.
- 10 Lenaerts AJ, Gruppo V, Marietta KS, Johnson CM, Driscoll DK, Tompkins NM, Rose JD, Reynolds RC, Orme IM. Preclinical testing of the nitroimidazopyran PA-824 for activity against *Mycobacterium tuberculosis* in a series of *in vitro* and *in vivo* models. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2294-301.
- 11 van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 294-309.
- 12 Kaufmann SH. How can Immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 20-30.

- 13 Mander A, Langton-Hewer S, Bernhard W, Warner JO, Postle AD. () Altered phospholipid composition and aggregate structure of lung surfactant is associated with impaired lung function in young children with respiratory infections. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 714-21.
- 14 Ulrichs T, Kaufmann SH. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 2006; 208: 261-9.
- 15 Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 2002; 296: 346-9.
- 16 Wang W, Graeler MH, Goetzl EJ. Physiological sphingosine 1-phosphate requirement for optimal activity of mouse CD4+ regulatory T cells. *FASEB J* 2004; 18: 1043-5.
- 17 Santucci MB, Greco E, De Spirito M, Arcovito G, De Angelis G, Cauda R, Fraziano M. Sphingosine 1-phosphate promotes antigen processing and presentation to CD4+ T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 687-93
- 18 Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, Bevan MJ, Urdahl KB. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med* 2007; 204: 2159-69
- 19 Sly LM, Lopez M, Nauseef WM, Reiner NE. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3-induced monocyte antimycobacterial activity is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and mediated by the NADPH-dependent phagocyte oxidase. *J Biol Chem* 2001; 276: 35482-93.
- 20 Liu PT, Stenger S, Tang DH, Modlin RL. Vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol.* 2007; 179: 2060-63.
- 21 Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006; 311: 1770-3.
- 22 Anderson AE, Sayers BL, Haniffa MA, Swan DJ, Diboll J, Wang XN, Isaacs JD, Hilkens CM. Differential regulation of naive and memory CD4+ T cells by alternatively activated dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2008 Apr 22. [Epub ahead of print]
- 23 Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiroldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001; 167: 1945-53.
- 24 Pedersen AE, Gad M, Walter MR, Claesson MH. Induction of regulatory dendritic cells by dexamethasone and 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3). *Immunol Lett* 2004; 91: 63-9.
- 25 Zasloff M. Fighting infections with vitamin D. *Nat Med* 2006; 12: 388-90.
- 26 Wright JR. Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense. *J Clin Invest* 2003; 111: 1453-5.



### Legend to the figures

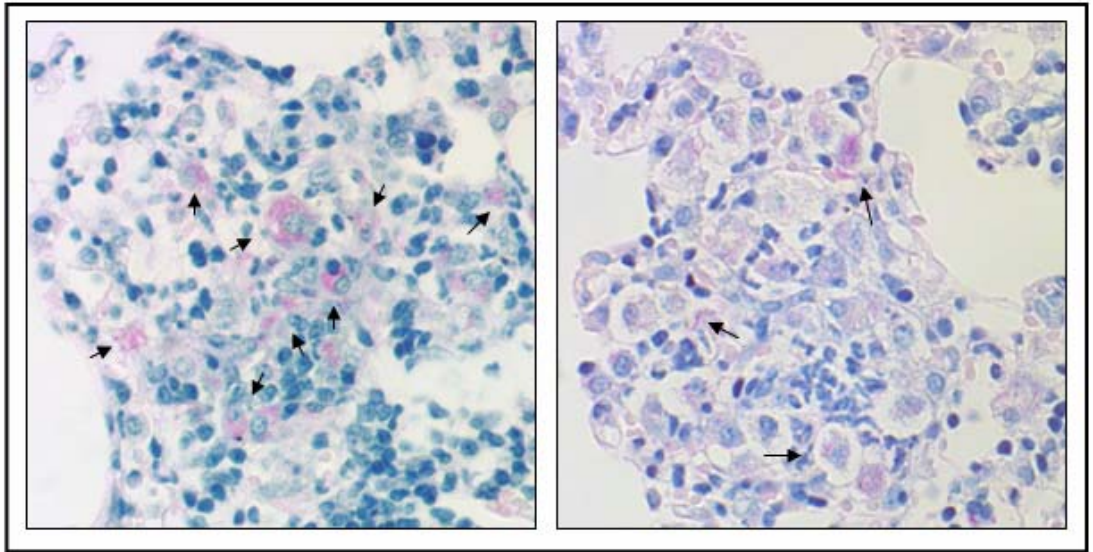
**Figure 1.** S1P treatment of primary mycobacterial infection improves pulmonary histopathology at day 14 post infection (magnification 40x). Five mice per group were aerogenically infected with MTB and intravenously injected four times with 20 nmoles of S1P at four day intervals. (A) Left lung lobes were recovered from MTB-infected mice (left side), and MTB-infected S1P-treated mice (right side), at day 14 post-infection. Samples were fixed, processed, and stained with hematoxylin-eosin; acid fast bacilli are visualized using Ziehl-Nielsen stain. Arrows indicate MTB infected cells. (B) shows the number of MTB infected cell per granuloma, at day 14 post-infection. Line indicates mean value. MTB infected *versus* S1P treated mice,  $p=0.009$  by Mann-Whitney test.

**Figure 2.** S1P treatment of primary mycobacterial infection improves pulmonary histopathology and mycobacterial burden in the lung and in the spleen. Five mice per group were aerogenically infected with MTB and intravenously injected four times with 20 nmoles of S1P at four day intervals. (A) shows bacterial colonization of the lung and of the spleen tissue at the indicated time points in MTB-infected and S1P-treated mice. \*  $p<0.001$ , °  $p=0.04$  in comparison with untreated MTB infected mice by Student's t test. (B) and (C) show histopathology analysis of the lung tissues from MTB infected (A) and S1P treated (B), at day 28 post-infection, at 10x (left side) and 40x (right side) magnification. Harrows in panels B and C indicate MTB infected cells.

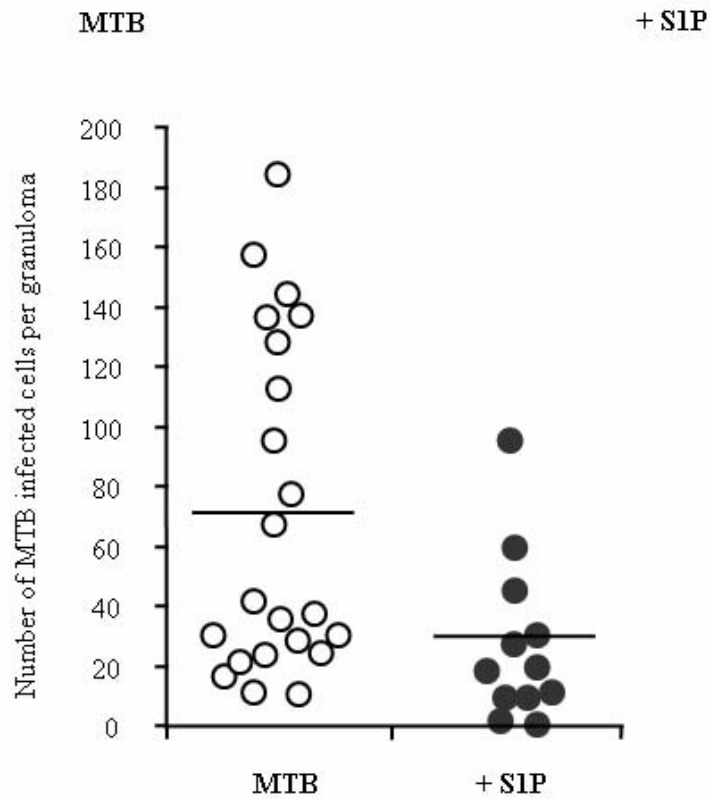
**Figure 3.** S1P treatment of acute disease exacerbates microbiological and histopathology parameters in MTB infected mice. Five mice per group were aerogenically infected with MTB and intravenously injected four times with 20 nmoles of S1P at four day intervals starting from day 23 post infection. (A) shows bacterial colonization of the lung tissue at days 23 and 53 post infection in control, S1P-treated, INH treated, INH plus S1P treated mice. \*  $p<0.001$ , °  $p=0.002$  in comparison with untreated MTB infected mice by Student's t test. (B) and (C) show histopathology analysis of the lung tissues from MTB infected (B) and S1P treated (C) at 10x (left side) and 40x (right side) magnification.

**Figure 4.** S1P treatment of acute disease exacerbates mycobacterial dissemination in the spleen. Five mice per group were aerogenically infected with MTB and intravenously injected four times with 20 nmoles of S1P at four day intervals starting from day 23 post infection. Spleen bacterial colonization is shown at days 23 and 53 post-infection in control, S1P-treated, INH treated, INH plus S1P treated mice. \*  $p=0.001$ , °  $p<0.001$  in comparison with untreated MTB infected mice by Student's t test.

**A**

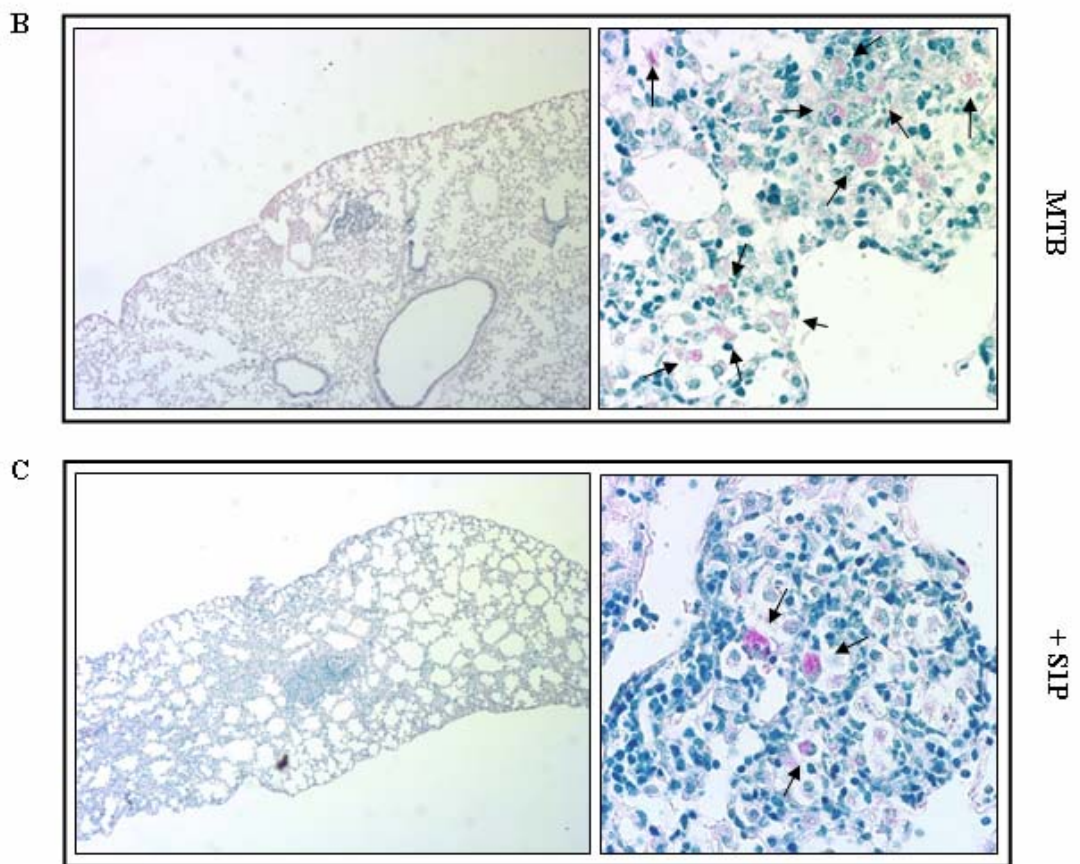
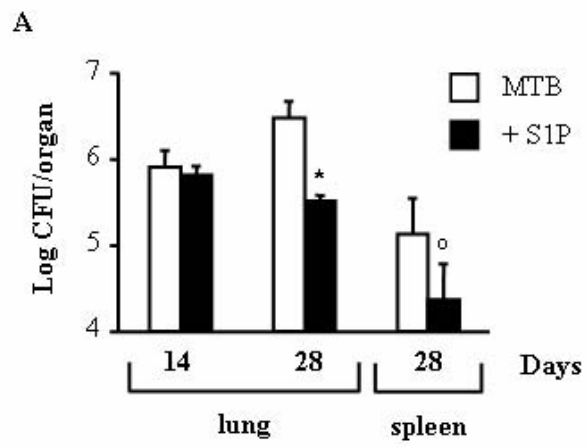


**B**



*Sali M. et al.*

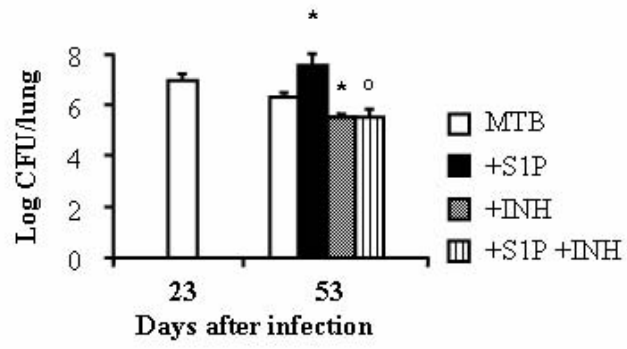
**Figure 1**



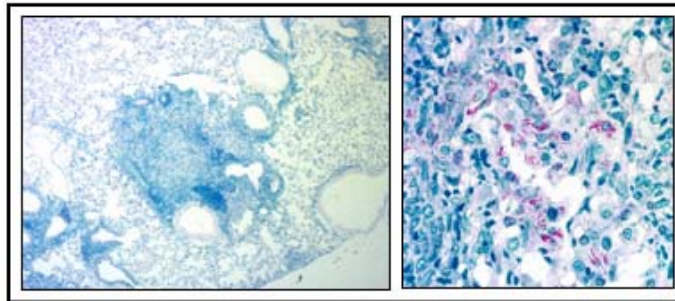
*Sali M. et al.*

**Figure 2**

A

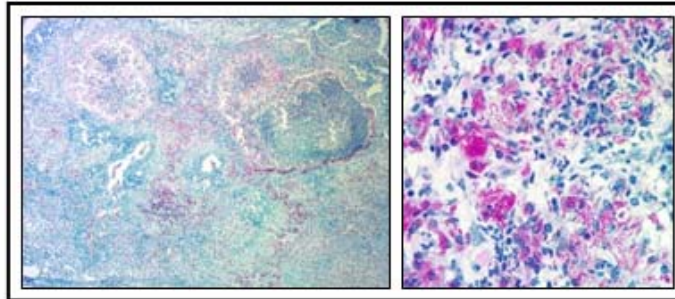


B



MTB

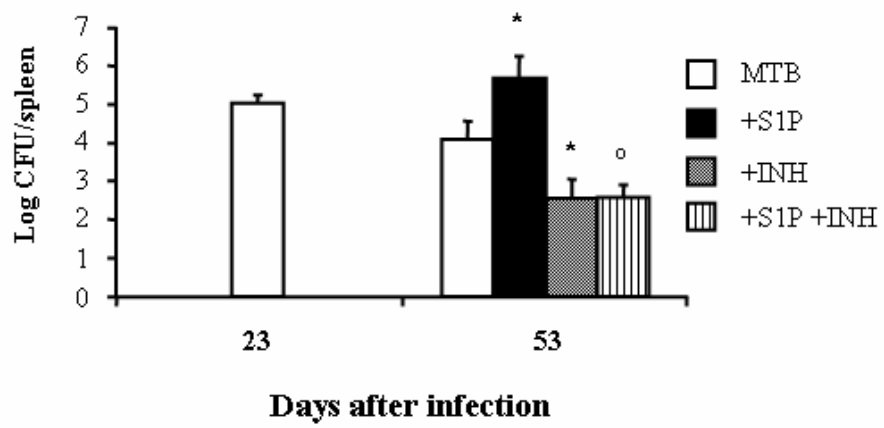
C



+S1P

*Sali M. et al.*

**Figure 3**



## Sphingosine 1-phosphate promotes antigen processing and presentation to CD4<sup>+</sup> T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes

Marilina B. Santucci<sup>a</sup>, Emanuela Greco<sup>a</sup>, Marco De Spirito<sup>b</sup>, Giuseppe Arcovito<sup>b</sup>, Giulia De Angelis<sup>c</sup>, Roberto Cauda<sup>c</sup>, Maurizio Fraziano<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", Via della Ricerca Scientifica, 00133 Rome, Italy

<sup>b</sup> Institute of Physics, Catholic University of S. Hearth, Rome, Italy

<sup>c</sup> Department of Infectious Diseases, Catholic University of S. Hearth, Rome, Italy

Received 17 July 2007

Available online 25 July 2007

### Abstract

Sphingosine 1-phosphate (S1P) has recently been described to induce antimycobacterial activity. The present study analyses the role played by S1P in antigen presentation of monocytes and in the next activation of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-specific CD4<sup>+</sup> T cell response. Results reported herein show that S1P stimulation of MTB-infected monocytes (i) inhibits intracellular mycobacterial growth, (ii) enhances phagolysosome maturation and the transit of mycobacteria in MHC class II compartments, (iii) increases the frequency of MTB-specific CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T cells, expressing the inflammatory homing receptor CCR5, derived from tuberculosis patients and PPD<sup>+</sup>, BCG naïve, healthy subjects, and (iv) induces IFN- $\gamma$  production in CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T cells derived from PPD<sup>+</sup> healthy individuals, only. Altogether, these results show that S1P promotes antigen processing and presentation in monocytes, increases the frequency of MTB-specific CD4<sup>+</sup> T cells and can regulate IFN- $\gamma$  production by antigen specific CD4<sup>+</sup> T cells in the course of active disease.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Sphingosine 1-phosphate; *Mycobacterium tuberculosis*; Antigen presentation; Patients; IFN- $\gamma$ ; CCR5

Tuberculosis (TB) is one of the most dramatic pathologies in developing countries due to a single pathogen infection and is responsible for about 2 million deaths each year [1]. Primary infection occurs when aerosol-droplet nuclei containing a small number of bacilli are deposited in the alveoli of the lung and subsequently phagocytosed by alveolar macrophages. During these early stages of host–pathogen interaction, the possibility to get active disease infection crucially depends by the intensity of early innate immune response and by its interplay with adaptive immune response [2]. In fact, a balanced series of innate immune pathways and T-helper 1 dominant adaptive immune pathways are activated following phagocytosis of the bacteria culminating in granuloma formation [3]. The

inflammatory response is generally characterized by lymphomonocytic infiltrates expressing homing receptors, such as CCR5 and CXCR3 [4,5]. In this context, we have recently reported the expansion of CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> T lymphocytes in the lung of TB patients in comparison with non-TB lung disease patients and healthy controls [6].

Sphingosine 1-phosphate (S1P), a product of sphingolipid metabolism, known to regulate growth/survival, differentiation, chemotaxis of various cell types, has been suggested to be a unique signalling molecule due to its both intracellular and extracellular mode of action [7]. An accumulating body of evidences shows that S1P may potentiate innate immune response [8]. In this context, S1P has been reported to induce respiratory burst in alveolar macrophages and has been shown to enhance antimycobacterial activity *in vitro* in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-infected macrophages and *ex vivo* in broncho-alveolar

\* Corresponding author. Fax: +39 6 72594224.

E-mail address: [fraziano@bio.uniroma2.it](mailto:fraziano@bio.uniroma2.it) (M. Fraziano).



lavage (BAL) cells from TB patients [9,10]. Moreover, the treatment of MTB-infected mice significantly reduced granulomatous response in the lung, with a prevalent macrophage infiltrate without evidences of necrosis, [9] suggesting that SIP can reduce tissue-damaging T cell-mediated immune response while increasing the local innate antimicrobial activity.

On these grounds, how SIP affects antigen presentation and the activation of CD4+ T cell response in the course of MTB infection in monocytes is a still uninvestigated issue. Thus, the aim of the present study is to study the role played by SIP in antigen presentation of monocytes and in the next activation of MTB-specific CD4+ T cell response. Results reported herein show that SIP stimulation (i) induces antimycobacterial pathway in human monocytes, characterized by enhanced phagolysosome maturation, (ii) promotes the transit of mycobacteria in MHC class II compartments, and (iii) increases the frequency of MTB-specific CD4+ T cells.

## Materials and methods

**Bacteria and colony forming unit assay.** Pathogenic *M. tuberculosis* (MTB) H37Rv strain was grown, as described [11]. Mycobacteria were then harvested, suspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Before infection, aliquots were grown on 7H10 agar (Becton–Dickinson, MD) plates to titre the bacteria after thawing. Colony forming unit assay was performed as previously described [11].

**Cell culture and infection of monocytes.** Human monocytoid THP1 leukemia cell line was used as a model of human monocytes. Cell culture and infection were carried out, as described [12]. After removal of non-phagocytosed bacilli, cells were stimulated for 5 days with  $5\ \mu\text{M}$  of D-erythro Sphingosine 1-phosphate (Calbiochem). Any modification, in terms of macrophage viability, was not detected in the experimental conditions used (data not shown).

**Confocal fluorescent microscopy.** The degree of maturation of MTB-containing phagosome was assessed by analyzing the colocalization of Auramine stained bacilli with lysosomes, stained with the acidophilic dye LysoTracker Red (Molecular Probes, NL) or with anti-lysosomal associated membrane protein (LAMP)-1 moAb (IgG2b, clone 25, Transduction Laboratories, Becton–Dickinson, MD), as described [12]. The localization of bacilli in HLA class II expressing vesicles was assessed after staining with PE labeled anti-HLA-DR monoclonal antibody (IgG<sub>2b</sub>k, TÚ36, BD Pharmingen). The staining with primary anti-LAMP-1 moAb was followed by incubation with Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG moAb (Alexis) for further 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Confocal fluorescence microscopy was performed by using a Leica Laser system linked to a Leica inverted microscope (TCS SP2). An argon-krypton laser ( $\lambda = 488\ \text{nm}$ ) and a helium–neon laser ( $\lambda = 543\ \text{nm}$ ) were used in combination with a 505–530 nm, 580–600 nm, 578–603 nm, and 488–576 nm emission band pass filter for detection of Auramine, LysoTracker Red, Alexa Fluor 568 and PE fluorescence, respectively.

**Study subjects and blood collection.** Ten patients with culture-confirmed pulmonary TB (age  $30 \pm 13.67$  years, 5 males, 6 Caucasians), 7 asymptomatic PPD+, BCG naïve (age  $47.6 \pm 13.5$  years, 3 males, 7 Caucasians), and 5 healthy PPD– (age  $33 \pm 8.51$  years, 2 males, 5 Caucasians) subjects were enrolled in the study. Patients with pulmonary TB were newly diagnosed, had not received previous anti-TB treatment, and tested negative for HIV. Patients with hepatitis, malnutrition, immunodeficiency, other active infectious diseases, cardiac complications, immunosuppressive therapies, or cancer were excluded from the study. Patients and controls were bled by venipuncture (5 mL) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by centrifugation on Ficoll-Hypaque gradient, as previously described [6]. Subjects were enrolled at the

Catholic University of S. Hearth, Infectious Disease Department, Rome, Italy after signed informed consent. The study has been approved by the local Ethics Committee.

**Detection of antigen-specific T cell frequency by flow cytometry.** After separation, an aliquot of PBMC was analysed in flow cytometry to see the percentage of monocytes by morphological parameter analysis (side scatter *vs.* forward scatter). PBMC were then suspended at the concentration of  $10^6$  cells/mL, distributed in 1 mL per well in 24-well plates (COSTAR) and exposed to MTB H37Rv at the MOI of 1 bacillus per monocyte for 3 h. After three washings, cells were suspended in complete medium in the presence or absence of  $5\ \mu\text{M}$  SIP for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Thereafter,  $10\ \mu\text{g/mL}$  Brefeldin A was added and cells left to incubate at  $37^{\circ}\text{C}$  for further 18 h. PBMC were then collected, washed and labelled with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies directed against CD4 (PerCP-conjugated, clone SK3, IgG<sub>1</sub>K, Becton–Dickinson, CA), CD69 (FITC-conjugated, clone CH/4, IgG<sub>2a</sub>, Serotec), CCR5 (PE-conjugated, clone 2D7, IgG<sub>2a</sub>, Becton–Dickinson, CA), CCR3 (PE-conjugated, clone 61828.111, IgG<sub>2a</sub>, R&D Systems). Premixed cocktails containing appropriate fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (Fluorescein, Phycoerythrin, Peridinin–chlorophyll–protein) were reacted with  $50\ \mu\text{L}$  of PBMC cell suspension on ice for 30 min in the dark. To assess IFN- $\gamma$  production by CD4+ T lymphocytes, cells were incubated with anti IFN- $\gamma$  monoclonal antibody (Allophycocyanine, APC, conjugated, clone 25723.11, IgG<sub>2b</sub>, Becton–Dickinson) or an irrelevant antibody (APC-conjugated, clone A95-1, IgG<sub>2b</sub>, Becton–Dickinson, CA) as control. After membrane staining, cells were fixed and permeabilized for 5 min with Citofix/Citoperm (BD Bioscience), washed and incubated with anti-IFN- $\gamma$  monoclonal antibody for 45 min at  $4^{\circ}\text{C}$  in the dark. Finally, cells underwent two final washings before being resuspended in PBS and analyzed using a FACSCalibur (BD Biosciences, San José, CA) by a CellQuest software (BD Biosciences).

**Statistics.** Comparisons between groups were done using paired and unpaired Student's *t* test as indicated.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### *SIP promotes antigen processing in MTB-infected monocytes*

Circulating undifferentiated monocytes represent both one of the targets of MTB infection and a pool of inflammatory cells with potential antimycobacterial capability and antigen presenting activity [13]. In this context, we have preliminarily monitored intracellular growth of the virulent strain MTB H37Rv in THP1 cell line after SIP stimulation. Results indicate that  $36 \pm 12\%$  viable intracellular mycobacteria were recovered at day 5 after SIP stimulation in monocytes (see [Supplementary material](#)). As it has been previously reported that MTB interferes with antigen processing, by residing in non-acidified vacuoles sequestered away from late endosomal compartments [14], phagolysosome maturation, in terms of acidification of MTB containing phagosomes and expression of lysosomal associated membrane protein (LAMP)-1, in SIP-stimulated MTB-infected THP1 cells has been investigated by confocal fluorescent microscopy. Results show that in the absence of SIP, phagocytosed mycobacteria appeared green, indicating their presence in non-acidic vesicles (Fig. 1A). In contrast, SIP treatment induced a significant increase in the acidification of MTB-containing phagosomes, which appeared yellow, indicating the colocalization of green bacilli in acidified phagosomes. Results expressed in terms of percentage of MTB residing in acidic

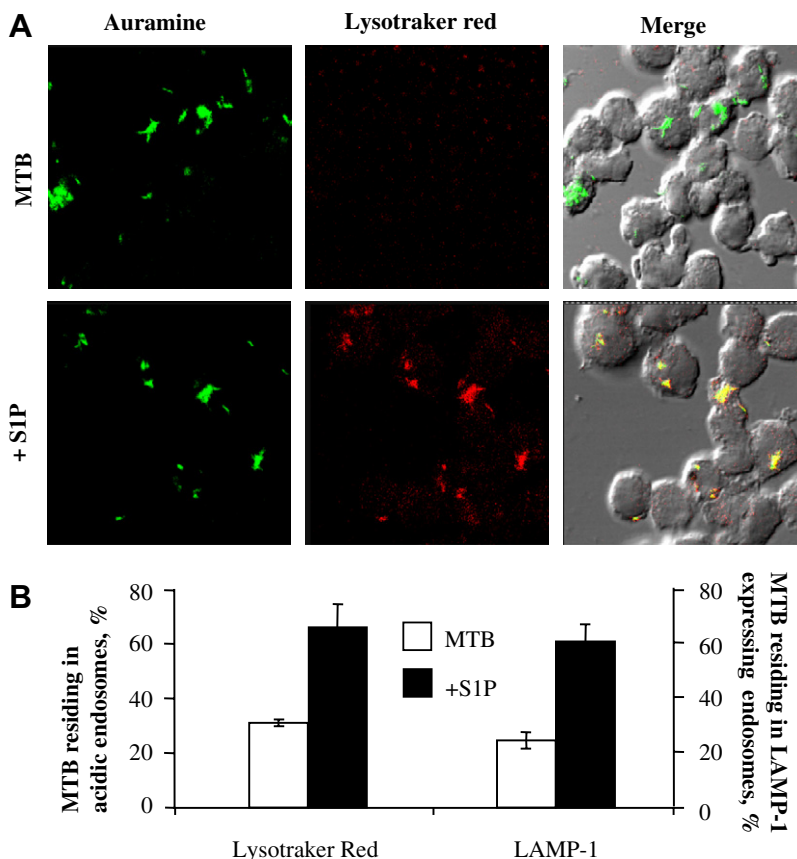


Fig. 1. S1P induces phagolysosome maturation in MTB-infected THP1 cells. (A) Representative picture from three separate experiments shows the increase of MTB-residing in acidic vacuoles after S1P stimulation. (B) Summary of the mean percentage  $\pm$  SD of MTB-colocalized with acidic phagosomes (left side,  $p = 0.0002$ ) or with LAMP-1 positive phagosomes (right side,  $p = 0.0004$ ), determined by counting over 50 bacilli from at least 40 macrophages per condition. Three different experiments were assessed.  $p$  value was calculated by comparing differences between means by unpaired Student's  $t$  test.

(Fig. 1B, left side) or LAMP-1 (Fig. 1B, right side) expressing phagosomes over total intracellular mycobacteria show that S1P stimulation significantly increases the colocalization of green mycobacteria in acidic and LAMP-1 positive phagolysosomes.

A direct consequence of the permanence of MTB in non-acidified vacuoles sequestered away from late endosomal compartments is the inhibition of antigen-MHC class II complex formation [15]. In order to see whether the activation of phagolysosomal maturation induced by S1P could, in turn, promote the localization of mycobacteria in MHC class II compartments (MIIC), we have analysed the colocalization of auramine labelled mycobacteria in MHC class II expressing vesicles in the presence or absence of S1P. Results show that S1P stimulation induced a significantly higher proportion of mycobacteria residing in MHC class II compartments (Fig. 2A and B,  $p = 0.0001$ ).

*S1P enhanced antigen processing capability is associated with increased frequency of MTB-specific CD4+ T lymphocytes*

In order to see whether the increased phagolysosome maturation and the more efficient delivery of mycobacte-

rial cargo to MHC class II compartments induced by S1P in MTB-infected monocytes could increase the frequency of MTB-specific CD4+ T cells, PBMC from TB patients ( $n = 10$ ), healthy PPD+, BCG naïve, ( $n = 7$ ) and healthy PPD- ( $n = 5$ ) individuals were exposed to MTB, stimulated or not with S1P, and preliminarily monitored by flow cytometry for CD4 and CD69 expression, as early marker of TCR associated activation. Results show that S1P stimulation significantly increases the frequency of CD4+CD69+ T cells in MTB-exposed PBMC from TB patients (Fig. 3A,  $p = 0.02$ ) and PPD+ healthy, BCG naïve, individuals (Fig. 3B,  $p = 0.04$ ), but not in MTB-exposed PBMC from PPD- healthy subjects (Fig. 3C,  $p = \text{n.s.}$ ). Moreover, we have recently demonstrated that CD4+CCR5+, but not CD4+CCR3+, T lymphocytes preferentially accumulate in the lung of tuberculosis patients [6]. On these grounds, we have extended the analysis by monitoring CCR5 (as homing receptor during pulmonary tuberculosis) and CCR3 expression on CD4+CD69+ T lymphocytes. Results show that S1P stimulation significantly increases the frequency of CD4+CD69+CCR5+ T lymphocytes in MTB-exposed PBMC from tuberculosis patients (Fig. 3D,  $p = 0.0001$ ) and PPD+ healthy



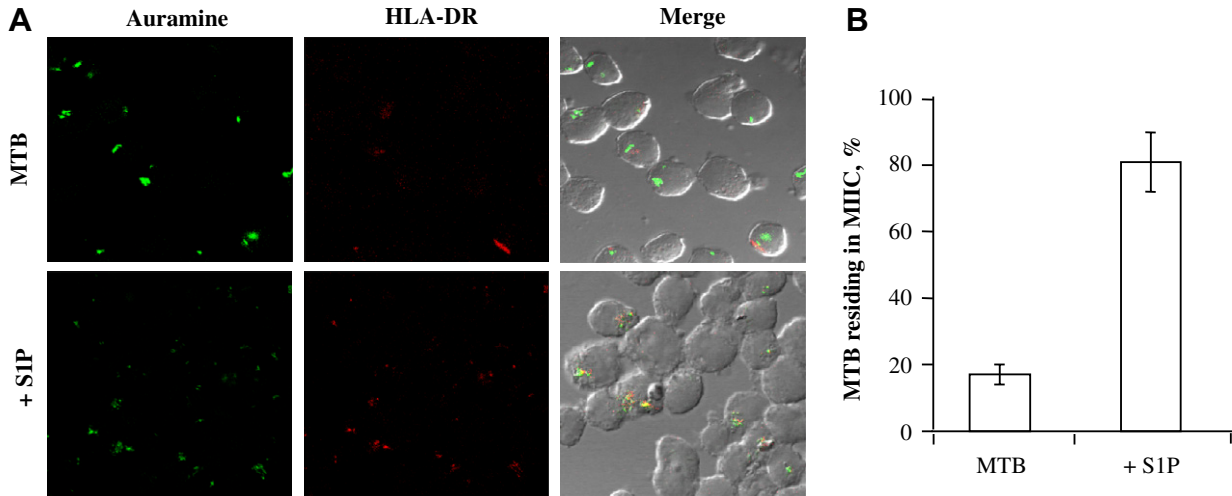


Fig. 2. MTB colocalizes with HLA-DR expressing compartments (MIIC) after S1P stimulation in THP1 cells. (A) Representative picture from three separate experiments shows the increase of MTB-residing in HLA-DR positive vacuoles after S1P treatment. (B) Summary of the mean percentage  $\pm$  SD of MTB-colocalized with HLA-DR expressing compartments, determined by counting over 50 bacilli from at least 40 macrophages per sample. Three different experiments were assessed.  $p = 0.0001$  was calculated by comparing differences between means by unpaired Student's  $t$  test.

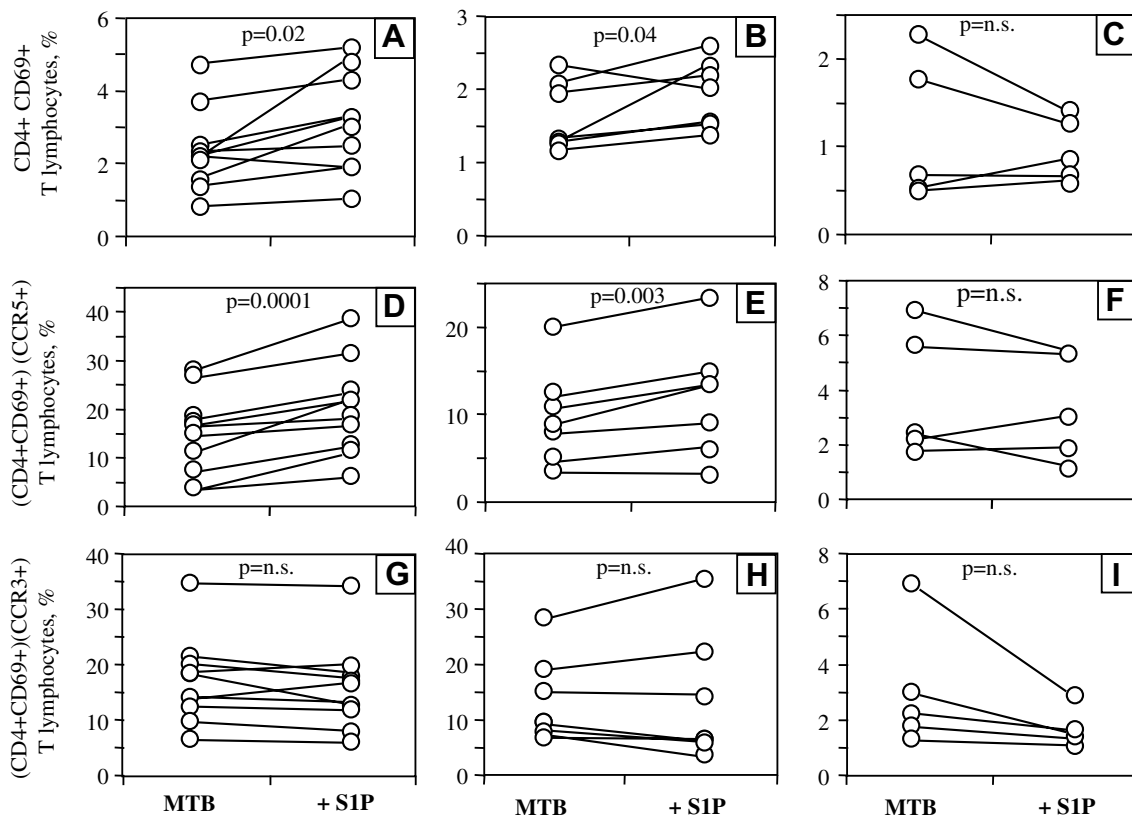


Fig. 3. Frequency of peripheral blood-derived CD4+ CD69+ T cells (A–C), (CD4+ CD69+) CCR5+ T cells (D–F) or (CD4+ CD69+) CCR3+ T cells (G–I) from TB patients (A,D,G), PPD+, BCG naïve, healthy subjects (B,E,H) and PPD– healthy controls (C,F,I). PBMC were exposed to MTB H37Rv at the MOI of 1 bacillus per monocyte for 3 h. Cells were then washed, stimulated or not with 5  $\mu$ M S1P and incubate for 18 h at 37  $^{\circ}$ C. The percentage of CCR5+ or CCR3+ cells was analysed on double positive CD4+ CD69+ T cells.  $p$  value is indicated in each panel and was calculated by comparing differences between unstimulated and S1P-stimulated groups by paired Student's  $t$  test.

(BCG naïve) individuals (Fig. 3E,  $p = 0.003$ ), but not in MTB-exposed PBMC from PPD– healthy subjects (Fig. 3F,  $p = n.s.$ ). In contrast, any increase was not

observed in the frequency of CD4+CD69+CCR3+ T lymphocytes after stimulation with S1P (Fig. 3G–I,  $p = n.s.$ ).

### S1P regulates IFN- $\gamma$ production in MTB-specific CD4+CD69+ T lymphocytes

IFN- $\gamma$  is the prototypic Th1 cytokine which is often associated with a CCR5 membrane phenotype, particularly in mucosal surfaces [16]. On these grounds, we have further extended the analysis by monitoring intracytoplasmatic IFN- $\gamma$  production on CD4+CD69+CCR5+ T lymphocytes. Results show that S1P stimulation significantly increases the frequency of CD4+CD69+CCR5+ IFN- $\gamma$  producing T lymphocytes in MTB-exposed PBMC from PPD+ healthy, BCG naïve, individuals (Fig. 4B,  $p = 0.01$ ), but not in MTB-exposed PBMC from tuberculosis patients (Fig. 4A,  $p = n.s.$ ) and from PPD- healthy subjects (Fig. 4C,  $p = n.s.$ ). Finally, similar results were obtained if IFN- $\gamma$  production was monitored on all CD4+CD69+ T lymphocytes (Fig. 4D–F).

### Discussion

Circulating undifferentiated monocytes represent both one of the targets of MTB infection and an important source of inflammatory cells that are involved in granulomatous response both in the course of active disease and latent infection [17]. Moreover, the lung is one of the organs containing the highest amount of S1P [18] and S1P concentration in the airway mucosal surfaces of TB patients has been previously reported to be significantly less than that observed in control patients [10]. Results reported herein show that S1P significantly reduces intracellular mycobacterial growth and promotes phagolysos-

some biogenesis in monocytes. On these grounds, the presence of S1P in the airway mucosa surface may represent a host factor able to properly activate newly recruited monocytes during infection. Moreover, pathogenic mycobacteria are able to interfere with the MHC class II dependent antigen processing and presentation pathway, critical for the priming of the antimycobacterial adaptive immune response [19], by sequestering antigens from intracellular pools of MHC class II molecules en route to the surface [20]. Coherently with the effect on phagolysosomal maturation, the present study shows that S1P promotes antigen delivery in MHC class II expressing vesicles. The mechanism through which S1P may enhance antigen processing and presentation in monocytes is still not known and may involve  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores [21], activation of phospholipases involved in vesicular trafficking (e.g. PLD) [9,22] and actin polymerization [23].

The increased localization of mycobacteria in MHC class II expressing vesicles suggest that S1P-stimulated MTB-infected monocytes could express a wider antigenic repertoire which in turn may activate a higher number of antigen-specific CD4+ T cell precursors. Results reported herein show that S1P stimulation of *in vitro* MTB-exposed PBMC from TB patients, PPD+ and PPD- individuals enhances the proportion of CD4+CD69+ T lymphocytes in TB patients and in PPD+, BCG naïve, healthy controls, but not in PPD- subjects. Antigen-specific CD4+ T lymphocytes require the expression of homing receptors in order to migrate in the inflamed tissue. Both CD4+CCR5+ and CD4+CCR3+ T cells have been described to significantly accumulate in the lung coming from peripheral

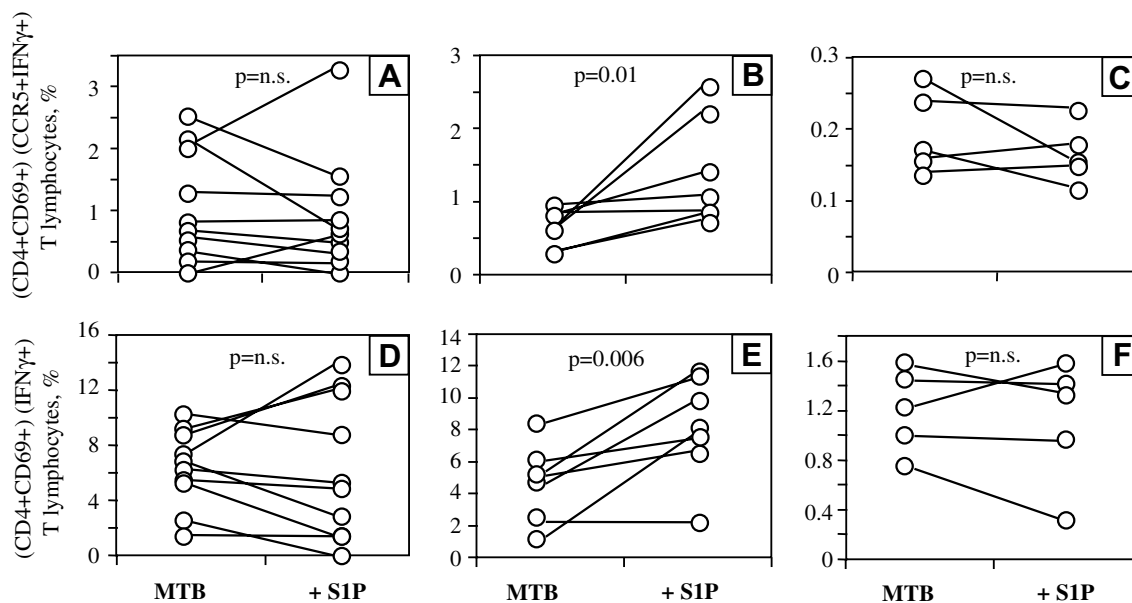


Fig. 4. Frequency of either peripheral blood-derived (CD4+ CD69+) (CCR5+ IFN- $\gamma$ +) T cells (A–C) or peripheral blood-derived (CD4+ CD69+) (IFN- $\gamma$ +) T cells (D–F) from TB patients (A,D), PPD+, BCG naïve, healthy subjects (B,E), and PPD- healthy controls (C,F). PBMC were exposed to MTB H37Rv at the MOI of 1 bacillus per monocyte for 3 h. Cells were then washed, pulsed with 10  $\mu$ g/ml Brefeldin A, stimulated or not with 5  $\mu$ M S1P and incubate for 18 h at 37  $^{\circ}$ C. The percentage of either CCR5+ IFN- $\gamma$ + cells or IFN- $\gamma$ + cells were analysed on double positive CD4+ CD69+ T cells.  $p$  value is indicated in each panel and was calculated by comparing differences between unstimulated and S1P- stimulated groups by paired Student's  $t$  test.

blood [6]. However, the frequency of CD4+CCR5+ T cells, but not of CD4+CCR3+ T cells, observed in BAL from TB patients was significantly higher than that observed in BAL cells from control patients [6]. Similar results were also obtained in the course of MTB infection in Cynomolgus macaques [4], suggesting that CCR5 may represent a preferential homing receptor in the course of pulmonary tuberculosis. Coherently, CCR5 ligands (RANTES, MIP-1 $\alpha$ , and MIP-1 $\beta$ ) are also significantly produced both in the course of *in vitro* MTB infection and *in vivo* during pulmonary tuberculosis [24]. Results reported herein show that S1P stimulation of MTB-infected monocytes enhances the frequency of MTB-specific CD4+ T cells expressing CCR5, but not CCR3, suggesting their propensity to migrate to the lung.

CCR5 expression is often associated with Th1 phenotype whereas CCR3 is prevalently associated with Th2 phenotype [25]. Results reported herein show that the expansion of MTB-specific CD4+CD69+CCR5+ T lymphocytes was associated with IFN- $\gamma$  production in healthy PPD+ subjects, but not in TB patients. The reason for such a discrepancy is currently under investigation and may reside in the peculiar activity that S1P may exert on different cell types [8]. In fact, S1P is required for optimal activation of regulatory T cells [26] which are significantly expanded in the course of pulmonary TB [27]. Although an excessive regulatory activity focused on Th1 pathways might compromise effector mechanisms needed to overcome MTB [28–30], regulatory T cells may play an essential protective role in the maintenance of tissue integrity [28]. In this context, the evidence that S1P stimulation enhances the frequency of MTB-specific CD4+CD69+CCR5+ T cells producing IFN- $\gamma$  in healthy PPD+ subjects may be relevant. In fact, in the course of latent infection, antigen-specific Th1 cells may be important for the maintenance of granuloma integrity [31], whereas in the course of active disease their control by regulatory T cells may avoid that an uncontrolled, tissue damaging, Th1 immune response can take place [28,32].

Finally, the present study shows that S1P favours antigen processing and presentation and consequently promotes the expansion of higher frequency of antigen-specific CD4+ T cells. The capability to modulate effector functions of monocytes, e.g. by enhancing antimycobacterial pathway, and of MTB-specific CD4+ T cells, e.g. by regulating IFN- $\gamma$  production in the course of active disease, suggests S1P as a regulator of pulmonary innate and adaptive immune response which can be exploited for novel adjuvant immunotherapeutic approaches.

## Acknowledgments

The present study was financially supported by the Italian Ministry of Health (Grant 4AD/F9) and by the Italian Ministry of University (COFIN 2004, FIRB 2001).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bbrc.2007.07.087](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.087).

## References

- [1] E.L. Corbett, J.C. Watt, N. Walker, D. Maher, B.G. Williams, M.C. Raviglione, C. Dye, The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic, *Arch. Intern. Med.* 163 (2003) 1009–1021.
- [2] S.H. Kaufmann, How can Immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat. Rev. Immunol.* 1 (2001) 20–30.
- [3] P. Salgame, Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Curr. Opin. Immunol.* 17 (2005) 374–380.
- [4] P.L. Lin, S. Pawar, A. Myers, A. Pegu, C. Fuhrman, T.A. Reinhart, S.V. Capuano, E. Klein, J.L. Flynn, Early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection in cynomolgus macaques, *Infect. Immun.* 74 (2006) 3790–3803.
- [5] D.K. Mitra, S.K. Sharma, A.K. Dinda, M.S. Bindra, B. Madan, B. Ghosh, Polarized helper T cells in tubercular pleural effusion: phenotypic identity and selective recruitment, *Eur. J. Immunol.* 35 (2005) 2367–2375.
- [6] M.B. Santucci, M. Bocchino, S.K. Garg, A. Marruchella, V. Colizzi, C. Saltini, M. Fraziano, Expansion of CCR5+ CD4+ T-lymphocytes in the course of active pulmonary tuberculosis, *Eur. Respir. J.* 24 (2004) 638–643.
- [7] S. Spiegel, A.H. Merrill Jr., Sphingolipid metabolism and cell growth regulation, *FASEB J.* 10 (1996) 1388–1397.
- [8] H. Rosen, E.J. Goetzl, Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 560–570.
- [9] S.K. Garg, E. Volpe, G. Palmieri, M. Mattei, D. Galati, A. Martino, E. Bonanno, P. De Vito, P.M. Baldini, L.G. Spagnoli, V. Colizzi, M. Fraziano, Sphingosine 1-phosphate induces antimicrobial activity both *in vitro* and *in vivo*, *J. Infect. Dis.* 189 (2004) 2129–2138.
- [10] S.K. Garg, M.B. Santucci, M. Panitti, L. Pucillo, M. Bocchino, F. Okajima, P.S. Bisen, C. Saltini, M. Fraziano, Does sphingosine 1-phosphate play a protective role in the course of pulmonary tuberculosis? *Clin. Immunol.* 121 (2006) 260–264.
- [11] S.K. Garg, E. Valente, E. Greco, M.B. Santucci, M. De Spirito, M. Papi, M. Bocchino, C. Saltini, M. Fraziano, Lysophosphatidic acid enhances antimycobacterial activity both *in vitro*, *Clin. Immunol.* 121 (2006) 23–28.
- [12] E. Greco, M. De Spirito, M. Papi, M. Fossati, G. Auricchio, M. Fraziano, CpG oligodeoxynucleotides induce Ca<sup>2+</sup>-dependent Phospholipase D leading to phagolysosome maturation and mycobacteriocidal activity in monocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347 (2006) 963–969.
- [13] C. Manca, M.B. Reed, S. Freeman, B. Mathema, B. Kreiswirth, C.E. Barry 3rd, G. Kaplan, Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis, *Infect. Immun.* 72 (2004) 5511–5514.
- [14] I. Vergne, J. Chua, S.B. Singh, V. Deretic, Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20 (2004) 367–394.
- [15] C. Watts, Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules, *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 821–850.
- [16] F. Hladik, G. Lentz, E. Delpit, A. McElroy, M.J. McElrath, Coexpression of CCR5 and IL-2 in human genital but not blood T cells: implications for the ontogeny of the CCR5+ Th1 phenotype, *J. Immunol.* 163 (1999) 2306–2313.
- [17] T.C. Zahrt, Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Microbes. Infect.* 5 (2003) 159–167.

- [18] N. Murata, K. Sato, J. Kon, H. Tomura, F. Okajima, Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate by radioreceptor-binding assay, *Anal. Biochem.* 282 (2000) 115–120.
- [19] J.L. Flynn, J. Chan, Immunology of tuberculosis, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 93–129.
- [20] H.J. Ullrich, W.L. Beatty, D.G. Russell, Interaction of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes with the antigen presentation pathway, *J. Immunol.* 165 (2000) 6073–6080.
- [21] Z.A. Malik, C.R.S. Thompson Hashimi, B. Porter, S.S. Iyer, D.J. Kusner, *Mycobacterium tuberculosis* blocks  $Ca^{2+}$  signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase, *J. Immunol.* 170 (2003) 2811–2815.
- [22] E. Carrasco-Marin, C. Alvarez-Dominguez, F. Leyva-Cobian, Wortmannin, an inhibitor of phospholipase D activation, selectively blocks major histocompatibility complex class II-restricted antigen presentation, *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 2031–2039.
- [23] E. Anes, M.P. Kuhnél, E. Bos, J. Moniz-Pereira, A. Habermann, G. Griffiths, Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 793–802.
- [24] M.I. Sadek, E. Sada, Z. Toossi, S.K. Schwander, E.A. Rich, Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 19 (1998) 513–521.
- [25] U.H. von Andrian, C.R. Mackay, T-cell function and migration. Two sides of the same coin, *N. Engl. J. Med.* 343 (2000) 1020–1034.
- [26] W. Wang, M.H. Graeler, E.J. Goetzl, Physiological sphingosine 1-phosphate requirement for optimal activity of mouse CD4+ regulatory T cells, *FASEB J.* 18 (2004) 1043–1045.
- [27] V. Guyot-Revol, J.A. Innes, S. Hackforth, T. Hinks, A. Lalvani, Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173 (2006) 803–810.
- [28] K.H. Mills, Regulatory T cells: friends or foe in immunity to infection? *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 841–855.
- [29] M. Kursar, M. Koch, H.W. Mittrucker, G. Nouailles, K. Bonhagen, T. Kamradt, S.H.E. Kaufmann, Cutting edge: regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Immunol.* 178 (2007) 2661–2665.
- [30] T. Roberts, N. Beyers, A. Aguirre, G. Walzl, Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon-gamma production and CD25 expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor-beta, and interleukin-4 mRNA levels, *J. Infect. Dis.* 195 (2007) 870–878.
- [31] G. Tully, C. Kortsik, H. Hohn, I. Zehbe, W.E. Hitzler, C. Neukirch, K. Freitag, K. Kayser, M.J. Maeurer, Highly focused T cell responses in latent human pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection, *J. Immunol.* 174 (2005) 2174–2184.
- [32] T.M. Doherty, G. Rook, Progress and hindrances in tuberculosis vaccine development, *Lancet* 367 (2006) 947–949.



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



[www.elsevier.com/locate/yclim](http://www.elsevier.com/locate/yclim)



## RAPID COMMUNICATION

# Lysophosphatidic acid enhances antimycobacterial activity both in vitro and ex vivo

S.K. Garg<sup>a,b</sup>, E. Valente<sup>a</sup>, E. Greco<sup>a</sup>, M.B. Santucci<sup>a</sup>, M. De Spirito<sup>c</sup>, M. Papi<sup>c</sup>, M. Bocchino<sup>d,e</sup>, C. Saltini<sup>d,f</sup>, M. Fraziano<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Biology, University of Rome “Tor Vergata”, Via della Ricerca Scientifica-00133, Rome, Italy

<sup>b</sup>Department of Biochemistry, University of Nebraska, Lincoln, NE 68588, USA

<sup>c</sup>Institute of Physics, Catholic University of S. Hearth, Rome, Italy

<sup>d</sup>Division of Respiratory Medicine of the University of Rome “Tor Vergata” at the INMI “L. Spallanzani-IRCCS”, Rome, Italy

<sup>e</sup>Department of Clinical and Experimental Medicine, School of Biotechnology, University of Naples “Federico II”, Naples, Italy

<sup>f</sup>Department of Internal Medicine, University of Rome “Tor Vergata”, Rome, Italy

Received 31 March 2006; accepted with revision 8 June 2006

Available online 27 July 2006

### KEYWORDS

*Mycobacterium tuberculosis*;  
Lysophosphatidic acid;  
Macrophage;  
Innate immunity

**Abstract** Lysophosphatidic acid (LPA) is a polar lipid metabolite which is involved in a wide range of biological processes, including cell proliferation and migration, wound healing, and increase of endothelial permeability. The present study reports evidences showing that LPA is able to enhance the antimicrobial activity of human macrophages and of bronchoalveolar lavage cells from tuberculosis patients leading to intracellular growth control of *Mycobacterium tuberculosis*. Such antimicrobial activity is mediated by the activation of phospholipase D which in turn induces acidification of *M. tuberculosis* containing phagosomes and is associated with the enhanced expression of Cathepsin D. These results suggest the possible protective role of this lysophospholipid in the activation of innate antimycobacterial response.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the most dramatic pathologies in developing countries due to a single pathogen infection [1] and is responsible for about 2 million deaths each year. The

dramatically increasing incidence of antibiotic resistant MTB strains has compromised both the treatment and prevention of this global disease [2]. One of the puzzling aspects of tuberculosis is that although one third of world population is infected, fewer than 10% of them develop into active disease during the first few years following exposure [3], suggesting that components of natural immune response may play an important role in the protection [4]. Thus, the understanding of the mechanisms

\* Corresponding author. Fax: +39 6 72594224.  
E-mail address: [fraziano@bio.uniroma2.it](mailto:fraziano@bio.uniroma2.it) (M. Fraziano).



that promote an efficient natural immunity to tuberculosis appears to be fundamental for the development of novel therapeutic approaches.

Lysophosphatidic acid (LPA) is the smallest and structurally simplest of all glycerophospholipids. It is involved in a wide spectrum of biological processes through binding to and activation of several specific receptors coupled to G proteins [5]. Extracellularly, LPA is likely to be generated by the phospholipases A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> mediating deacylation of phosphatidic acid and, additionally, by lysophospholipase D that hydrolyzes lysophosphatidylcholine to LPA [6]. It may be released by activated platelets and fibroblasts [5] and is a major monocyte survival factor in the serum where it reaches the concentration of 2–20 μM and is complexed to albumin, while retaining its biological activity [7]. LPA binds to G-protein-coupled receptors called Endothelial Differentiation Gene (EDG) receptors which are distributed on nearly all cell types [6]. EDG receptors are a family of receptors known to bind sphingosine 1-phosphate (EDG-1, -3, -5, -6, -8) and LPA (EDG-2, -4, -7) and share many signal transduction pathways [8]. To this regard, sphingosine 1-phosphate (S1P) has been recently shown to induce in vitro antimycobacterial activity by phospholipase D (PLD) activation and phagolysosome maturation and to reduce pulmonary mycobacterial burden and lung immunopathology in a murine model of infection [9]. On these grounds, we wondered whether LPA, a structurally analogue lysophospholipid, retain the same property and if, most importantly, it is able to enhance antimycobacterial activity in broncho-alveolar lavage (BAL) cells coming from tuberculosis patients. Results reported herein demonstrated that LPA reduces intracellular mycobacterial growth in monocyte-derived macrophages, in differentiated THP1 monocytoïd cell line and in BAL cells. Finally, the antimycobacterial activity is mediated by the activation of phospholipase D which in turn induces acidification of MTB-containing phagosomes and is associated with the enhanced expression of cathepsin D.

## Materials and methods

### Bacteria

Pathogenic *M. tuberculosis* (MTB) H37Rv was grown in Middle brook 7H9 broth supplemented with albumin dextrose catalase. Mycobacteria were then harvested, suspended in sterile phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, aliquoted and stored at –80°C until use. Before infection, aliquots of both strains were grown on 7H10 plates to titer the bacteria after thawing.

### Preparation of macrophages and differentiation of THP-1 cells

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from human buffy coat blood preparations and monocytes were separated as previously described [9]. In order to get monocyte-derived macrophages, cells were then suspended in complete medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine and 5 μg/ml Gentamicin) and then incubated for further 6 days in 24-well plates at the

concentration of 10<sup>6</sup> cells/ml. Human promonocytic THP-1 leukemia cell line, induced to differentiate, was also used because of its similarity with alveolar macrophages [10]. In particular, cells were grown in complete medium further supplemented with 1 mM nonessential aminoacids and 1 mM sodium piruvate, and incubated for 72 h at 37°C in presence of 20 ng/ml Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA). Human MDMs or differentiated THP-1 (dTHP1) cells were then washed and reconstituted in complete medium, before use in experiments.

### Infection and evaluation of mycobacterial growth after in vitro infection

Differentiated THP1 (dTHP1) cells were infected for 3 h with MTB at the MOI (multiplicity of infection) of 1. As the levels of lysophosphatidic acid (LPA) in biological fluids may reach the concentration of 1–5 μM [11], after removal of nonphagocytosed bacilli, cells were stimulated with LPA (Calbiochem, San Diego, CA) at the concentration of 0.05, 0.5 and 5 μM. In order to assess the role of macrophage phospholipase D (PLD) activity in LPA-induced mycobacterial growth control, MTB-infected dTHP1 cells were incubated with 5 μM LPA together with 0.3% ethanol. To this regard, short chain primary alcohols, such as ethanol, inhibit PLD-dependent phosphatidic acid (PA) generation and induce the formation of the metabolically inactive phosphatidylethanol (PetOH) by substituting for water as the nucleophilic acceptor of the phosphatidyl moiety [12]. In some experiments, the role of PLD activity in the intracellular mycobacterial growth control was also analyzed by adding 5 μM phosphatidic acid (PA, by Calbiochem, San Diego, CA) to MTB infected cells. CFU assay was performed as previously described [9]. Briefly, at the indicated time points after infection and LPA or PA stimulation, cells were lysed using ice-cold sterile PBS containing 0.1% Saponin (Sigma, St. Louis, MO), serially diluted in PBS containing 0.01% Tween-80 (Merck, Germany) and plated in triplicate on Middle brook 7H10 agar (Becton Dickinson, MD). MTB colonies were enumerated after incubation of the plates at 37°C in humidified air for 21 days. Any modification on macrophage viability or direct effect of LPA on MTB viability was not detected in all experimental conditions used (data not shown).

### Quantification of intracellular endogenous mycobacteria in bronchoalveolar lavage cells from tuberculosis patients

The assay was carried out on bronchoalveolar lavage (BAL) cells coming from four subjects with culture-confirmed pulmonary tuberculosis enrolled before the initiation of antimycobacterial treatment (age 34.5 ± 11.7, 3 males, 3 Caucasians). Bronchoalveolar lavage was carried out as previously described [13]. All patients gave informed consent under a study protocol approved by the INMI Lazzaro Spallanzani IRCCS Ethics Committee. Briefly, BAL cells were suspended as 10<sup>6</sup> cells/ml in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2 mM L-Glu, 1 mM non essential aminoacids, 1 mM sodium piruvate, 5 μg/ml Ampicillin and 2 μg/ml Fluconazole (all

by Invitrogen, Milan, Italy). Finally,  $3 \pm 10^6$  cells per well were incubated for 48 h in 6-well plates in the presence or absence of  $5 \mu\text{M}$  LPA and analyzed at the time indicated by colony forming unit assays, as previously described [9]. Any modification, in terms of cell viability, was not detected in the course of in vitro LPA stimulation of BAL cells (data not shown).

### Analysis of PLD activity

Differentiated THP1 cells were stimulated for 18 h with  $5 \mu\text{M}$  LPA. Cells were harvested and tested for PLD activity using Amplex Red Phospholipase D assay kit following manufacturer's instructions (Molecular Probes, Eugene, OR).

### Confocal microscopy

The degree of maturation of MTB-containing phagosome was assessed by analyzing the colocalization of bacilli with lysosomes after staining mycobacteria with auramine and lysosomes with the acidophilic dye LysoTracker Red (Molecular Probes, NL). Differentiated THP1 cells, suspended in complete medium, were incubated with LysoTracker Red at a 1:10,000 dilution for 2 h at  $37^\circ\text{C}$ . Unincorporated dye was removed and cells were infected for 3 h with MTB. After removal of nonphagocytosed bacilli, LysoTracker Red was added again to each well for 30 min. Cells were washed and further incubated for 18 h with  $5 \mu\text{M}$  LPA in presence or absence of 0.3% ethanol. Thereafter, cells were washed with PBS, fixed by 10-min incubation with 4% paraformaldehyde at  $4^\circ\text{C}$  and permeabilized with ice-cold methanol-acetone (1:1) followed by further three washings with PBS. Cells were then seeded on poly-L-lysine (Sigma, MO) pretreated slides (VWR International Merck Eurolab, FR). The localization of MTB was determined by incubating infected monolayer with Auramine (Becton Dickinson, MD) for 20 min at room temperature, followed by 3-min incubation in 0.5% acid alcohol and repeated washing with PBS. Finally, cover slips were mounted with Vectashield mounting medium H-1000 (Vector laboratories, CA) and edges were sealed with nail polish. Confocal fluorescence microscopy was performed by using a Leica Laser system linked to a Leica inverted microscope (TCS SP2). An argon-krypton laser ( $\lambda=488 \text{ nm}$ ) and a helium-neon laser ( $\lambda=543 \text{ nm}$ ) were used in combination with a 515–525 nm and 585–595 nm emission band pass filter for detection of Auramine and LysoTracker Red fluorescence, respectively.

### Western blotting

Expression of Cathepsin D was measured by Western blotting analysis as previously described [9]. In brief, dTHP1 cells, cultured in complete medium, were stimulated or not with  $5 \mu\text{M}$  LPA in the presence or absence of 0.3% ethanol at  $37^\circ\text{C}$ . At 24 h post-stimulation, cells were suspended in lysis buffer [100 mM Tris/HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P40, 0.1% SDS, 2000 i.u./ml aprotinin, 1 mM PMSF, 100  $\mu\text{M}$  leupeptin, 50  $\mu\text{M}$  pepstatin A, 10 mg/ml IAA]. 10  $\mu\text{g}$  total protein were

separated onto SDS-PAGE (12% (w/v) gel) and transferred to nitrocellulose membrane. Filters were then incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with mouse antihuman cathepsin D monoclonal antibody (BD transduction laboratories, MA) and for further 2 h with HRP conjugated goat antimouse (Bio-Rad). The signal was developed by using ECL substrate for HRP and exposed to CL-Xposure film (Pierce, UK).

### Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by Graphpad Prism 3.0 software package. Student's *t* test was used to compare differences between means.

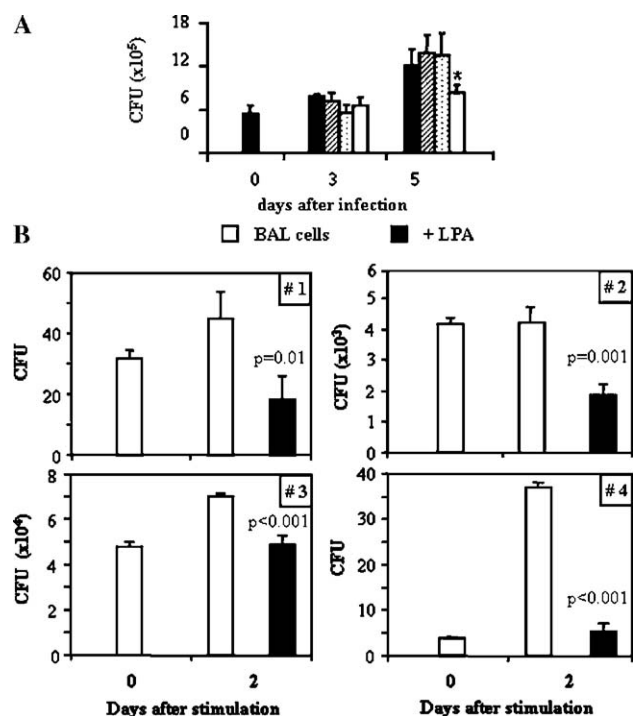
## Results

### LPA reduces in vitro and ex vivo intracellular growth of *M. tuberculosis*

In order to assess whether LPA is able to increase antimicrobial activity in monocyte derived macrophages, cells were infected with *M. tuberculosis* and mycobacterial viability was monitored by CFU assay at 0, 3 and 5 days after stimulation with different amount of LPA. Result expressed in panel A of Fig. 1 shows a significant reduction of intracellular mycobacteria in macrophages stimulated with  $5 \mu\text{M}$  LPA at day 5 after infection. The possibility that LPA might effectively increase in vivo mycobacterial killing by alveolar macrophages from tuberculosis patients has been then examined. To this end, bronchoalveolar lavage cells already harboring MTB from four tuberculosis patients were cultured and intracellular growth of mycobacteria after 48 h from in vitro stimulation with  $5 \mu\text{M}$  LPA was monitored. As shown in panel B of Fig. 1, a significant reduction of intracellular colony forming units after LPA stimulation was detected in bronchoalveolar lavage cells from all patients tested.

### LPA-induced antimycobacterial activity is mediated by host phospholipase D activity

As human macrophage PLD has been reported to be involved (i) in molecular pathway leading to the activation of antimicrobial mechanisms [14] and, (ii) in S1P-induced intracellular mycobacterial killing [9], PLD activity after 18 h from LPA stimulation was tested by fluorimetric assay. Fig. 2A shows a significant increase of enzymatic activity in comparison with untreated cells ( $p=0.007$ ). PLD involvement in LPA-induced antimycobacterial activity was then investigated either by adding LPA together with ethanol which inhibits PLD-mediated phosphatidic acid (PA) production and promotes the formation of the metabolically inactive phosphatidylethanol (PetOH), or by stimulating differentiated THP1 cells directly with phosphatidic acid. Results expressed in panel B of Fig. 2 show that ethanol addition restores intracellular growth to the same levels as control and that PA stimulation shows LPA comparable effect on intracellular mycobacterial killing. As macrophage PLD is involved in phagolysosome biogenesis [9], and



**Figure 1** LPA induces antimycobacterial activity in MTB infected monocyte derived macrophages from healthy donors and in bronchoalveolar lavage cells coming from tuberculosis patients. (Panel A) Monocyte derived macrophages were infected (black column) and then stimulated or not with 0.05 (dashed column), 0.5 (dotted column), 5  $\mu$ M (white column) for 0, 3 and 5 days. Colony forming unit (CFU) results were shown as means  $\pm$  SD of triplicate values. Data are representative of three different experiments. \* $p=0.03$  in comparison with untreated cells. (Panel B) Colony forming unit assay was performed on BAL cells before the addition and 48 h after LPA stimulation as indicated in the methods. Data are expressed as means  $\pm$  SD of the CFU performed in triplicates. Differences between LPA treated (black column) and not treated (white column) BAL cells were analyzed by Student's  $t$  test and  $p$  values indicated in each quadrant.

MTB is known to reside in nonacidified vacuoles sequestered away from late endosomal compartments, the acidification of MTB-containing phagosomes in LPA-stimulated cells was investigated by confocal fluorescent microscopy (Fig. 2, panel C). In absence of LPA, phagocytosed MTB bacilli appeared green, indicating their presence in nonacidic vesicles. In contrast, LPA treatment induces a significant increase in the acidification of MTB-containing phagosomes, which appeared yellow, indicating the colocalization of green bacilli in acidified red phagosomes. The addition of ethanol together with LPA, if not completely, strongly reversed such process. The percentage of MTB residing in acidic phagosomes over total intracellular mycobacteria was expressed after serial observations (Fig. 2, panel D). As hydrolases are important molecular components of lysosome associated antimicrobial machinery, the expression and the maturation of cathepsin D has been monitored following LPA stimulation. Results (panel E) show that LPA stimulation enhances the expression of both 52 kDa immature and 31 kDa mature forms of Cathepsin D.

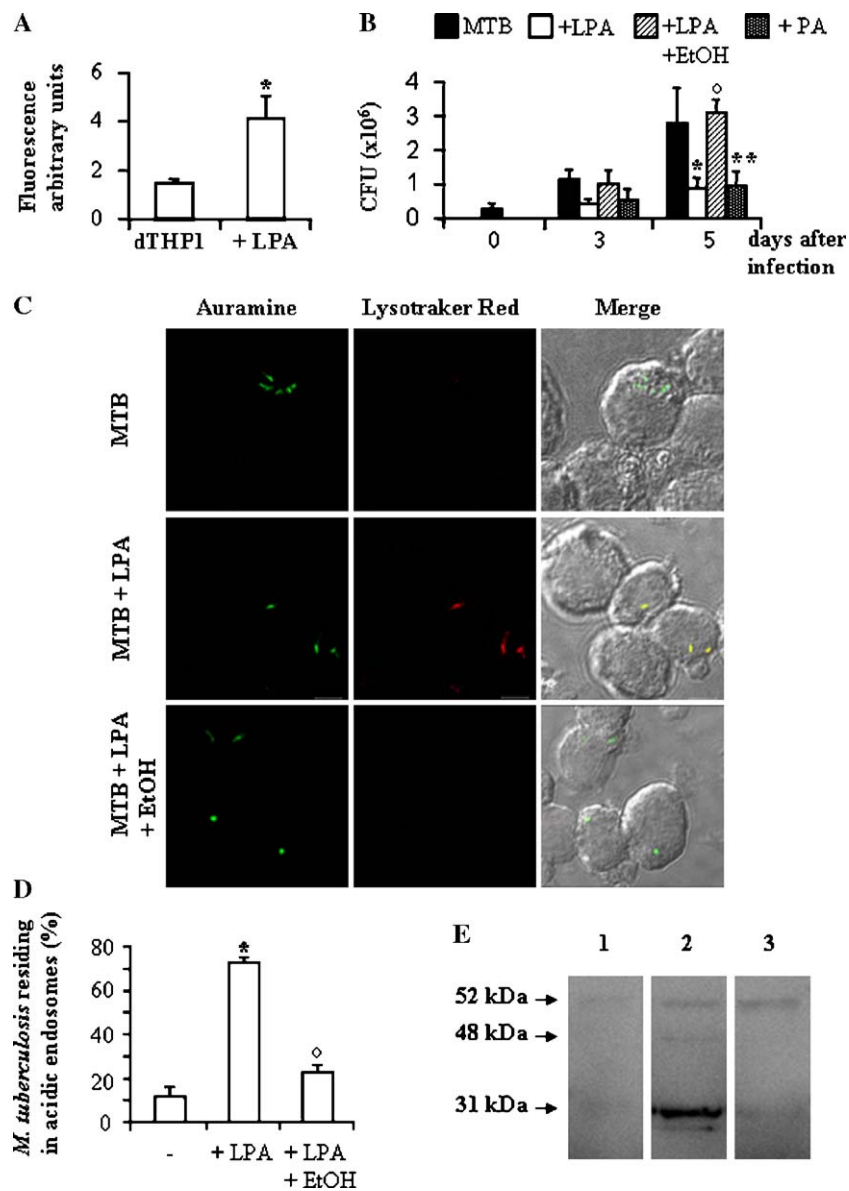
Finally, maturation to 31 kDa form was almost completely inhibited by the addition of ethanol, suggesting a PLD role in such process.

## Discussion

The present study shows that Lyso-phosphatidic acid is able to induce antimycobacterial activity in human macrophages. This activity is mediated by host PLD which promotes intracellular mycobacterial killing by favoring phagolysosome maturation. The identification of PLD as a key molecule involved in LPA-induced antimycobacterial molecular pathway derives the following evidences: (i) LPA stimulation induces PLD activity; (ii) the inhibition of PLD-dependent generation of PA by ethanol restores intracellular mycobacterial growth by avoiding phagolysosome maturation; (iii) the direct addition of phosphatidic acid to MTB infected macrophages mimics the mycobactericidal effect of LPA. Phosphatidic acid has been demonstrated to mediate phagolysosomal maturation in different experimental models of intracellular mycobacterial killing, including the stimulation with ATP [15], CpG ODN [14], and S1P [9]. The mechanism through which PLD may regulate membrane trafficking events can involve (i) direct mechanisms, by altering membrane shape and/or binding proteins, (ii) indirect mechanisms, by stimulating or inhibiting signal transduction pathways through phosphatidic acid release, and (iii) a combination of both [16]. In this context, phagolysosome biogenesis has been hypothesized to be a "kiss-and-run" process through which phagosomes undergo only a transient and partial fusion with endocytic organelles which allows the transfer of selected membranes and luminal contents between the phagosome and the endosome [17,18]. Moreover, results reported herein show that LPA can enhance expression and maturation of cathepsin D. Interestingly, maturation appears to be controlled by PLD activity as the addition of ethanol almost completely inhibits the formation of mature 31 kDa form. As PLD is known to regulate intracellular vesicular trafficking [19], this result can be explained by the fact that cathepsin D maturation is dependent by the presence of lysosomal acid pH [20] and hence requires the direct fusion between endosomes from biosynthetic pathway and lysosomes.

Recently, we have reported that S1P, a structurally LPA analogue phospholipid, enhances antimycobacterial activity both in vitro in human macrophages and in vivo in the course of murine tuberculosis [9]. LPA, like S1P, binds to a family of receptors called EDG receptors, being S1P agonist for EDG-1, -3, -5, -6 and -8 and LPA agonist for EDG-2, -4, and -7 [8]. On the basis of the results reported herein, EDG receptors may represent a novel class of receptors able to activate antimicrobial pathways in innate immune cells. These receptors are largely expressed in many tissues and cell types [8]. Interestingly, human alveolar macrophages express virtually all LPA receptors [21] and lyso-phospholipids are elevated in extracellular fluids of inflamed tissues [22], suggesting that these cells can be susceptible to the extracellular stimulation by LPA, particularly in the course of inflam-





**Figure 2** LPA-induced antimycobacterial activity is mediated by phospholipase D activity and is associated with increase of Cathepsin D expression. (Panel A) Phospholipase D activity was monitored by “Amplex Red Phospholipase D detection kit” on differentiated THP1 stimulated or not with LPA for 18 h. Fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 542 nm and an emission wavelength of 590 nm. Values are shown as means  $\pm$  S.D of three independent experiments. \* $p=0.007$  as compared with control cells. (Panel B) Differentiated THP1 cells were infected with MTB at the MOI of 1 and incubated for 0, 3 and 5 days with LPA (white bar), LPA plus Ethanol (dashed bar) or Phosphatidic Acid (dotted bar). CFU are expressed as means  $\pm$  SD of the triplicate values and are representative of three separate experiments. \* $p=0.008$ , \*\* $p=0.02$ , <sup>o</sup> $p=n.s$  in comparison with MTB infected dTHP1 cells (black filled bar). (Panel C) Representative picture from three separate experiments shows the increase of green MTB residing in red acidic vacuoles after LPA treatment and the reverse effect exerted by ethanol. (Panel D) Summary of the mean percentage  $\pm$  SD of MTB-colocalizing in acidic phagosomes, determined by counting over 100 bacilli from at least 60 macrophages per sample. Three different experiments were assessed. \* $p<0.001$ , <sup>o</sup> $p=0.01$  in comparison with MTB infected dTHP1 cells. (Panel E) Expression of cathepsin D in control (lane 1), LPA-treated (lane 2), LPA+ethanol treated (lane 3) dTHP1 cells at 24 h post-stimulation.

matory chronic infectious disease like tuberculosis. To this regard, the results reported herein showing that LPA can activate bronchoalveolar lavage cells enabling them to control intracellular mycobacterial growth, are relevant because are obtained on cells chronically infected with endogenous mycobacteria and in a cellular environment reflecting that of deep lung in the course of active disease. On these grounds, a protective value of lysopho-

spholipids and, possibly, of their receptors can be hypothesized and further exploited in order to potentiate antimycobacterial innate immune response.

### Additional data

LPA-induced antimycobacterial activity is mediated by phospholipase D activity. Differentiated THP1 cells were

infected with MTB at the MOI of 1 and incubated for 0, 1, 3 and 5 days with LPA, LPA plus 0.3% 1-butanol or 0.3% 2-butanol. CFU are expressed as means  $\pm$  SD of the triplicate values and are representative of three separate experiments.

## Acknowledgments

The present study was financially supported by the Italian Ministry of Health (Grant 4AD/F9) and by the Italian Ministry of University (COFIN 2004, FIRB 2001). G.S.K. was financially supported by a UNESCO-ROSTE study fellowship.

## References

- [1] E.L. Corbett, J.C. Watt, N. Walker, D. Maher, B.G. Williams, M.C. Raviglione, C. Dye, The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic, *Arch. Intern. Med.* 163 (2003) 1009-1021.
- [2] A. Pablos-Mendez, M.C. Raviglione, A. Laszlo, et al., Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994–1997. World Health Organization–International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance, *N. Engl. J. Med.* 338 (1998) 1641-1649.
- [3] I. Kramnik, W.F. Dietrich, P. Demant, B.R. Bloom, Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 8560-8565.
- [4] R.J. North, Y.J. Jung, Immunity to tuberculosis, *Annu. Rev. Immunol.* 22 (2004) 599-623.
- [5] W.H. Moolenaar, Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors, *Exp. Cell Res.* 253 (1999) 230-238.
- [6] B. Anliker, J. Chun, Cell surface receptors in lysophospholipid signalling, *Semin. Cell. Dev. Biol.* 15 (2004) 457-465.
- [7] J.S. Koh, W. Lieberthal, S. Heydrick, J.S. Levine, Lysophosphatidic acid is a major serum noncytokine survival factor for murine macrophages which acts via the phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway, *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 716-727.
- [8] I. Ishii, N. Fukushima, X. Ye, J. Chun, Lysophospholipid receptors: signalling and biology, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 321-354.
- [9] S.K. Garg, E. Volpe, G. Palmieri, M. Mattei, D. Galati, A. Martino, E. Bonanno, P. De Vito, P.M. Baldini, L.G. Spagnoli, V. Colizzi, M. Fraziano, Sphingosine 1-phosphate induces antimicrobial activity both in vitro and in vivo, *J. Infect. Dis.* 189 (2004) 2129-2138.
- [10] C.J. Riendeau, H. Kornfeld, THP-1 cell apoptosis in response to mycobacterial infection, *Infect. Immun.* 71 (2003) 254-259.
- [11] T. Eichholtz, K. Jalink, I. Fahrenfort, W.H. Moolenaar, The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets, *Biochem. J.* 291 (1993) 677-680.
- [12] M. Liscovitch, M. Czarny, G. Fiucci, X. Tang, Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family, *Biochem. J.* 345 (2000) 401-415.
- [13] M.B. Santucci, M. Bocchino, V. Colizzi, C. Saltini, M. Fraziano, Expansion of CCR5+ CD4+ T lymphocytes in the course of active pulmonary tuberculosis, *Eur. Respir. J.* 24 (2004) 638-643.
- [14] G. Auricchio, S.K. Garg, A. Martino, E. Volpe, A. Ciaramella, P. De Vito, P.M. Baldini, V. Colizzi, M. Fraziano, Role of macrophage phospholipase D in natural and CpG-induced antimycobacterial activity, *Cell. Microbiol.* 5 (2003) 913-920.
- [15] D.J. Kusner, J. Adams, ATP-induced killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase D, *J. Immunol.* 164 (2000) 379-388.
- [16] W.J. Brown, K. Chambers, A. Doody, Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function, *Traffic* 4 (2003) 214-221.
- [17] M. Desjardins, L.A. Huber, R.G. Parton, G. Griffiths, Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus, *J. Cell Biol.* 124 (1994) 677-688.
- [18] M. Desjardins, Biogenesis of phagolysosome: the “kiss and run” hypothesis, *Trends Cell Biol.* 5 (1995) 183-186.
- [19] M.G. Roth, P.C. Sternweis, The role of lipid signaling in constitutive membrane traffic, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (1997) 519-526.
- [20] G.R. Richo, G.E. Comer, Structural requirements of procathepsin D activation and maturation, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 14806-14812.
- [21] C. Hornuss, R. Hammermann, M. Fuhrmann, U.R. Juergens, K. Racke, Human and rat alveolar macrophages express multiple EDG receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 429 (2001) 303-308.
- [22] E.J. Goetzl, S. An, Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate, *FASEB J.* 12 (1998) 1589-1598.

## CpG oligodeoxynucleotides induce $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phospholipase D activity leading to phagolysosome maturation and intracellular mycobacterial growth inhibition in monocytes

Emanuela Greco <sup>a</sup>, Marco De Spirito <sup>b</sup>, Massimiliano Papi <sup>b</sup>, Marco Fossati <sup>a</sup>,  
Giovanni Auricchio <sup>a</sup>, Maurizio Fraziano <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy

<sup>b</sup> Institute of Physics, Catholic University of S. Hearth, Rome, Italy

Received 16 June 2006

Available online 18 July 2006

### Abstract

Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG ODN) have been reported to induce antimycobacterial activity both *in vitro* and *in vivo*. The present study analyzes the signals leading to CpG ODN-induced antimicrobial activity in monocytes. In this context, CpG, but not GpC, ODN induced cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  influx of extracellular origin which, in turn, activated host phospholipase D (PLD). The production of CpG-induced PLD-dependent phosphatidic acid induced the maturation of phagolysosomes and intracellular mycobacterial growth inhibition. These results show the presence of an antimicrobial pathway in monocytes, mediated by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent PLD which can be useful for the exploitation of novel anti-tuberculosis immunotherapy approaches.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Mycobacterium; Monocytes/macrophages; Tuberculosis; Lipid mediators; Phagolysosome

Many distinct signal transduction pathways contribute to the activation of phagocyte antimicrobial defenses. Stimulation-induced increases in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration are essential for activation of the phagocyte respiratory burst, production of nitric oxide, secretion of microbicidal granule constituents, and synthesis of proinflammatory mediators, including  $\text{TNF-}\alpha$  [1–5]. Moreover, a rapidly expanding body of evidence shows that phospholipases, such as phospholipase D (PLD), play an integral role in the induction of intracellular antimycobacterial activity by generating essential second messengers. PLD catalyzes hydrolysis of the terminal diester bond of phosphatidylcholine as a preferential substrate, to generate phosphatidic acid (PA) and choline [6,7]. PA is involved in the induction of a number of macrophage antimicrobial activities, such as phagocytosis [8], ROI production [9],

intracellular trafficking of endocytosed immunocomplexes to lysosomes [10], and phagolysosome maturation in the course of intracellular mycobacterial killing induced by ATP [11] or sphingosine 1-phosphate [12]. PLD activity can be regulated by protein kinase C, Rho family small G proteins, protein tyrosine kinases, and  $\text{Ca}^{2+}$  [13]. In particular, it has been reported that treatment with  $\text{Ca}^{2+}$  chelators may result in inhibition of the activation of PLD by several agonists and that  $\text{Ca}^{2+}$  ionophores can activate PLD in many cell types [7].

Bacterial DNA, in comparison with mammalian DNA, contains a higher proportion of unmethylated CpG dinucleotide motifs. These motifs are believed to be the primary source of its immunogenicity [14]. Synthetic oligodeoxynucleotides (ODN) containing unmethylated CpG dinucleotides (CpG ODN) are capable of mimicking the immunostimulatory effects of bacterial DNA on B cells, monocytes/macrophages, NK cells, and dendritic cells, and can induce them to secrete proinflammatory

\* Corresponding author. Fax: 39 06 72594224.

E-mail address: [Fraziano@bio.uniroma2.it](mailto:Fraziano@bio.uniroma2.it) (M. Fraziano).

cytokines including interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-12, IL-18, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [15]. Moreover, systemic administration of CpG ODN promotes type-1 immune responses characterized by enhanced IL-12 and IFN- $\gamma$  production [16,17]. CpG ODN have also been successfully used as adjuvant against a range of intracellular pathogens and they have been described to increase antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* [18], *Leishmania major* [19], *Mycobacterium avium* [20], and *Mycobacterium tuberculosis* [21]. In this context, CpG ODN have been shown to induce a number of antimicrobial effector mechanisms such as nitric oxide (NO) production [22] and reactive oxygen intermediates (ROI) generation [23]. Finally, we have recently reported that CpG ODN-induced intracellular mycobacterial killing in human macrophages was nitric oxide independent and, at least in part, mediated by host PLD [24]. However, whether and how CpG ODN induce antimycobacterial activity in human monocytes is a still uninvestigated issue. The results reported herein show that CpG ODN induce PLD activation which is dependent on the increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> influx. Moreover, PLD-dependent generation of phosphatidic acid promotes phagolysosome maturation and intracellular mycobacterial killing.

## Materials and methods

**Cell culture and infection of monocytoid THP-1 cells.** Human monocytoid THP-1 leukemia cell line was used as a model of human monocytes. Cells were grown in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, gentamicin 5  $\mu$ g/ml, 1 mM non-essential aminoacids, and 1 mM sodium pyruvate. Infection was carried out by exposing cells for 3 h to MTB at the MOI (multiplicity of infection) of 1. After removal of non-phagocytosed bacilli, cells were stimulated for 0, 3, and 7 days with 1  $\mu$ M of either phosphorothioate CpG or GpC oligodeoxynucleotides (ODN) (ATC GAC TCT CGA GCG TTC TC and ATG CAC TCT GCA GGC TTC TC, respectively; Primm, Italy), or 1  $\mu$ M phosphatidic acid. In some experiments, in order to evaluate the role of PLD activity in CpG ODN-induced mycobacterial growth inhibition, CpG ODN was added together with 0.3% ethanol, 1-butanol (used at the concentration of 0.3%, 0.03% or 0.003%) or 0.3% 2-butanol. Any modification, in terms of macrophage viability, was not detected in all experimental conditions used (data not shown).

**Intracellular Ca<sup>2+</sup> measurement.** Intracellular Ca<sup>2+</sup> was measured by using the fluorescent intracellular Ca<sup>2+</sup> indicator Fluo-3/AM (Molecular Probes, NL). THP-1 cells were washed twice with complete medium and incubated with 3  $\mu$ M Fluo-3/AM at 37 °C for 1 h in the dark. Cells were collected, centrifuged, suspended in complete medium, and stimulated with either 1  $\mu$ M CpG or GpC ODN. Fluo-3 fluorescence was followed by a Varian Cary Eclipse fluorometer, with excitation and emission wavelengths of 505 and 530 nm, respectively, using 5 nm slits for both light paths. Minimum and maximum fluorescence were determined on complete medium only or on THP1 cells stimulated with 50 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA). In some experiments, 2 mM EDTA or 3 mM EGTA (Calbiochem, San Diego, CA) was added 15 min before CpG ODN addition.

**Analysis of phospholipase D activity.** Monocyte phospholipase D (PLD) activity was measured by the transphosphatidyl transfer assay [12,24]. Briefly, 24-well plate-cultured THP1 cells were suspended in complete medium supplemented with 20 mM Hepes (pH 7.4) and

labeled with 1  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H]myristic acid (Amersham International, UK) for 120 min at 37 °C, followed by washing with RPMI 1640 to remove unincorporated radioactivity. Thereafter, cells were incubated for 15 min at 37 °C in complete medium with 1% ethanol to allow detection of [<sup>3</sup>H]PetOH, as a specific transphosphatidyl transfer reaction product of PLD. THP-1 cells were then stimulated with 1  $\mu$ M CpG ODN for 30 min. Finally, the incubation was stopped with 1 ml ice-cold methanol and lipids were extracted and separated by thin layer chromatography (TLC) in an ethyl acetate/isooctane/acetic acid/water (130:20:30) solvent system, as previously described [12,24]. Areas containing [<sup>3</sup>H]PetOH were collected from silica gel plate as compared by standard PetOH and quantified by liquid scintillation counter. The radioactivity present in PetOH fraction was expressed as the percentage of the total radioactivity collected from the lane. In order to evaluate the role of extracellular Ca<sup>2+</sup> in PLD activity, 2 mM EDTA was added to the cell cultures 10 min before ethanol labeling and CpG ODN stimulation. Phospholipase D activity was also evaluated at the same experimental conditions by “Amplex Red Phospholipase D assay kit” used according to the manufacturer’s instructions.

**Confocal fluorescent microscopy.** The degree of maturation of MTB-containing phagosome was assessed by analyzing the colocalization of bacilli with lysosomes after staining mycobacteria with auramine and lysosomes with either the acidophilic dye LysoTracker Red (Molecular Probes, NL) or anti-LAMP-1 monoclonal antibody. THP1 cells, suspended in complete medium, were incubated with LysoTracker Red at a 1:10,000 dilution for 2 h at 37 °C. Unincorporated dye was removed and cells were infected for 3 h with MTB. After removal of non-phagocytosed bacilli, LysoTracker Red was added again to each well for 30 min. Cells were washed and further incubated for 16–18 h with 1  $\mu$ M CpG ODN in presence or absence of 0.3% ethanol. Thereafter, cells were washed with PBS, fixed by 10 min incubation with 4% paraformaldehyde at 4 °C and permeabilized with ice-cold methanol-acetone (1:1) followed by further three washings with PBS. Detection of the lysosomal protein markers LAMP-1 was accomplished by incubating cells with anti-lysosomal associated membrane protein (LAMP)-1 monoclonal antibody (IgG2b, clone 25, Transduction Laboratories, Becton–Dickinson, MD) for 1 h, repeated washings, and incubation with TRITC-conjugated secondary anti-IgG monoclonal antibody (SIGMA, MO) for further 1 h. Cells were then seeded on poly-L-lysine (Sigma, MO) pretreated slides. The localization of MTB was determined by incubating infected monolayer with Auramine (Becton–Dickinson, MD) for 20 min at room temperature, followed by 3 min incubation in 0.5% acid alcohol and repeated washing with PBS. Finally, coverslips were mounted with Vectashield mounting medium H-1000 (Vector laboratories, CA) and edges were sealed with nail polish. Confocal fluorescence microscopy was performed by using a Leica Laser system linked to a Leica inverted microscope (TCS SP2). An argon–krypton laser ( $\lambda$  = 488 nm) and a helium–neon laser ( $\lambda$  = 543 nm) were used in combination with a 505–530 nm, 580–600 nm, and 560–600 emission band pass filter for detection of Auramine, LysoTracker Red, and TRITC fluorescence, respectively.

**Bacteria and colony forming unit assay.** Pathogenic *M. tuberculosis* (MTB) H37Rv strain was grown in Middle brook 7H9 (Becton–Dickinson, MD) broth supplemented with albumin dextrose catalase. Mycobacteria were then harvested, suspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, aliquoted, and stored at –80 °C until use. Before infection, aliquots were grown on 7H10 agar (Becton–Dickinson, MD) plates to titer the bacteria after thawing. Colony forming unit assay was performed as previously described [12]. Briefly, at the indicated time points after infection and stimulations, cells were lysed by using ice-cold sterile PBS containing 0.1% saponin, serially diluted in PBS containing 0.01% Tween 80 and plated in triplicate on Middle brook 7H10 agar. MTB colonies were enumerated after incubation of the plates at 37 °C in humidified air for 21 days.

**Statistics.** Statistical analysis was carried out by Graphpad Prism 3.0 software package. Student’s *t* test was used to compare differences between means.



## Results

### *CpG ODN induce Ca<sup>2+</sup>-dependent PLD activity in human monocytes*

Circulating undifferentiated monocytes represent both one of the preferential targets of MTB infection and a pool of inflammatory cells with potential antimycobacterial activity [25]. Different signal transduction pathways may participate in the activation of monocyte CpG ODN-induced antimicrobial activity. As it has been previously reported that both Ca<sup>2+</sup> mobilization can represent important upstream signalling leading to the activation of antimicrobial effector mechanisms [26], we have analyzed cytosolic Ca<sup>2+</sup> influx following CpG ODN stimulation in monocytoid cell line THP1. Results showed a significant increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> following stimulation with CpG ODN whereas no effect was observed after stimulation by GpC ODN (Fig. 1). Moreover, increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> was of extracellular origin as the simultaneous treatment with either EDTA or EGTA, which chelates extracellular Ca<sup>2+</sup>, and make it unavailable for intracellular stores, completely inhibited CpG ODN-induced increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> (Fig. 1). As Ca<sup>2+</sup> may be a requirement for PLD activation, phospholipase activity has been analyzed following stimulation with CpG ODN in THP1 cell line. Results showed an increase of PLD activity after CpG ODN stimulation which resulted to be Ca<sup>2+</sup>-dependent as enzymatic activity was completely abrogated by EDTA treatment (Fig. 2A and B). Altogether, these results show that CpG ODN induce a signal transduction pathway, involving increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration of extracellular origin which is necessary for host PLD activation.

### *CpG ODN promote phagolysosome biogenesis through PLD activity*

As MTB is known to reside in non-acidified vacuoles sequestered away from late endosomal compartments [27], the acidification of MTB containing phagosomes in

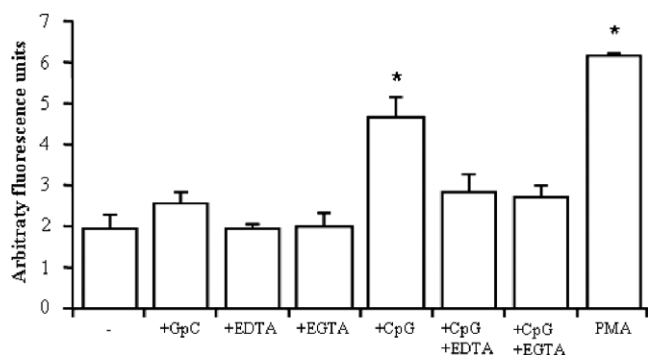


Fig. 1. CpG ODN induce Ca<sup>2+</sup> mobilization in monocytes. THP-1 cells were labeled with 3  $\mu$ M Fluo-3/AM for 60 min, treated or not with 2 mM EDTA or 3 mM EGTA for 15 min, and further stimulated with 1  $\mu$ M of either CpG or GpC ODN. Data are reported as means  $\pm$  SD of five different experiments. \* $p < 0.001$  in comparison with untreated THP1 cells.

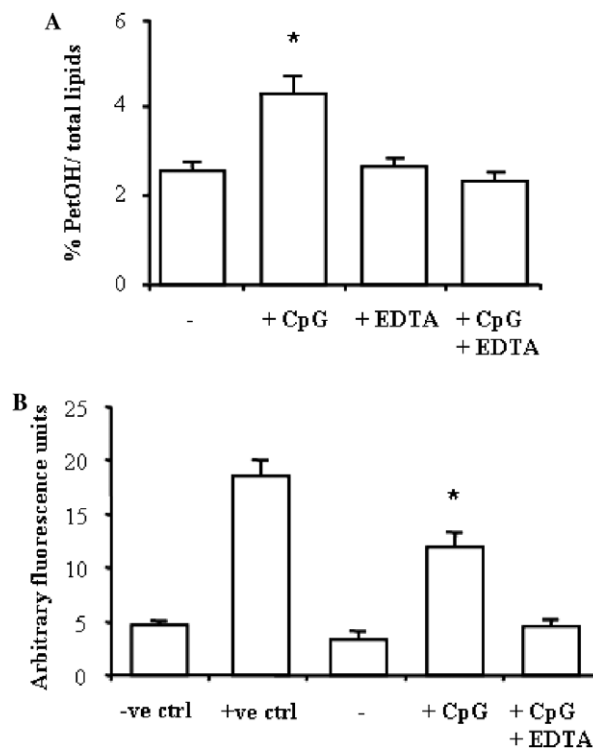


Fig. 2. CpG ODN induce Ca<sup>2+</sup>-dependent PLD activity. (A) THP1 cells were labeled with 1  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H]myristic acid for 3 h before the addition of 1  $\mu$ M CpG ODN for 30 min. Transphosphatidyl reaction was allowed by the addition of 1% ethanol 15 min before CpG ODN stimulation. The role of extracellular Ca<sup>2+</sup> in PLD activity was assessed by addition of 2 mM EDTA, 15 min before CpG ODN stimulation. Data are reported as means  $\pm$  SD of three different experiments. \* $p < 0.001$  in comparison with control cells. (B) Phospholipase D activity was monitored by “Amplex Red Phospholipase D detection kit” on THP1 cells stimulated or not with CpG ODN for 30 min. Fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 542 nm and an emission wavelength of 590 nm. Values are shown as means  $\pm$  SD of five independent experiments. \* $p < 0.001$  as compared with unstimulated THP-1 control cells.

CpG ODN-stimulated THP1 cell line has been investigated by confocal fluorescent microscopy (Fig. 3A). In the absence of CpG ODN, phagocytosed mycobacteria appeared green, indicating their presence in non-acidic vesicles separate from the red stained acidic vacuoles. In contrast, CpG ODN treatment induced a significant increase in the acidification of MTB-containing phagosomes, which appeared yellow, indicating the colocalization of green bacilli in acidified phagosomes. As phosphatidic acid is an important second messenger involved in phagolysosome biogenesis [11], the role of PLD in the CpG ODN-induced acidification of MTB containing endosomes has been analyzed in the presence of ethanol. The addition of primary alcohol almost completely reverted the CpG ODN-induced phagolysosome acidification. The percentage of MTB residing in acidic phagosomes over total intracellular mycobacteria was expressed after serial observations (Fig. 3B). As acidification of phagosome does not necessarily indicate full phagolysosome maturation because partial acidification is also present in immature phagosomes, the

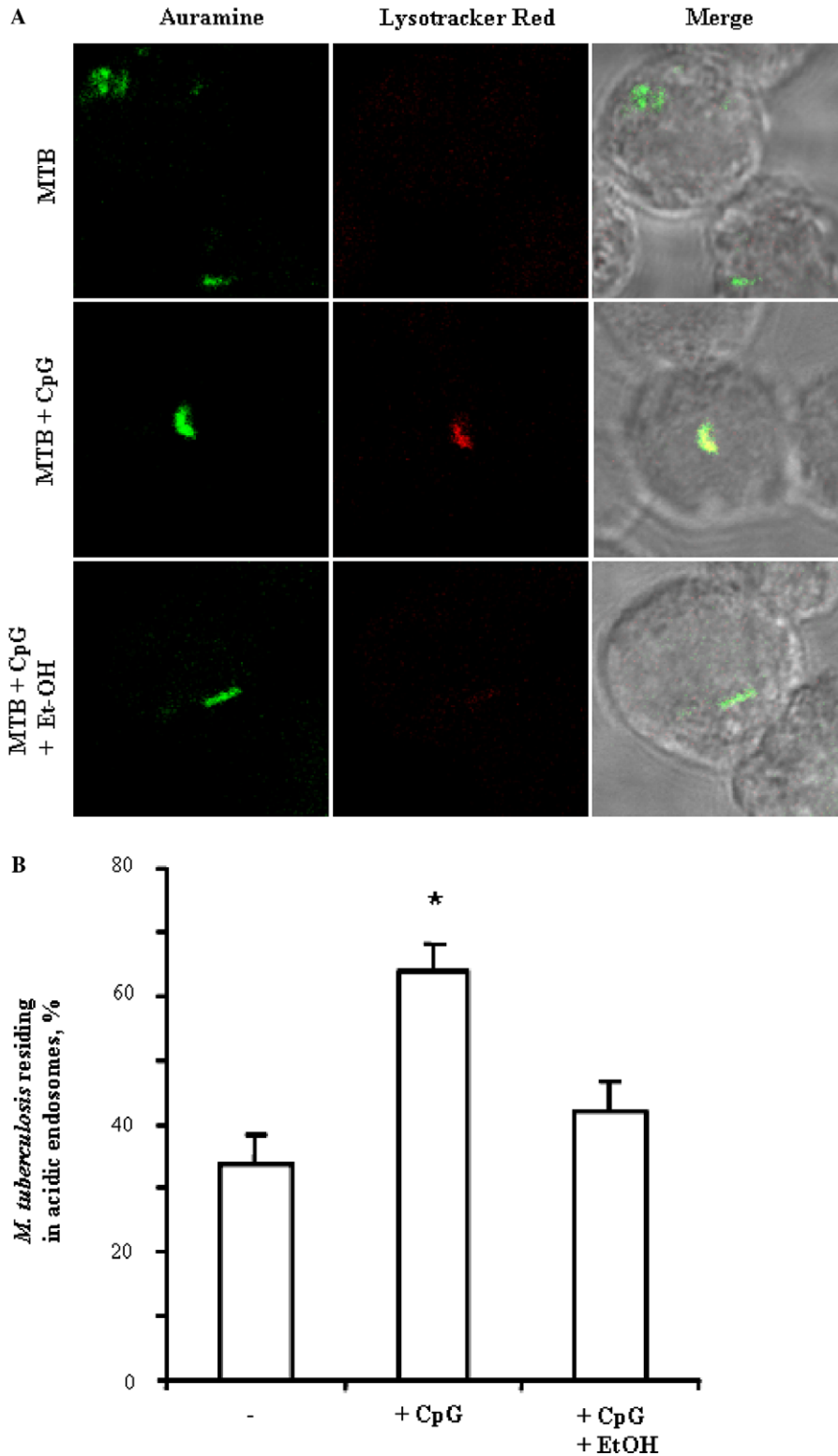


Fig. 3. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) colocalizes with acidic endosomes after CpG ODN stimulation. Representative picture from three separate experiments shows the increase of MTB residing in acidic vacuoles after CpG ODN treatment and the reverse effect exerted by ethanol (A). Summary of the mean percentage ± SD of MTB-colocalized with acidic phagosomes, determined by counting over 60 bacilli from at least 40 macrophages per condition (B). Three different experiments were assessed. \* $p < 0.0001$  in comparison with MTB-infected control cells.

expression of lysosomal associated membrane protein (LAMP)-1 as a marker of mature phagolysosome was also analyzed. Results show that CpG ODN stimulation

induces the colocalization of green mycobacteria in LAMP-1 expressing vacuoles and that the addition of ethanol together with CpG almost completely reverted such

process (Fig. 4A and B). Altogether, these results show that PLD is strictly necessary for the maturation from early to late acidic endosomes. Finally, the role of  $Ca^{2+}$ -dependent PLD has been assessed in terms of intracellular mycobacterial growth inhibition. Results demonstrate that the inhibition of PLD-dependent generation of phosphatidic acid

(PA) by ethanol significantly restored intracellular mycobacterial growth (Fig. 5A). Moreover, this effect was specific, as similar results were obtained by adding 1-butanol but not 2-butanol, and dose-dependent (Fig. 5B). Finally, the role of PA in the activation of anti-mycobacterial activity in monocytes has been further assessed by adding PA to

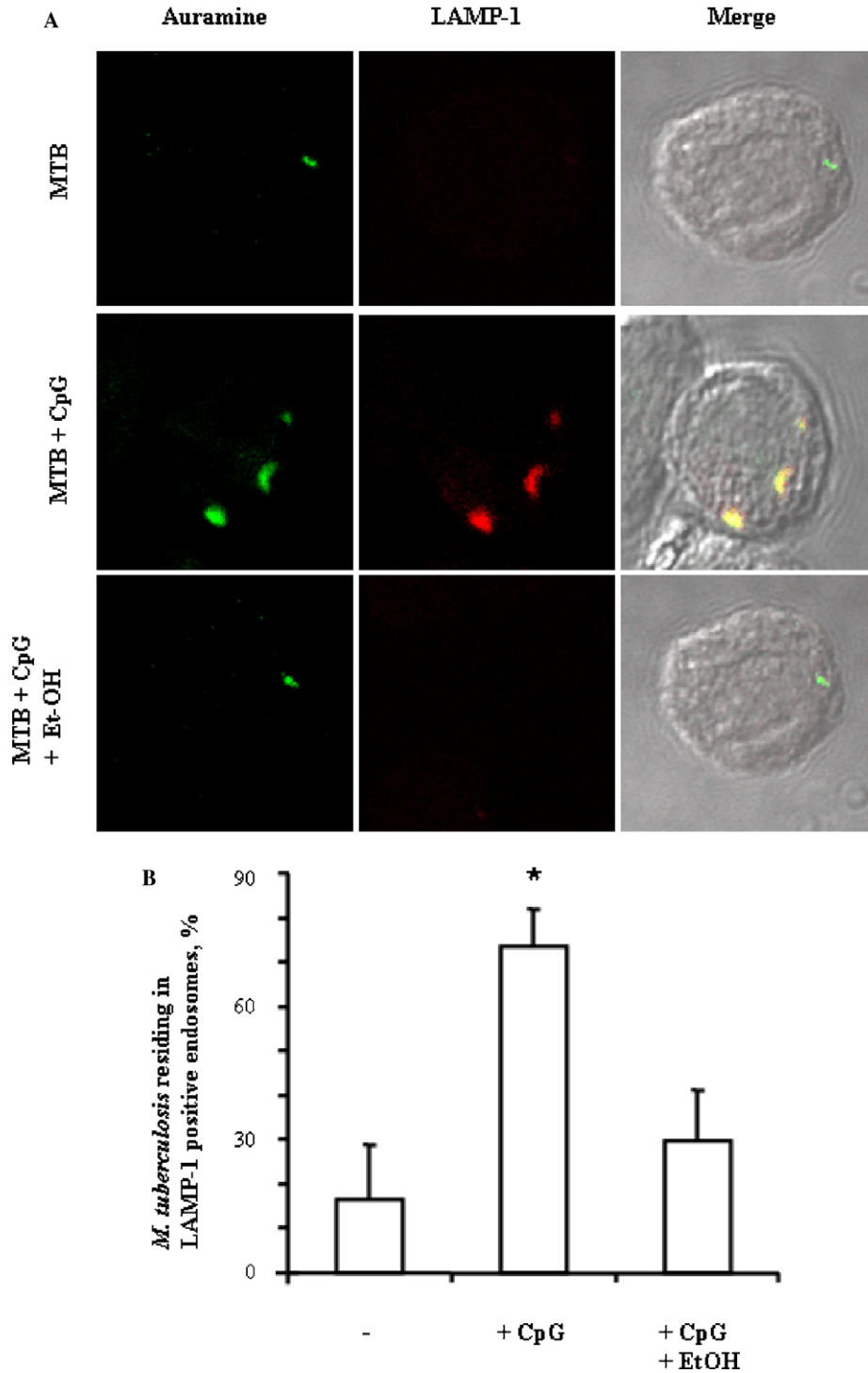


Fig. 4. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) colocalizes with LAMP-1 expressing phagosomes after CpG ODN stimulation. Representative picture from three separate experiments shows the increase of MTB residing in LAMP-1 positive vacuoles after CpG ODN treatment and the reverse effect exerted by ethanol (A). Summary of the mean percentage ± SD of MTB-colocalized with acidic phagosomes, determined by counting over 60 bacilli from at least 40 macrophages per sample (B). Three different experiments were assessed. \* $p = 0.001$  in comparison with MTB-infected control cells.

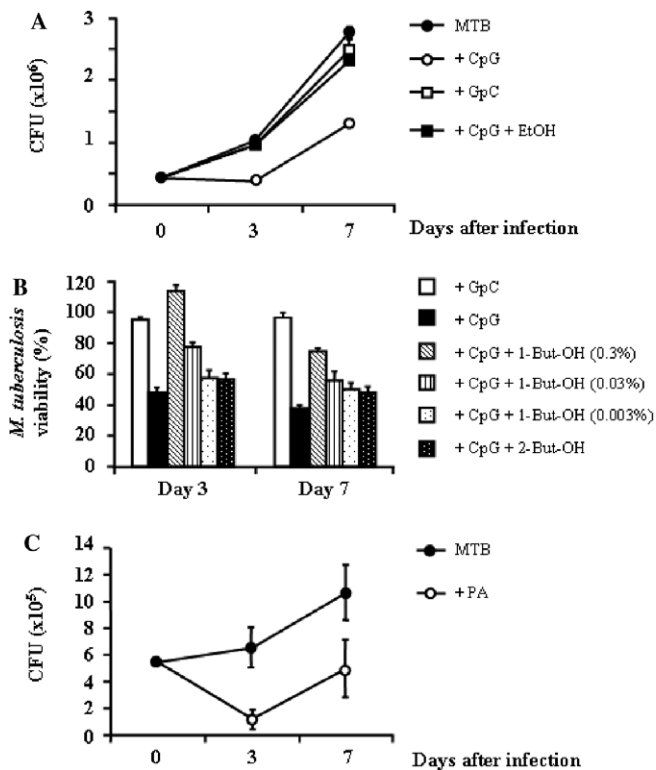


Fig. 5. Monocyte PLD mediates CpG ODN-induced intracellular mycobacterial growth inhibition. (A) THP1 cells were infected with MTB at the MOI of 1 and incubated for 0, 3, and 7 days alone or with CpG ODN, CpG ODN plus 0.3% ethanol, GpC ODN. CFU are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate values and are representative of two independent experiments. (B) THP1 cells were infected with MTB at the MOI of 1 and incubated for 0, 3, and 7 days alone or with CpG ODN, CpG ODN plus 1-butanol (used at the concentration of 0.3%, 0.03% or 0.003%), CpG ODN plus 2-butanol (used at the concentration of 0.3%), GpC ODN. Results coming from three different experiments have been normalized and expressed as means  $\pm$  SD of percentage of mycobacterial viability. The percentage of MTB viability was calculated as follows: (CFU coming from MTB-infected monocytes receiving the different treatments/CFU coming from MTB-infected control monocytes)  $\times$  100. (C) THP1 cells were infected with MTB at the MOI of 1 and incubated for 0, 3, and 7 days alone or with phosphatidic acid. CFU are expressed as means  $\pm$  SD of the triplicate values and are representative of three separate experiments.

MTB-infected THP1 cells. Results show that PA stimulation induced a significant decrease of intracellular mycobacterial growth (Fig. 5C).

## Discussion

Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) have been described to induce antimicrobial activity in innate immune cells [28]. In particular, CpG ODN have been described to enhance host defense during murine tuberculosis [22] and induce *in vitro* anti-mycobacterial activity in human differentiated macrophages in the course of *M. tuberculosis* infection through a PLD-dependent pathway [24]. As circulating undifferentiated monocytes represent both one of the preferential targets of MTB infection and a pool of inflammatory cells with potential

antimycobacterial activity [25], this study addresses the signal transduction pathway underlying CpG ODN stimulation in monocytes, with reference to the involvement of phospholipase D in CpG ODN-induced anti-mycobacterial activity. The results reported herein show that CpG ODN stimulation in THP1 monocytoic cell line triggers a signal transduction involving extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx which in turn induces a downstream activation of phospholipase D. This phospholipase was involved in phagolysosome maturation and intracellular mycobacterial killing induced by CpG ODN.

Macrophages possess multiple and reciprocally independent microbicidal mechanisms to eliminate phagocytosed microorganisms and, consequently, represent a strategic target for inactivation by potential pathogens [29]. In this context, *M. tuberculosis* exploits several strategies to circumvent host immune response and antimicrobial activity of mononuclear phagocytes [30], including inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization [26]. The activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent PLD reported herein following stimulation with CpG ODN suggests that CpG ODN may have the capability to restore this signal transduction pathway and that extracellular ion environment is important for the activation of innate PLD-dependent antimycobacterial activity.

The dynamic interactions between *M. tuberculosis* and human monocytes are central to each of the complex stages of tuberculosis, from initial infection through the development of active disease. A crucial feature of pathogenesis is the ability of tubercle bacilli to evade the microbicidal activities of macrophages and to persist as intracellular parasites within membrane-enclosed vesicles [27]. Following primary infection, MTB containing phagosomes exhibit characteristics of early, recycling endosomes and fails to progress along the physiological maturation pathway to a mycobacteriocidal phagolysosome [31]. The previously reported requirement for increase in  $\text{Ca}^{2+}$  and PLD activity for both phagolysosome maturation and intracellular mycobacterial killing in ATP [11] or Sphingosine 1-phosphate [12] stimulated macrophages directly supports the hypothesis that phagosomal maturation contributes to mycobacteriocidal activity. Results reported herein show that CpG ODN promotes phagolysosome maturation and require PLD activity to allow this process. In fact, the specific inhibition of PLD-mediated PA generation by ethanol completely reverted CpG ODN-induced phagolysosome maturation. The mechanism through which PLD may regulate membrane trafficking events can involve (i) direct mechanisms, by altering membrane shape and/or binding proteins, (ii) indirect mechanisms, by stimulating or inhibiting signal transduction pathways through phosphatidic acid release, and (iii) a combination of both [32]. In this context, phagolysosome biogenesis has been hypothesized to be a “kiss-and-run” process through which phagosomes undergo only a transient and partial fusion with endocytic organelles which allows the transfer of selected membranes and luminal contents between the phagosome and the endosome [33,34].



In conclusion, the present study shows that CpG ODN induce increase of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  leading to PLD activation which in turn promote phagolysosome maturation and intracellular mycobacterial growth inhibition. This signal transduction pathway may be exploited for the potentiation of antimycobacterial innate immune response.

### Acknowledgments

The present study was financially supported by the Italian Ministry of University (COFIN 2004) and by the Italian Ministry of Health (Grant No. 4AD/F9).

### References

- [1] B.C. Chen, C.F. Chou, W.W. Lin, Pyrimidinoceptor-mediated potentiation of inducible nitric-oxide synthase induction in J774 macrophages. Role of intracellular calcium, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 29754–29763.
- [2] N. Watanabe, J. Suzuki, Y. Kobayashi, Role of calcium in tumor necrosis factor- $\alpha$  production by activated macrophages, *J. Biochem.* 120 (1996) 1190–1195.
- [3] H. Tapper, The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils, *J. Leukoc. Biol.* 59 (1996) 613–622.
- [4] L.C. Denlinger, P.L. Fiset, K.A. Garis, G. Kwon, A. Vazquez-Torres, A.D. Simon, B. Nguyen, R.A. Proctor, P.J. Bertics, J.A. Corbett, Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 337–342.
- [5] W.K. Kim-Park, M.A. Moore, Z.W. Hakki, M.J. Kowolik, Activation of the neutrophil respiratory burst requires both intracellular and extracellular calcium, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 832 (1997) 394–404.
- [6] M. Liscovitch, M. Czarny, G. Fiucci, X. Tang, Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family, *Biochem. J.* 3 (2000) 401–415.
- [7] J.H. Exton, Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function, *Physiol. Rev.* 77 (1997) 303–320.
- [8] D.J. Kusner, C.F. Hall, S.L. Schlesinger, Activation of phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* or opsonized zymosan by human macrophages, *J. Exp. Med.* 184 (1996) 585–595.
- [9] J. Giron-Calle, H.J. Forman, Phospholipase D and priming of the respiratory burst by  $\text{H}_2\text{O}_2$  in NR8383 alveolar macrophages, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23 (2000) 748–754.
- [10] A. Melendez, R.A. Floto, D.J. Gillooly, M.M. Harnett, J.M. Allen,  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  coupling to phospholipase D initiates sphingosine kinase-mediated calcium and vesicular trafficking, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 9393–9402.
- [11] D.J. Kusner, J.A. Barton, ATP stimulates human macrophages to kill intracellular virulent *Mycobacterium tuberculosis* via  $\text{Ca}^{2+}$  dependent phagosome–lysosome fusion, *J. Immunol.* 167 (2001) 3308–3315.
- [12] S.K. Garg, E. Volpe, G. Palmieri, M. Mattei, D. Galati, A. Martino, E. Bonanno, P. De Vito, P.M. Baldini, L.G. Spagnoli, V. Colizzi, M. Fraziano, Sphingosine 1-phosphate induces antimicrobial activity both in vitro and in vivo, *J. Infect. Dis.* 189 (2004) 2129–2138.
- [13] J.H. Exton, Regulation of phospholipase D, *FEBS Lett.* 531 (2002) 58–61.
- [14] A.M. Krieg, A.K. Yi, S. Matson, T.J. Waldschmidt, G.A. Bishop, R. Teasdale, G.A. Koretzky, D.M. Klinman, CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation, *Nature* 374 (1995) 546–549.
- [15] A.M. Krieg, CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects, *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 709–760.
- [16] D.M. Klinman, A.K. Yi, S.L. Beaucage, J. Conover, A.M. Krieg, CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon- $\gamma$ , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 2879–2883.
- [17] R.S. Chu, O.S. Targoni, A.M. Krieg, P.V. Lehmann, C.V. Harding, CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity, *J. Exp. Med.* 186 (1997) 1623–1631.
- [18] A.M. Krieg, L. Love-Homan, A.K. Yi, J.T. Harty, CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge, *J. Immunol.* 161 (1998) 2428–2434.
- [19] P.S. Walker, T. Scharon-Kersten, A.M. Krieg, L. Love-Homan, E.D. Rowton, M.C. Udey, J.C. Vogel, Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN- $\gamma$ -dependent mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 6970–6975.
- [20] T. Hayashi, S.P. Rao, K. Takabayashi, J.H. Van Uden, R.S. Kornbluth, S.M. Baird, M.W. Taylor, D.A. Carson, A. Catanzaro, E. Raz, Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase, *Infect. Immun.* 69 (2001) 6156–6164.
- [21] N.P. Juffermans, J.C. Leemans, S. Florquin, A. Verbon, A.H. Kolk, P. Speelman, S.J. van Deventer, T. van der Poll, CpG oligodeoxynucleotides enhance host defense during murine tuberculosis, *Infect. Immun.* 70 (2002) 147–152.
- [22] D.K. Ghosh, M.A. Misukonis, C. Reich, D.S. Pisetsky, J.B. Weinberg, Host response to infection: the role of CpG DNA in induction of cyclooxygenase 2 and nitric oxide synthase 2 in murine macrophages, *Infect. Immun.* 69 (2001) 7703–7710.
- [23] H. Weighardt, C. Feterowski, M. Veit, M. Rump, H. Wagner, B. Holzmann, Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response, *J. Immunol.* 165 (2000) 4537–4543.
- [24] G. Auricchio, S.K. Garg, A. Martino, E. Volpe, A. Ciaramella, P. De Vito, P.M. Baldini, V. Colizzi, M. Fraziano, Role of macrophage phospholipase D in natural and CpG-induced antimycobacterial activity, *Cell. Microbiol.* 5 (2003) 913–920.
- [25] C. Manca, M.B. Reed, S. Freeman, B. Mathema, B. Kreiswirth, C.E. Barry III, G. Kaplan, Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis, *Infect. Immun.* 72 (2004) 5511–5514.
- [26] Z.A. Malik, G.M. Denning, D.J. Kusner, Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome–lysosome fusion and increased survival within human macrophages, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 287–302.
- [27] I. Vergne, J. Chua, S.B. Singh, V. Deretic, Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20 (2004) 367–394.
- [28] A. Iwasaki, R. Medzhitov, Toll-like receptor control of the adaptive immune responses, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 987–995.
- [29] P. Zhang, W.R. Summer, G.J. Bagby, S. Nelson, Innate immunity and pulmonary host defense, *Immunol. Rev.* 173 (2000) 39–51.
- [30] J.L. Flynn, J. Chan, Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy, *Curr. Opin. Immunol.* 15 (2003) 450–455.
- [31] J. Pieters, Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria, *Curr. Opin. Immunol.* 13 (2001) 37–44.
- [32] W.J. Brown, K. Chambers, A. Doody, Phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function, *Traffic* 4 (2003) 214–221.
- [33] M. Desjardins, Biogenesis of phagolysosome: the “kiss and run” hypothesis, *Trends Cell. Biol.* 5 (1995) 183–186.
- [34] M. Desjardins, L.A. Huber, R.G. Parton, G. Griffiths, Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus, *J. S Biol.* 124 (1994) 677–688.