



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI  
INTERNATIONAL PhD SCHOOL IN  
BIOMOLECULAR AND BIOTECHNOLOGICAL SCIENCES**

**DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES  
XXVII CYCLE (Curricula: Microbiology and Immunology)  
Director: Prof. Sechi Leonardo Antonio**

**ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL  
CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA  
MICOPLASMI**

PhD student: Antonio G. Anfossi

Tutor: Prof. Marco Pittau  
Co-Tutor: Dr. Bernardo Chessa

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della scuola di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2010/2011 – XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

PhD student: Antonio G. Anfossi

-----

Tutor: Prof. Marco Pittau

-----

Co-Tutor: Dr. Bernardo Chessa

-----

Direttore: Prof. Sechi Leonardo Antonio

-----

# Indice

	Pag.
<b>Indice</b>	3
<b>Capitolo 1</b>	
<b>I Micoplasmi</b>	
1.1- Generalità e tassonomia	6
1.2- La membrana dei micoplasmi	12
1.3- Invasività e patogenicità	18
<b>Capitolo 2</b>	
<b>Il sistema Immunitario Innato</b>	
2.1- Ruolo e funzioni	23
2.2- Pattern Recognition Receptor	25
2.3- Toll-like receptors e loro ligandi	27
2.4-Attività pro-infiammatoria di MALP2 e P48	35
<b>Capitolo 3</b>	
<b>Artriti Batteriche</b>	
3.1- Micoplasmi e Artriti	38
3.2- <i>Mycoplasma agalactiae</i>	38
3.3- Artriti infiammatorie croniche nell’Uomo	41
3.4- Le sinovie	43

Antonio Giovanni Anfossi

“ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

## **Capitolo 4**

<b>Scopo del lavoro</b>	46
-------------------------	----

## **Capitolo 5**

### **Materiali e Metodi**

5.1-Scelta degli animali e prelievo dei campioni	48
5.2-Colture Cellulari	48
5.3-Sintesi del LipoP48	50
5.4- Stimolazione dei monociti e dei FLS	51
5.5- Quantificazione dell'espressione delle citochine e chemochine	53
5.6- Real Time qPCR	55
5.7- Espressione di TLR2, MHCII, CD80 e CD86	56
5.8- Induzione della produzione di Ossido Nitrico	58
5.9- Test di citotossicità	59
5.10- Terreni e reagenti	59

## **Capitolo 6**

### **Risultati**

6.1- Espressione delle citochine nei monociti stimolati.	62
6.2 Espressione delle citochine nei FLS stimolati	64
6.3 Espressione di MHCII e TLR2	67
6.4 Espressione delle molecole costimolatorie	70
6.5 Produzione di NO	71
6.6 Test di citotossicità	72

Antonio Giovanni Anfossi

"ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI"

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

## **Capitolo 7**

**Conclusioni e discussione** 73

**Bibliografia** 75

# Capitolo 1

## *I Mycoplasmi*

### 1.1-Generalità e tassonomia

I micoplasmi sono considerati i più piccoli batteri autoreplicanti capaci di vita autonoma. Le loro dimensioni oscillano tra 0,2 - 0,8  $\mu\text{m}$ .

Attualmente sono note circa 180 specie di micoplasmi, classificate complessivamente nella divisione Tenericutes, classe *Mollicutes* (dal latino *mollis*: tenera, *cutis*: pelle), ordine Mycoplasmatales, famiglia Mycoplasmataceae, genere Mycoplasma (Razin S. & Freundt E.A., 1984; Razin S., 1991, Razin S., *et al.* 1998). (Fig. 1.1)

Classification	Current no. of recognized species	Genome size (kb)	Mol% G+C of genome	Cholesterol requirement	Distinctive properties	Habitat
Order I: <i>Mycoplasmatales</i>						
Family I: <i>Mycoplasmataceae</i>						
Genus I: <i>Mycoplasma</i>	102	580–1,350	23–40	Yes	Optimum growth at 37°C	Humans, animals
Genus II: <i>Ureaplasma</i>	6	760–1,170	27–30	Yes	Urea hydrolysis	Humans, animals
Order II: <i>Entomoplasmatales</i>						
Family I:						
<i>Entomoplasmataceae</i>						
Genus I: <i>Entomoplasma</i>	5	790–1,140	27–29	Yes	Optimum growth at 30°C	Insects, plants
Genus II: <i>Mesoplasma</i>	12	870–1,100	27–30	No	Optimum growth at 30°C; 0.04% Tween 80 required in serum-free medium	Insects, plants
Family II:						
<i>Spiroplasmataceae</i>						
Genus I: <i>Spiroplasma</i>	33	780–2,220	24–31	Yes	Helical motile filaments; optimum growth at 30–37°C	Insects, plants
Order III: <i>Acholeplasmatales</i>						
Family I:						
<i>Acholeplasmataceae</i>						
Genus: <i>Acholeplasma</i>	13	1,500–1,650	26–36	No	Optimum growth at 30–37°C	Animals, some plants, insects
Order IV: <i>Anaeroplasmatales</i>						
Family: <i>Anaeroplasmataceae</i>						
Genus I: <i>Anaeroplasma</i>	4	1,500–1,600	29–34	Yes	Oxygen-sensitive anaerobes	Bovine/ovine rumen
Genus II: <i>Asteroleplasma</i>	1	1,500	40	No	Oxygen-sensitive anaerobes	Bovine/ovine rumen
Undefined taxonomic status						
Phytoplasma	ND <sup>b</sup>	640–1,185	23–29	Not known	Uncultured in vitro	Insects, plants

<sup>a</sup> Updated and modified from reference 361.

<sup>b</sup> The taxonomic status of the uncultured phytoplasmas is not defined (ND) as yet; two *Candidatus* Phytoplasma species have already been published (101, 500).

**Fig. 1.1 - Tassonomia della classe Mollicutes (Razin S. *et al.* 1998)**

Antonio Giovanni Anfossi

“ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

Questi microrganismi sono distribuiti in modo ubiquitario nel mondo animale come patogeni o parassiti, e possono essere isolati nell'uomo, in molti mammiferi e uccelli, così come in rettili, anfibi e pesci (Razin S. 1992).

Oltre ad essere i più piccoli organismi autoreplicanti, i micoplasmi sono caratterizzati da un'ultrastruttura particolarmente semplificata. Possiamo distinguere la membrana plasmatica, i ribosomi e una molecola di DNA a doppio filamento fortemente spiralizzato.

L'ipotesi predominante è che queste caratteristiche siano state acquisite gradualmente, attraverso un'evoluzione di tipo degenerativo o riduttivo, a partire da batteri Gram+ con basso contenuto di G+C nel genoma (Razin S. *et al.* 1972; Woese C.R. 1987).

Una delle caratteristiche più importanti è l'assenza della parete cellulare. Si ritiene che il micoplasma sia originato da un progenitore ancestrale staccatosi da un ramo filogenetico degli streptococchi circa 600 milioni di anni fa. Il processo di evoluzione riduttiva del genoma ha portato alla perdita di alcune parti di geni non necessari per la sopravvivenza e la replicazione, tra cui quelli per la sintesi della parete cellulare (Razin S. 1992).

La mancanza completa della parete cellulare, conferisce a questi microrganismi un elevato pleomorfismo che gli permette di assumere diverse morfologie: coccica, filamentosa, a fiasca, a spirale e ad anello.

Quando coltivati in terreno solido in condizioni di aerobiosi (alla temperatura di 37 °C e pH compreso tra 7.6 e 7.8), avviene quello che si osserva in altri microrganismi privati artificialmente della parete cellulare, assumono l'aspetto tipico delle colonie comunemente definito ad "uovo fritto" (Fig.1.3). I micoplasmi possiedono una tipica membrana cellulare composta, secondo il modello del mosaico fluido, da un film lipidico ricco di fosfolipidi e colesterolo in cui si trovano le proteine di membrana.



**Fig. 1.2** Colonie ad “uovo fritto” di *Mycoplasma agalactiae* in coltura su terreno solido

(<http://www.gibraltarlabsinc.com/gibraltarblogger/mycoplasma-testing>).

Nelle sezioni sottili la membrana appare costituita da due strati elettrodensi separati tra loro da uno strato con densità minore. Data l'assenza della parete cellulare, i micoplasmi non contengono le sostanze tipiche di questa struttura, come l'acido muramico e l'acido diamminopimelico.

La dimensione del genoma delle varie specie di micoplasmi varia da 580 kb del *Mycoplasma genitalium* alle 1380 kb del *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC. Questa estrema variabilità, che è possibile riscontrare sia all'interno del genere che della specie, è dovuta alla presenza di segmenti di sequenze codificanti ripetute, che differiscono per numero e lunghezza nelle varie specie (Razin S. *et al.*, 1985; Carle P. *et al.*, 1995; Huang Y. *et al.* 1995).

In linea generale, le specie di *Acholeplasma* e *Spiroplasma*, considerate filogeneticamente più antiche posseggono un genoma più grande delle specie filogeneticamente più recenti come *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. Questa caratteristica è il riflesso dell'evoluzione degenerativa o riduttiva con perdita di sequenze genomiche che ha accompagnato queste specie batteriche (Woese C.R. 1987).

Il genoma dei micoplasmi ha tipicamente un contenuto in Guanina + Citosina (G+C) molto basso, che si aggira tra il 24 e il 33%. Il contenuto di tali basi non è distribuito uniformemente nel genoma, infatti mentre il contenuto in G+C di *M. genitalium* si aggira intorno al 32%, il contenuto di G+C dei suoi geni rRNA è del 44% mentre quello dei geni tRNA si attesta sul 52% (Tully J.C. *et al.*, 1996; Razin S. *et al.*, 1998). Nondimeno, i geni che codificano per l'adesina di *M. pneumoniae*, P1 and ORF6, e le loro sequenze ripetute hanno un contenuto in G+C del 56%, mentre l'origine di replicazione di questo micoplasma ha un contenuto molto inferiore, attestandosi intorno al 26%; infine il contenuto in G+C dell'intero genoma di *M. pneumoniae* è del 40% (Himmelreich R. *et al.*, 1997). Di conseguenza, molte delle regioni intergeniche dei micoplasmi hanno un elevato contenuto in A+T, raggiungendo valori dell'80-90% (Razin S. *et al.*, 1998). La pressione in AT/GC ha portato a un riassegnamento del codone UGA che nei micoplasmi codifica invece per il triptofano mentre nel codice genetico universale rappresenta un codone di stop, caratteristica questa osservata anche nei mitocondri. Di conseguenza, per l'espressione di proteine ricombinanti di micoplasma è necessaria la modifica di questo codone (Razin S. *et al.*, 1998). A causa del corredo genetico particolarmente ridotto di questi microrganismi, anche le loro capacità metaboliche sono piuttosto limitate. Essi, infatti, hanno perso tutti i geni utili per la biosintesi di aminoacidi e vitamine e spesso degli stessi cofattori, e anche la capacità di sintetizzare gli acidi grassi. Ne deriva che i micoplasmi dipendono strettamente dall'ospite per la sopravvivenza e hanno perciò sviluppato un modello di vita parassitario (Razin S. *et al.*, 1998). L'assenza della parete ha reso questi batteri più sensibili allo shock osmotico rispetto ai microrganismi forniti di parete batterica. L'adattamento alla vita parassitaria ha però dotato i micoplasmi di una nicchia ambientale osmoticamente stabile (Razin S. 1978).

Sono invece estremamente conservati i geni interessati nella traduzione e nella sintesi del tRNA e quelli ribosomiali.

Diversamente da altri eubatteri, i micoplasmi hanno perso la capacità di biosintetizzare i precursori degli acidi nucleici *ex novo*, di conseguenza hanno l'esigenza di introdurre purine e pirimidine come precursori degli acidi nucleici. L'attività nucleasica dei mollicutes è stata proposta come il meccanismo messo in atto dai micoplasmi per degradare il DNA e l'RNA esogeno per ottenere i precursori degli acidi nucleici che non possono produrre (Minion F.C. *et al.*, 1993).

Anche se in termini assoluti il numero dei geni coinvolti nella replicazione del DNA appare inferiore rispetto ad altri batteri come l'*Haemophilus*, in percentuale i geni interessati alla replicazione e degradazione del DNA in *M. genitalium* e in *M. pneumoniae* è maggiore rispetto a *H. influenzae*, sottolineando il ruolo biologico essenziale di questi geni. L'evoluzione riduttiva ha quindi risparmiato questo gruppo di geni impedendone la distruzione (Razin S. *et al.* 1998). Si può quindi supporre uno sviluppo eccezionale dei sistemi di trasporto in modo da assicurare l'apporto di molecole organiche dall'ambiente. Le ricerche svolte su questo campo hanno invece dimostrato un numero di sistemi di trasporto limitato (Razin S. *et al.* 1998).

Una delle spiegazioni a questa caratteristica potrebbe essere ricondotta alla presenza della sola membrana plasmatica e anche all'apparente bassa specificità di substrato di alcuni sistemi di trasporto tipici di questi microrganismi.

Alla luce della marcata dipendenza dei mollicutes dai nutrienti esogeni, dall'analisi della sequenza completa del genoma dei micoplasmi, ci si sarebbe aspettato che i micoplasmi codificassero per molti sistemi di

trasporto in modo da compensare la loro incapacità di sintetizzare elementi essenziali come gli aminoacidi.

Tre diversi sistemi di trasporto sono stati identificati in *M. pneumoniae*: a) il sistema ABC transporter (ATP-binding cassette transporter); b) il sistema PTS (phosphotransferase transport systems) e c) il sistema di diffusione facilitata.

Il sistema ABC transporter consiste di due domini intracitoplasmatici leganti l'ATP, due domini transmembranari a ponte e due domini leganti il substrato (SBP, substrate binding proteins). Questi ultimi sono in genere presenti in polipeptidi separati, ma possono anche essere rappresentati da due o più domini sullo stesso peptide (Himmelreich R. *et al.* 1996).

In genere, nei sistemi ABC degli eubatteri ritroviamo delle SBP specifiche per le differenti molecole, mentre nei micoplasmi non è stato possibile identificarle (Razin S. *et al.* 1998). Una delle ipotesi chiama in causa la divergenza delle SBP di micoplasma da quelle di altri batteri.

La caratterizzazione del sistema ABC di *M. fermentans* (Theiss P. & Wise K.S. 1997) ha in parte chiarito la questione: uno degli elementi del sistema era rappresentato da una lipoproteina di superficie, con funzione di SBP, che era soggetta a variazioni di fase.

Il sistema PTS è stato identificato già da molto tempo nei mollicutes ed è deputato al trasporto degli zuccheri.

Infine un terzo sistema di trasporto consiste nella diffusione facilitata di vari composti grazie a proteine transmembranarie che si comportano da trasportatori attivi, specifici per i diversi substrati.

Da quanto detto ne deriva che la riduzione del patrimonio genetico cui sono andati incontro i mollicutes è stata resa possibile dall'adozione di un sistema di vita parassitario. Infatti, l'utilizzo di molti nutrienti provenienti dall'ospite ha portato alla perdita, durante l'evoluzione, di geni indispensabili per molti processi biologici (Razin S. *et al.* 1998).

Come vedremo in dettaglio più avanti, per potersi comportare da parassita i micoplasmi hanno sviluppato dei meccanismi di colonizzazione dei tessuti dell'ospite molto sofisticati che gli permettono di evadere la risposta del sistema immunitario; la strategia meglio conosciuta e probabilmente la più importante è rappresentata dalla capacità di questi microrganismi di variare il proprio sistema antigenico di superficie (Glew M.D. *et al.* 2000; Wise K.S. 1993).

L'evoluzione estremamente riduttiva che ha costretto i micoplasmi alla vita parassita e che potrebbe apparire estremamente svantaggiosa, ha in realtà permesso ai mollicutes la diffusione in tutto il pianeta.

La condizione di parassiti obbligati determina una notevole difficoltà per la loro coltivazione in vitro e quindi influenza negativamente le possibilità di studio di questi microrganismi.

## **1.2- La membrana dei micoplasmi**

L'assenza di parete cellulare e di membrane interne, fa sì che l'unica membrana posseduta dai mollicutes sia la membrana plasmatica.

Dalle informazioni ottenute dallo studio della membrana di numerose specie di micoplasma, si è visto che il 50%-60% del peso secco è rappresentato da proteine mentre la restante parte quasi completamente da lipidi (Razin S. 1967).

Di particolare interesse è l'elevata quantità di lipoproteine di membrana dei micoplasmi, in contrasto con l'esiguo numero di lipoproteine di membrana di altri batteri.

Le lipoproteine, nei micoplasmi, rappresentano anche gli antigeni dominanti, e la maggior parte degli antigeni di superficie sono noti per andar incontro a variazioni antigeniche e/o di taglia (Razin S. *et al.* 1998).

Dall'analisi del genoma di *M. pneumoniae* e di *M. genitalium* è risultato che nel primo sono identificabili 46 geni codificanti per lipoproteine e 21 in *M. genitalium*. Questo elevato numero di lipoproteine nei mollicutes può essere giustificato dall'assenza di uno spazio periplasmico in questi microrganismi (Himmelreich R. *et al.* 1996).

I mollicutes possiedono il tipico peptide segnale riscontrabile nei batteri che dirige le proteine di nuova sintesi nel pathway secretorio per il trasporto attraverso la membrana.

Per le proteine esposte sulla superficie esterna della cellula batterica, i mollicutes utilizzano l'acilazione delle proteine con acidi grassi a lunga catena che ne permettono l'ancoraggio alla membrana.

La classificazione delle Open Reading Frames (ORF) di *M. genitalium* come geni codificanti per lipoproteine si basa sul rinvenimento della sequenza peptidica segnale che precede un residuo di cisteina (Himmelreich R. *et al.* 1996).

La cisteina viene modificata legando, al gruppo sulfidrilico, un diacilglicerolo proveniente da un glicerofosfolipide. Viene così a formarsi la pro-lipoproteina. Quest'ultima viene clivata a livello della cisteina modificata da un specifico enzima, che fa sì che la cisteina divenga il primo aminoacido della proteina (Razin S. *et al.* 1998).

Non tutti i geni delle lipoproteine vengono espressi contemporaneamente, in quanto la radio-marcatura in vivo con acido palmitico di *M. pneumoniae*, seguito da SDS-PAGE rivelava solo 20-25 proteine marcate. Questo contrasta con i 46 geni predetti, codificanti per lipoproteine (Himmelreich R. *et al.* 1996).

Questa differenza ha almeno due spiegazioni: una delle cause può essere dovuta ad una regolazione dell'espressione genica attuata dai micoplasmii,

mentre la seconda è imputabile ad una bassa marcatura da parte dell'acido palmitico (Razin S. *et al.* 1998; Himmelreich R. *et al.* 1996).

La modificazione lipidica delle proteine batteriche facilita l'ancoraggio delle proteine idrofiliche alle superfici idrofobiche attraverso l'interazione del gruppo acile attaccato ai fosfolipidi della parete cellulare (Kovacs-Simon A. *et al.* 2011).

Le lipoproteine batteriche svolgono numerosi ruoli, tra i quali l'uptake delle sostanze nutritive, la trasduzione dei segnali, l'adesione, il trasporto (ABC), solo per citarne alcune.

Nel caso dei patogeni, le lipoproteine si sono dimostrate giocare un ruolo fondamentale come fattori della virulenza, contribuendo alla colonizzazione, all'invasione, all'evasione dalla risposta immunitaria e, infine, all'immunomodulazione.

Sia nei batteri Gram + che in quelli Gram - le lipoproteine vengono inizialmente traslate come pre-pro-lipoproteine, che sono caratterizzate alla porzione N-terminale da un peptide segnale di circa 20 amminoacidi, che possiede le caratteristiche tipiche del peptide segnale delle proteine secrete.

Una sequenza conservata nella parte C terminale del peptide segnale, viene modificata attraverso l'attacco covalente di una catena di diacilglicerolo al gruppo tiolico di un residuo di cisteina della catena. Questa modificazione viene catalizzata dall'enzima lipoprotein diacylglyceryl transferase (Lgt). Viene così a formarsi una pro-lipoproteina che consiste di una catena di diacilglicerolo legata con legame tioestere alla proteina. Dopo la lipidazione, un secondo enzima, la lipoprotein signal peptidase (Lps) è responsabile del clivaggio della sequenza segnale della pro-lipoproteina lipidata a livello della cisteina, facendo in modo che questa rappresenti il nuovo residuo ammino-terminale (Razin S. *et al.* 1998; Kovacs-Simon A. *et al.* 2011).

Nei batteri Gram- ed in alcuni Gram+, la pro-lipoproteina clivata è sottoposta ad un'ulteriore modificazione attraverso l'attacco al residuo di cisteina N-terminale, ad opera dell'enzima transacilasi o lipoprotein N-acyl transferase (Int), di un gruppo acile mediante legame ammidico.

Himmelreich e collaboratori hanno identificato dal sequenziamento del genoma di *M. pneumonie* solo l'enzima lgt. L'enzima N-acyl transferase invece non è stato identificato. È stata per molto tempo una questione aperta se nei micoplasmi fosse presente o meno un terzo acido grasso legato al residuo di cisteina mediante legame ammidico come osservato per le lipoproteine di *E. coli* (Himmelreich R. *et al.* 1996).

Sicuramente per alcuni micoplasmi questo meccanismo è funzionante e vengono prodotte lipoproteine triacilate, mentre probabilmente altri batteri della stessa specie non riescono a catalizzare l'unione della terza catena lipidica non per mancanza dell'enzima, ma perché quest'ultimo non riesce a catalizzare il trasferimento in quanto il clivaggio non avviene a livello della cisteina, ma si ritrova traslato di uno o due aminoacidi come ad esempio per la P48 (Rosati S. *et al.* 1999).

La presenza di un terzo acido grasso legato al residuo di cisteina è stato dimostrato in *M. gallisepticum* (Jan G. *et al.* 1995) e in *M. mycoides* subsp. *mycoides* (Jan G. *et al.* 1996).

Le lipoproteine batteriche possono essere quindi suddivise in due categorie, in base alla struttura: lipoproteine diacilate e lipoproteine triacilate.

Allo scopo di sopravvivere nell'ambiente, tutti i microrganismi devono possedere dei meccanismi e delle strategie che gli permettano di monitorare l'ambiente circostante e di rispondere adattandosi rapidamente a dei suoi cambiamenti.

Nel caso dei microrganismi patogeni quest'ambiente è rappresentato dall'ospite e dai suoi meccanismi di difesa, che in qualche modo indirizzano il potenziale adattativo dei batteri.

Quindi solo i microrganismi capaci di esibire tratti molecolari di risposta e adattamento all'ambiente, che gli permettono di entrare, aderire e replicare nell'ospite sopravvivranno.

Di conseguenza, i batteri patogeni di successo sono quelli che hanno evoluto meccanismi molecolari per evitare la risposta immunitaria dell'ospite, proprietà questa che richiede di essere trasferita alla progenie e ristabilita in un nuovo ospite.

Questi meccanismi includono: l'imitazione degli antigeni dell'ospite, la sopravvivenza all'interno di fagociti professionali, e lo sviluppo della plasticità fenotipica.

Quest'ultima, intesa come capacità di un singolo genotipo di dare origine a una o più differenti fenotipi in risposta alle condizioni ambientali.

Con il termine "variazione antigenica" o "switching fenotipico" si intende la capacità dei microrganismi di mutare le caratteristiche antigeniche dei componenti della superficie come i flagelli, i pili, le proteine di membrana, etc., allo scopo di colonizzare i tessuti ed evadere la risposta immunitaria innata dell'ospite (Razin S. *et al.* 1998).

I mollicutes non fanno eccezione, e particolare interesse ha suscitato il sofisticato sistema genetico che in questi procarioti estremamente semplificati permette la generazione di un'ampia mutabilità fenotipica in una popolazione derivante da un singolo organismo (Glew M.D. *et al.* 2000; Wise K.S. 1993).

Pur possedendo un genoma con capacità codificante relativamente limitata, molti di questi sistemi coinvolgono spesso famiglie di molteplici ma distinti

geni in singola copia, raggruppati sul cromosoma, e codificanti per elementi principali di superficie.

I micoplasmi hanno sviluppato un ampio assortimento di meccanismi molecolari per dare origine alla variabilità ad alta frequenza delle proteine di superficie, che determinano sia l'espressione ON/OFF (variazione di fase) che il cambiamento di forma (variazione di taglia) (Wise K.S. 1993).

Infatti, i geni che nei micoplasmi sono coinvolti nella variabilità antigenica della superficie cellulare sono particolarmente numerosi.

Il modello comune per il mantenimento della variabilità di superficie, è l'utilizzo di geni variabili multipli organizzati in famiglie di geni. Quest'organizzazione permette la generazione di un ampio repertorio di varianti antigeniche.

Tra i vari esempi possiamo citare la famiglia di proteine definite Vsp del *M. bovis*, che subiscono variazione di fase e di taglia in modo non-coordinato ad alta frequenza; la famiglia delle Vlp di *M. hyorhinis* che ha come ospite il suino e la famiglia pMAG di *M. gallisepticum* patogeno aviario.

Razin S. e collaboratori (Razin S. *et al.* 1998) suddividono i meccanismi genetici della variazione antigenica in tre categorie:

- Variazione di fase attraverso ripetizioni omopolimeriche;
- Variazione di fase per riarrangiamento cromosomico;
- Variazione per domini ripetitivi (variazione di taglia);

Il primo caso è caratterizzato dalla presenza delle cosiddette ripetizioni omopolimeriche, regioni che contengono basi ripetute, oppure che contengono oligonucleotidi ripetuti, che si formano durante la duplicazione del DNA a causa di un allineamento non corretto. Queste regioni si comportano come target preferenziali per l'inserzione o la delezione di nucleotidi.

Nel secondo caso il meccanismo che permette la variazione genetica è rappresentato dalla ricombinazione omologa, che promuove l'annilamento di singoli filamenti di DNA con sequenze complementari con omologia variabile tra le 20 e le 100 paia di basi, per formare DNA a doppio filamento. Questo meccanismo è stato osservato nel *M. pulmonis* (Bhugra B. and Dybvig K. 1992) e nel *M. bovis* (Lysnyansky I. *et al.* 1996).

Il terzo sistema è rappresentato da domini ripetuti multipli organizzati in tandem nei geni codificanti l'antigene, che genera strutture altamente mutabili soggette a frequente contrazione o espansione, dando luogo all'espressione di varianti di taglia diversa della proteina corrispondente.

L'apparente assenza di sistemi che permettano al microrganismo di rispondere agli stimoli provenienti dall'ambiente circostante, suggerisce che la variazione non avviene in risposta ad un segnale. In altre parole, la strategia messa in atto dai micoplasmi sembra dipendere da un processo casuale, che consiste nel generare uno switching fenotipico ad alta frequenza (Wise K.S. 1993).

### **1.3-Invasività e patogenicità**

Molti micoplasmi vivono come commensali, e in molti artropodi possono anche essere considerati dei simbionti. L'infezione con micoplasmi patogeni, solo raramente appare di tipo fulminante, più spesso segue un andamento cronico. Da questo punto di vista i micoplasmi possono essere visti come "parassiti ideali" per la capacità di vivere in armonia con il loro ospite (Razin S. *et al.* 1998).

La considerevole riduzione evolutiva del genoma descritta in precedenza nei mollicutes può essere incompatibile con la vita degli stessi in ambienti non protetti. La condizione di parassiti obbligati spiega la maggior incidenza di

forme d'infezione cronica che favoriscono una più duratura convivenza con l'ospite.

È importante sottolineare che spesso le conseguenze dannose legate all'infezione da micoplasmi sono da ricondurre alla risposta del sistema immunitario anziché all'azione diretta del microrganismo. Infatti, la capacità della maggior parte dei micoplasmi di produrre enzimi o tossine ad azione dannosa sui tessuti dell'ospite è pressoché nulla.

Nella maggior parte dei casi è dimostrata la produzione di  $H_2O_2$  e di radicali dell'ossigeno, che alterano il movimento delle ciglia degli epitelii ciliati e causano danni ossidativi alle membrane cellulari.

L'intima interazione del micoplasma con la superficie cellulare dell'ospite può innescare una cascata di segnali trasdotti dalla membrana cellulare al nucleo, alterando la funzione di molti geni. Inoltre, è noto che i micoplasmi inducono una varietà di citochine, che mediano efficacemente un gran numero di azioni biologiche.

Molti micoplasmi hanno la capacità di aderire tenacemente al rivestimento epiteliale dei tratti respiratorio e urogenitale, invadendone raramente i tessuti. L'adesione dei mollicutes alle cellule dell'ospite è il prerequisito per la colonizzazione e l'infezione (Fig. 1.3).



**Fig. 1.3** Colonizzazione dell'epitelio ciliato delle vie aeree.

I micoplasmi si attaccano alla cellula ospite attraverso un insieme di legami idrofobici e ionici. La plasticità della membrana permette ai micoplasmi di adattare la forma a quella della superficie dell'ospite proteggendosi dalla fagocitosi. Si pensa anche che il contatto micoplasma/cellula ospite, sia così intimo da comportare la fusione delle due membrane, e/o il passaggio attraverso una specie di "iniezione" del contenuto citoplasmatico del parassita nella cellula ospite. Sebbene la fusione tra le due membrane sia teoricamente possibile, non ci sono ancora dati sperimentali a supporto di questa teoria. Questo meccanismo di fusione potrebbe portare all'alterazione nella composizione e nella permeabilità della membrana della cellula ospite e permettere l'ingresso diretto di enzimi idrolitici del batterio, all'interno della cellula ospite (Razin S. 1992).

È dimostrata in *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. hominis* e *M. hyopneumoniae*, la presenza di annessi prospicienti dal corpo del microorganismo, utili nell'ancoraggio.

Le adesine appartenenti al *M. pneumoniae* ed al *M. genitalium* e denominate P1, MgPa e P30, rappresentano solo alcune di queste strutture finora identificate e delle quali sono stati sequenziati i geni codificanti (Razin S. *et al.* 1998).

Sebbene le adesine possiedano come ruolo principale la citoadesione, il processo appare più complesso, coinvolgendo anche un certo numero di proteine di membrana accessorie; queste proteine accessorie agiscono congiuntamente con gli elementi del citoscheletro per facilitare il movimento laterale e la concentrazione delle molecole di adesina nel punto di attacco (tip organelle).

La scoperta del *M. penetrans* all'interno delle cellule eucariotiche ha stimolato l'interesse nel determinare se altri micoplasmi erano capaci di invadere le cellule epiteliali (Lo S.C. *et al.* 1989).

Da quel momento altri micoplasmi che colonizzano il tratto respiratorio e genitale dell'uomo, hanno mostrato di potersi comportare come organismi intracellulari facoltativi. Questi sono il *M. fermentans*, il *M. genitalium*, il *M. pneumoniae* e il *M. hominis*.

Queste scoperte hanno offerto una nuova visione sulle strategie messe in opera da questi microrganismi per sopravvivere nei loro ospiti immunocompetenti.

Per questi procarioti estremamente semplificati, l'invasione può offrire accesso ad una quantità quasi illimitata di nutrienti per la crescita e protezione contro le difese immunitarie dell'ospite.

Questo fenomeno può anche giocare un ruolo fondamentale per raggiungere nicchie più favorevoli e causare infezioni sistemiche oltrepassando le barriere mucose (Winner F. *et al.* 2000).

Dopo le prime segnalazioni della capacità dei micoplasmi patogeni umani di invadere cellule non fagocitarie (Lo S.C. *et al.* 1989; Taylor-Robinson D. *et al.* 1991; Yavlovich A. *et al.* 2004), è stata descritta la capacità di invadere sia le cellule HeLa, sia fibroblasti di embrione di pollo *in vitro* da parte del *M. gallisepticum* che deriva filogeneticamente dal cluster del *M. pneumoniae* (Winner F. *et al.* 2000).

Le manifestazioni cliniche dell'infezione con *M. gallisepticum*, vengono indicate come “malattia respiratoria cronica del pollo e del tacchino”. A seguito della colonizzazione del tratto respiratorio superiore si evidenziano i sintomi riconducibili a tracheite e all'infiammazione dei sacchi aerei. Occasionalmente l'infezione è associata ad artrite, congiuntivite, salpingite ed encefalopatia fatale. Questo significa che il *M. gallisepticum* è capace di attraversare le barriere mucosali, raggiungendo in questo modo siti d'infezione favorevoli, distanti dal sito di colonizzazione primario.

L'infezione sperimentale con aerosol ha dimostrato, mediante il suo re-isolamento, la diffusione di *M. gallisepticum* in numerosi organi (cuore, cervello, rene, milza fegato) (Much P. *et al.* 2002).

Il *M. gallisepticum* è capace di invadere gli eritrociti (RBCs= Red Blood Cells). Questo meccanismo è stato dimostrato sia *in vitro* che *in vivo* su campioni di sangue (Vogl G. *et al.* 2008).

In seguito questo meccanismo è stato dimostrato anche per altri micoplasmi patogeni degli animali come il *M. suis* (K. Groebel *et al.* 2009) e il *M. bovis* (van der Merwe J. *et al.* 2010). Quest'ultimo, oltre che con gli RBC, è stato osservato in associazione a praticamente tutta la popolazione di PBMC compreso le cellule T (CD3), i linfociti T CD4 e CD8, i monociti, le cellule B, le cellule NK, le cellule dendritiche, e le cellule T  $\gamma\delta$  (van der Merwe J. *et al.* 2010), sebbene non possa essere escluso il meccanismo della fagocitosi svolto da queste cellule.

## Capitolo 2

### *Il sistema Immunitario Innato*

#### **2.1-Ruolo e funzioni**

Tutti i microorganismi multicellulari hanno sviluppato un complesso di sistemi di difesa, con lo scopo di impedire l'invasione da parte dei microorganismi che cercano di colonizzarlo. Il sistema immunitario pur se particolarmente efficace nei confronti di un gran numero di microorganismi, non è sempre perfetto e/o risolutivo e, inoltre, la risposta immunitaria stessa può danneggiare l'ospite (allergia, autoimmunità, rigetto dei trapianti). Solo nei vertebrati è presente un sistema alternativo di riconoscimento ed eliminazione dei patogeni, chiamato sistema immunitario acquisito o immunità adattativa.

Mentre il sistema immunitario innato rappresenta la parte evolutivamente più antica delle difese dell'ospite contro le infezioni, il sistema è relativamente poco specifico, e si realizza attraverso un numero limitato di recettori, chiamati "Pattern Recognition Receptor" (PRR) (Janeway C.A. *et al.* 2002) (Akira S. *et al.* 2006), l'immunità adattativa oltre ad essere evolutivamente più recente, risulta essere anche maggiormente specifica e caratterizzata dal riarrangiamento genico, che permette l'origine, attraverso la selezione clonale, di un gran numero di linfociti dotati di recettori specifici per un determinato antigene. Il sistema immunitario acquisito possiede anche una "memoria immunologica", che gli permette di rispondere prontamente verso antigeni già incontrati in precedenza (Tabella 1).

Nel sistema immunitario innato possiamo distinguere una componente cellulare e una umorale.

Property	Innate immune system	Adaptive immune system
<b>Receptors</b>	Fixed in genome Rearrangement is not necessary	Encoded in gene segments Rearrangement necessary
<b>Distribution</b>	Non-clonal All cells of a class identical	Clonal All cells of a class distinct
<b>Recognition</b>	Conserved molecular patterns (LPS, LTA, mannans, glycans)	Details of molecular structure (proteins, peptides, carbohydrates)
<b>Self-Nonself discrimination</b>	Perfect: selected over evolutionary time	Imperfect: selected in individual somatic cells
<b>Action time</b>	Immediate activation of effectors	Delayed activation of effectors
<b>Response</b>	Co-stimulatory molecules Cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6) Chemokines (IL-8)	Clonal expansion or anergy IL-2 Effector cytokines: (IL-4, IFN $\gamma$ )

**Tabella 1 Principali differenze tra Sistema immunitario Innato e Acquisito.  
Da Janeway C.A. *et al.* 2002.**

La componente cellulare è rappresentata dalle cellule di origine mieloide, che hanno la capacità di fagocitare e distruggere i microorganismi patogeni e, di non secondaria importanza, fungere da ponte di congiunzione con sistema immunitario adattativo.

Le cellule mieloidi sono rappresentate dai due grandi gruppi dei fagociti mononucleati e polimorfonucleati.

I fagociti mononucleati sono rappresentati dai macrofagi, che derivano dalla maturazione dei monociti del sangue, e dalle cellule dendritiche (DC) anch'esse di origine monocitaria.

Tra la popolazione dei macrofagi possiamo distinguere una popolazione non uniforme di cellule, che comprende gli istiociti tissutali, le cellule del Küpffer dei sinusoidi epatici, le cellule della microglia del sistema nervoso centrale, etc.

Anche le DC possono assumere varie forme, tra le quali si riconoscono le cellule del Langerhans e le DC plasmocitoidi.

I macrofagi e le DC vengono definite cellule presentanti l'antigene (APC= Antigen Presenting Cells) specializzate, in quanto capaci di fagocitare i microorganismi, di migrare verso il linfonodo tributario e, dopo

processazione, di presentare gli antigeni ai linfociti Th CD4+ attivando la risposta del sistema immunitario adattativo. Questo meccanismo viene svolto in modo più efficace dalle DC, come dimostrato dall'attenuazione della risposta immunitaria adattativa a seguito della deplezione delle DCs (Phythian-Adams A.T. *et al.* 2010).

I fagociti polimorfonucleati cellule completamente differenziate, a vita breve, sono rappresentati dai granulociti neutrofilo, eosinofili e basofili, suddivisi in base alle caratteristiche tintoriali dei granuli citoplasmatici, dopo colorazione con metodi di routine come il Giemsa.

Un'altra caratteristica morfologica importante di queste cellule è la presenza di un nucleo polilobato, da cui il termine "polimorfonucleati".

Le principali funzioni dei granulociti neutrofilo sono la fagocitosi e distruzione dei microrganismi, il rilascio di enzimi nell'ambiente circostante allo scopo di digerire materiali estranei e tessuti danneggiati. Recentemente (Brinkmann V. *et al.* 2004) è stata messa in luce la capacità di queste cellule di formare NETs (Neutrophil Extracellular Traps), strutture composte di granuli enzimatici e costituenti nucleari che intrappolano e uccidono i batteri nell'ambiente extracellulare.

Gli eosinofili e i basofili svolgono il loro compito principalmente tramite la produzione di mediatori chimici. Un gran numero di eosinofili vengono rinvenuti tipicamente nelle infestazioni parassitarie.

Infine i mastociti, cellule di origine mieloide residenti in numerosi tessuti, sono coinvolti nella risposta allergica.

## **2.2-Pattern Recognition Receptor**

Il sistema immunitario innato riconosce i microrganismi attraverso un numero limitato di recettori chiamati Pattern Recognition Receptor (PRR),

che possono essere espressi sulla membrana cellulare, associati alle membrane endosomiali (Akira S. *et al.* 2006) o secreti nell'ambiente (Janeway C.A. *et al.* 2002). I PRR permettono il riconoscimento di strutture conservate di microrganismi patogeni permettendo, inoltre, di distinguere i componenti self, facenti quindi parte dell'ospite, da componenti non-self (Janeway C.A. *et al.* 2002; Akira S. *et al.* 2006).

I PRR permettono il riconoscimento di prodotti microbici definiti dall'acronimo PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) e prodotti di "danneggiamento" definiti DAMPs (danger-associated molecular patterns) (Suresh R. *et al.* 2013).

Gli effetti principali scatenati dall'interazione ligando/PRR sono:

- L'attivazione della trasduzione del segnale intracellulare che attiva la risposta di difesa dell'ospite. Di particolare importanza il rilascio di mediatori chimici come citochine e chemochine pro-infiammatorie.
- L'induzione della competenza nelle APC, necessaria all'avvio della risposta immunitaria adattativa. Il legame PRR/PAMPs nelle DC ne induce la maturazione, la stabilizzazione del MHC di classe II sulla superficie cellulare, e facilita la presentazione dell'antigene inducendo l'espressione di molecole co-stimolatrici sulle APC, inducendo la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T.

Fanno parte dei PAMPs strutture microbiche come i lipopolissaccaridi (LPS) della parete batterica dei Gram negativi, le lipoproteine di alcuni batteri (micoplasmi, borrelie), i peptidoglicani (PGN), l'acido lipoteicoico (LTA), il lipoarabinomannano (LAM), il DNA batterico, l'RNA a singolo e doppio filamento, le CpG non metilate, etc.

L'induzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL6 e TNF) e la conseguente risposta dell'ospite è particolarmente importante per le patologie infiammatorie indotte da componenti di origine batterica.

Le citochine sono proteine o glicoproteine, che possono essere secrete da quasi tutte le cellule e che possono determinare l'attivazione delle stesse cellule o di un gran numero di cellule bersaglio, interagendo con specifici recettori di superficie.

### 2.3 Toll-like receptors e loro ligandi

Tra i PRRs, hanno particolare importanza i membri della famiglia dei Toll-like receptor (TLR).

Il primo membro della famiglia Toll è stato identificato nel moscerino della frutta *Drosophila melanogaster* come gene *toll*, indispensabile, durante lo sviluppo embrionale, per lo stabilirsi della polarità dorso-ventrale (Anderson K.V. *et al.* 1985).

In seguito, ne è stato dimostrato il coinvolgimento nella risposta immunitaria antimicotica nell'insetto adulto (Lemaitre B. *et al.* 1996).

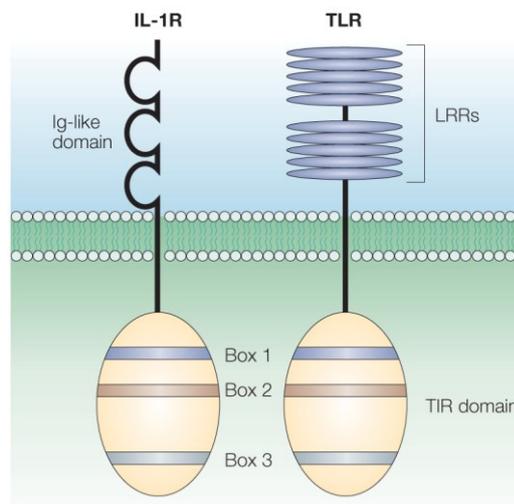
È stato successivamente identificato il primo omologo del recettore Toll nell'uomo (Medzhitov R. *et al.* 1997) in seguito identificato come TLR4 (Hoshino K. *et al.* 1999), e attualmente sono conosciuti 11 membri della famiglia dei TLR nei mammiferi.

I TLR sono glicoproteine integrali di membrana di tipo I (Fig.2.1) e vengono classificati tra i membri della più ampia famiglia di cui fa parte il recettore per l'interleuchina 1 (IL-1R). I TLR sono costituiti da un dominio extracellulare, che contiene da 16 a 28 residui in tandem di motivi ripetuti ricchi di leucina (LRR= Leucine-rich repeats) (Matsushima N. *et al.* 2007). Tutte le proteine note della famiglia LRR contengono moduli LRR ripetuti in tandem. Le più brevi hanno ne hanno 2 o 3, mentre le più lunghe arrivano a 40 motivi LRR. Nei motivi LRR possiamo distinguere una parte variabile costituita da 20-30 aminoacidi organizzati in un motivo conservato con una struttura LxxLxLxxN (Kobe B. and Kajava A.V. 2001). Il dominio LRR di

tutte le proteine della famiglia, forma una struttura arcuata a ferro di cavallo (Gay N.J. and Gangloff M. 2007), sulla cui superficie concava, ad esempio del TLR4 (Park B.S. *et al* 2009), o su quella convessa, come ad esempio quella dell'eterodimero TLR2/TLR6 (Kang J.Y. *et al.* 2009), avviene il riconoscimento del ligando specifico.

Il dominio LRR è unito al dominio intracellulare da una regione transmembranale.

Le regioni intracellulari dei TLR e dell'IL-1Rs possiedono una regione conservata di circa 200 aminoacidi nel dominio C-terminale conosciuta come dominio Toll/ IL-1R (TIR) (Janeway C.A. *et al.* 2002; Akira S. *et al.* 2004; Akira S. *et al.* 2006; Gay N.J. *et al.* 2007).



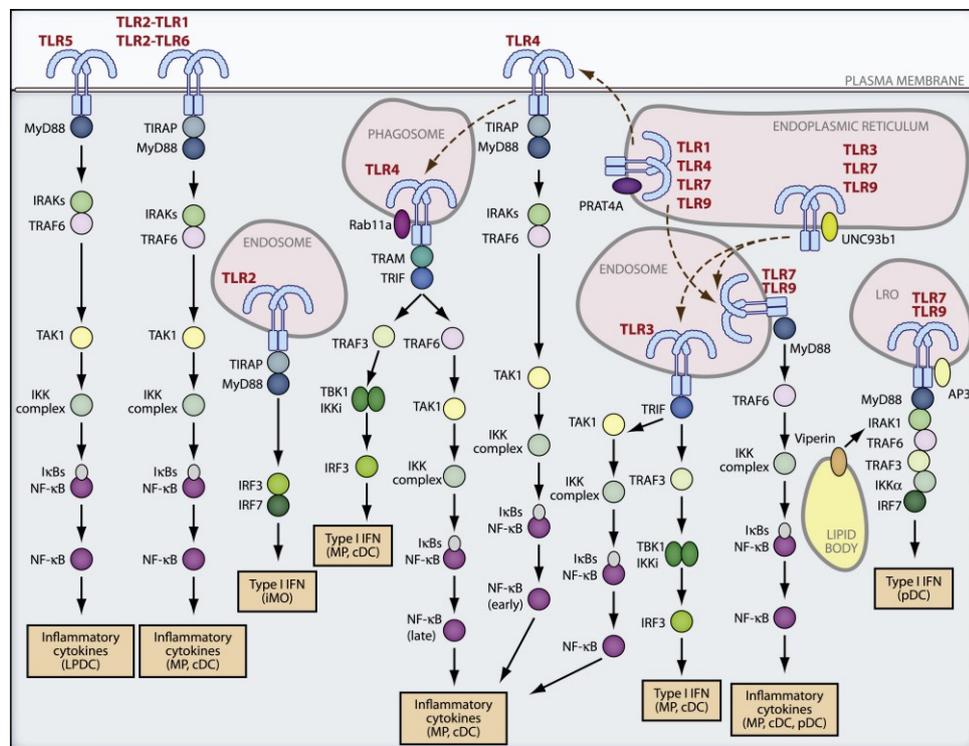
**Figura 2.1. Omologia del dominio TIR tra TLR e IL-1R. Da Akira S. *et al.* 2004.**

Diversamente da altri recettori di classe I, come ad esempio le tirosin-chinasi, il dominio citoplasmatico TIR non possiede attività enzimatica. Si pensa che la dimerizzazione o oligomerizzazione indotta dal riconoscimento del ligando determini una riorganizzazione dei domini TIR, che gli permette di fungere da impalcatura per il reclutamento, a valle, di proteine adattatrici (Gay N.J. *et al.* 2007), come il fattore di differenziazione mieloide D88 (MyD88 =

Myeloid Differentiation factor 88), nella porzione intracitoplasmatica, attraverso l'interazione omofilica dei loro domini TIR (Fig.2.2).

Ciò comporta l'attivazione della cascata di segnalazione a valle che culmina nell'induzione di geni codificanti per citochine e chemochine pro-infiammatorie e di interferone di tipo I (IFN) (Janeway C.A. *et al.* 2002; Akira S. *et al.* 2006;).

Tutti i TLR, tranne il TLR3, segnalano attraverso la via dipendente dal MyD88, mentre i TLR3 e TLR4 utilizzano un pathway dipendente da TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN  $\beta$ ).



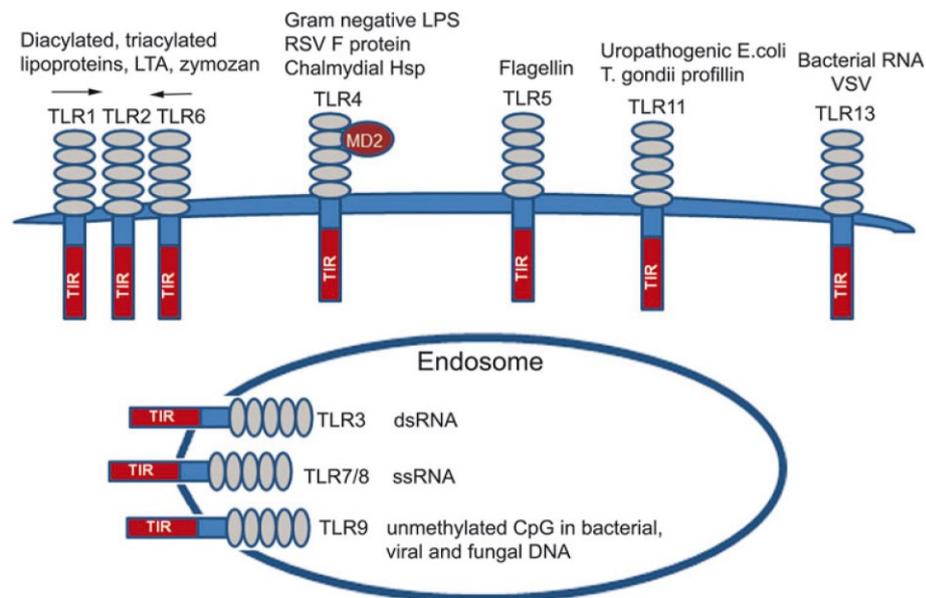
**Figura 2.2. Vie di segnalazione dei TLR (da Taro Kawai *et al.* 2011)**

Oltre al MyD88, si conoscono altre tre molecole adattatrici definite TIRAP/MAL (TIR-associated protein / MyD88-adaptor-like), TICAM1 (TRIF / TIR-domain-containing molecule 1), e TRAM (TRIF-related adaptor molecule).

L'interazione dei differenti TLR con la combinazione delle molecole adattatrici crea il substrato che richiama chinasi, fattori *transacting* e altre

molecole, eventi che inducono i fattori di trascrizione come NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ad indurre l'espressione dei geni target (Fig.2.2).

La localizzazione subcellulare dei TLR, riflette in qualche modo le caratteristiche dei loro ligandi. Come schematizzato nella figura 2.3, i TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR11 e TLR13 sono localizzati sulla superficie cellulare e vengono ritrovati nei fagosomi solo dopo l'attivazione, mentre i TLR3, TLR7, TLR8 e i TLR9 che sono coinvolti nel riconoscimento degli acidi nucleici (ssRNA, dsRNA virale) sono localizzati nei compartimenti intracellulari come gli endosomi (Akira S. *et al.* 2004; Medvedev A.E. 2013).



**Figura 2.3. Distribuzione dei TLR nei compartimenti sub-cellulari e specificità ligando/TLR. Da Medvedev A.E. 2013.**

I TLR possono riconoscere una grande varietà di ligandi che potremmo suddividere in sottofamiglie, in base alle caratteristiche chimiche. Come si può osservare dalla tabella 2, i TLR1, TLR2 e TLR6 sono deputati al riconoscimento di molecole lipidiche, mentre i TLR3, TLR7 e TLR9 al riconoscimento di acidi nucleici. Il TLR4, che può interagire con varie

molecole costimolatorie per il riconoscimento del ligando, sembra capace di riconoscere sia i lipidi come i lipopolisaccaridi e sia molecole di tipo proteico come quelle dell'envelope del virus sinciziale respiratorio (RSV).

Dalla tabella 2 è anche evidente che i TLR coinvolti nel riconoscimento dei PAMPs derivati dai micoplasmi sono il TLR2 (Lien E. *et al.* 1999; Seya T. *et al.* 2002; Kurokawa K. *et al.* 2012), il TLR1 che forma col precedente l'eterodimero TLR2/TLR1 (Jin M.S. *et al.* 2007) che lega i lipopeptidi triacilati, e il TLR6 (Takeuchi O. *et al.* 2001) che forma col primo l'eterodimero TLR2/TLR6 che gli permette di legare i lipopeptidi diacilati tipici dei micoplasmi (Kang J.Y. *et al.* 2009).

Infatti, le lipoproteine dei Gram - hanno tre acidi grassi, due dei quali uniti da un legame estere al glicerolo legato all'atomo di zolfo della cisteina N-terminale, mentre il terzo acido grasso è legato al dominio N-terminale tramite un legame aminico (Fig. 2.4A), mentre le lipoproteine dei micoplasmi e dei batteri Gram + possiedono due catene lipidiche per l'assenza della terza catena lipidica (Fig. 2.4B).

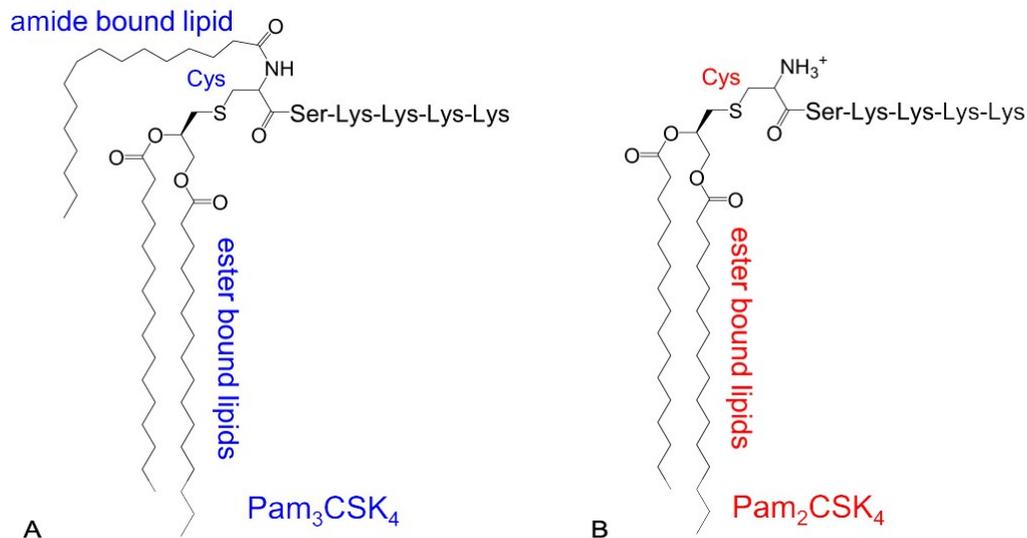
Esperimenti eseguiti utilizzando analoghi sintetici dei lipopeptidi o derivati da lipoproteine diacilate, hanno dimostrato che queste molecole possiedono la medesima attività biologica e che questa risiede nell'acilazione della cisteina N-terminale (Garcia J. *et al.* 1988; Okusawa T. *et al.* 2004). I terminali lipidici sintetici meglio conosciuti e spesso utilizzati nella sintesi dei lipopeptidi sono il N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]- (R)-cysteine (Pam3Cys) che rappresenta la versione sintetica della catena N-terminale della lipoproteina di Braun (Hankte K. and Braun V. 1973) che fa

TLRs	Ligands	Origin of ligands
TLR1/2	Triacyl lipopeptides (Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> )	Bacteria, mycobacteria
	Soluble factors	<i>Neisseria meningitidis</i>
	OspA	<i>Borrelia burgdorferi</i>
	Porin PorB	<i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoprotein/lipopeptides	A variety of pathogens
	Diacyl lipopeptides (Pam <sub>2</sub> CSK <sub>4</sub> and MALP2SK <sub>4</sub> )	Synthetic ligands
	Peptidoglycan	Gram-positive bacteria (not accessible in gram negative)
	Lipoteichoic acid	Gram-positive bacteria
	Lipoarabinomannan	Mycobacteria
	A phenol-soluble modulín	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	Glycoinositolphospholipids	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	Glycolipids	<i>Treponema maltophilum</i>
	Porins	<i>Neisseria meningitidis</i>
	Zymosan	Fungi
	Atypical LPS	<i>Leptospira interrogans</i>
	Atypical LPS	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
	Hsp70	Host
	Hyaluronan	Host
	Hemagglutinin	Measles virus
TLR3	Poly (I-C) dsRNA	Virus
TLR4	LPS	Gram-negative bacteria
	Flavolipin	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>
	ER-112022, E5564, E5531	Synthetic compounds
	Taxol	Plant
	Fusion protein	Respiratory syncytial virus
	Envelope proteins	Mouse mammary tumor virus
	Hsp60	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
	Hsp60	Host
	Hsp70	Host
	Type III repeat extra domain A of fibronectin	Host
	Oligosaccharides of hyaluronic acid	Host
	Polysaccharide fragments of heparan sulfate	Host
	Fibrinogen	Host
	αA crystallin and HSPB8	Host (recombinant <i>E. coli</i> -produced proteins)
	TLR5	Flagellin
TLR6/2	Diacyl lipopeptides	Mycoplasma
TLR7	Imidazoquinolines (imiquimod, R-848)	Synthetic compounds
	Bropirimine	Synthetic compounds
	Guanosine analogs	Synthetic compounds
TLR8	R-848	Synthetic compounds
TLR9	Unmethylated CpG DNA	Bacteria, virus, yeast, insects
	Chromatin-IgG complexes	Host
TLR10	Not Determined	Not Determined
TLR11	Not Determined	Uropathogenic bacteria
TLR13	Unmethylated RNA	23S ribosomal RNA

**Tabella 2. Ligandi dei Toll-like Receptor. Da Gay N.J. et al. 2007 aggiornata.**

da ponte tra la membrana interna ed esterna dei batteri Gram negativi, e il S-[2,3-bipalmitoyloxy-(2R)-propyl]-cysteinyl (Pam2Cys), analogo del Pam3Cys, che corrisponde alla catena lipidica del macrophage-activating

lipopeptide 2 (MALP-2) isolato dal *M. fermentans* (Muhlradt P.F., *et al.* 1997).



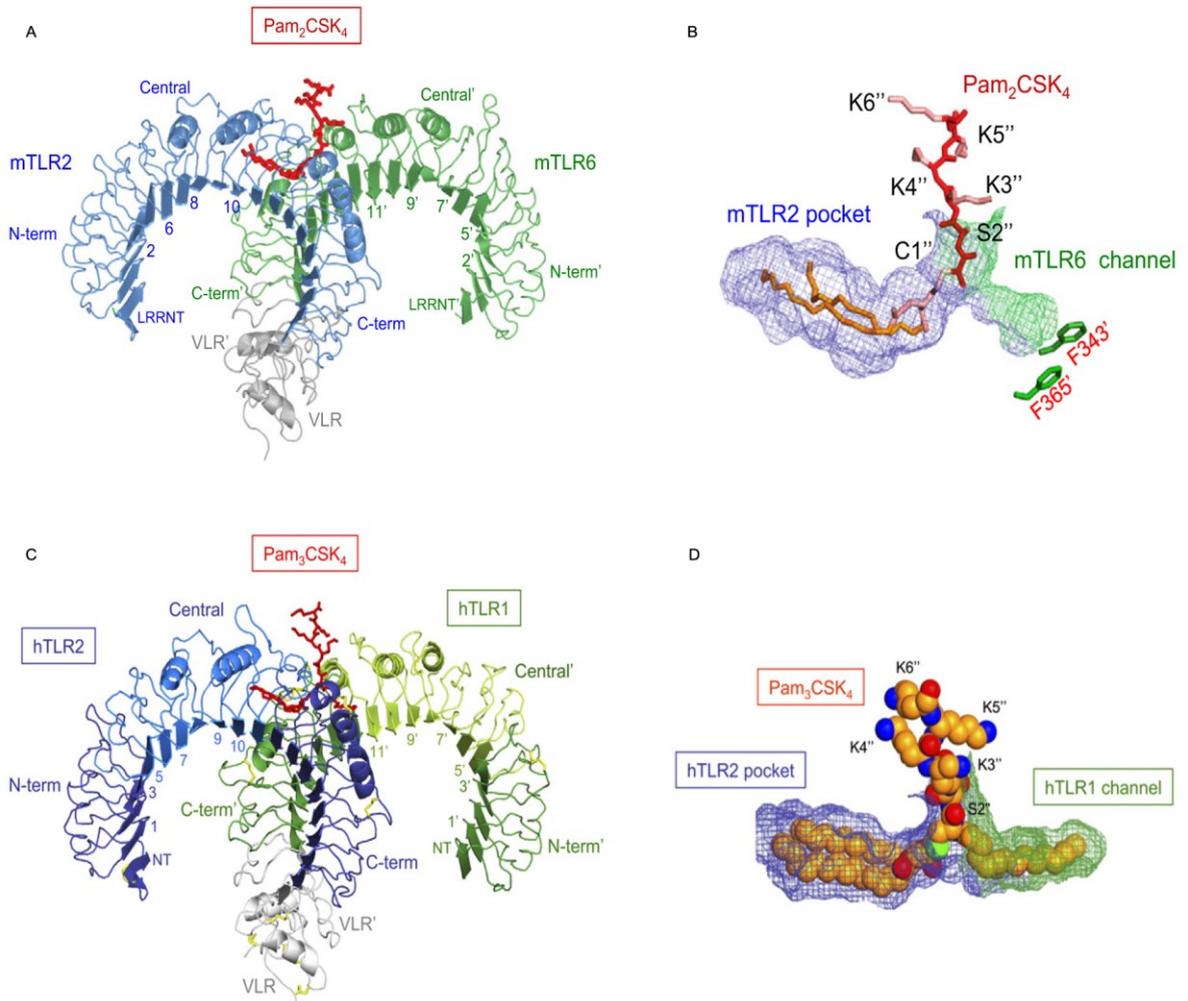
**Figura 2.4: Differenze nella struttura del lipopeptide palmitoilato triacilato Pam3CSK4(A) e diacilato Pa2CSK4 (B). Nei lipopeptidi triacilati, la terza catena lipidica è collegata alla cisteina attraverso un legame amidico. (Da Jin M.S. *et al.* 2007)**

Negli ultimi anni è stata riportata la struttura cristallina dell'eterodimero formato dal TLR2 sia con il TLR1 e il Pam3CSK4 (Jin M.S. *et al.* 2007), sia con il TLR6 e il Pam2CSK4 (Kang J.Y. *et al.* 2009).

Il TLR6 e il TLR1 possiedono il 56% di omologia nella sequenza, e una struttura nel complesso molto simile (Kang J.Y. *et al.* 2009). Le differenze sono però abbastanza importanti da giustificare la diversa affinità per i ligandi batterici di o triacilati.

Come si può osservare dalla figura 2.5 A e B, le due catene lipidiche del lipopeptide sintetico Pam2CSK4 sono accolte in una tasca idrofobica del TLR2 con il quale interagiscono, mentre il legame con la porzione peptidica, e soprattutto con i primi aminoacidi della catena, viene condivisa da entrambi

i TLR. Il TLR6 partecipa alla formazione del complesso col ligando, accogliendo in una piccola tasca i primi aminoacidi del Pam2CSK4.



**Figura 2.5: A) Complesso formato dall'eterodimero TLR2/TLR6/Pam2CSK4; B) Particolare della tasca recettoriale; C) Complesso formato dall'eterodimero TLR2/TLRq/Pam3CSK4; B) Particolare della tasca recettoriale; Da Kang J.Y. *et al.* 2009 e Jin M.S. *et al.* 2007;**

Dalla figura 2.5 C e D, si può vedere che la terza catena lipidica legata con legame aminico alla cisteina del complesso TRL2/TLR1/Pam3CSK4, viene accolta in una tasca del TLR1 che è molto più ampia di quella del TLR6, giustificando la specificità per i ligandi triacilati.

L'analisi della struttura cristallina del TLR6 ha reso evidente l'assenza del canale che accoglie la catena lipidica, che è invece presente nel TLR1 (Jin M.S. *et al.* 2007).

#### **2.4-Attività pro-infiammatoria di MALP e P48**

Numerosi report hanno messo in evidenza che i componenti della parete cellulare batterica come i lipopolissaccaridi, il peptidoglicano e la proteina di Braun, potevano essere riconosciuti dai fagociti attraverso specifici recettori di superficie, e che questo contatto risultava nella produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie.

Questo effetto era stato reso evidente in modo indiretto, attraverso l'attività mitogena esercitata sui linfociti B (Melchers F. *et al.* 1975).

I micoplasmi, sebbene manchino di parete cellulare, posseggono componenti di membrana che si comportano come potenti immunostimolatori dei macrofagi (Quentmeier H. *et al.* 1990; Muhlradt P.F. *et al.* 1996; Muhlradt P.F. *et al.* 1997).

Inizialmente questi composti vennero definiti come materiale ad alto peso molecolare (MDHM= high-molecular-weight material). L'attività immunomodulatoria del MDHM era stata osservata indirettamente sia per la capacità di determinare la maturazione dei precursori dei linfociti T citotossici, e sia per la sua capacità di indurre il rilascio di interleuchina 6 (IL-6), TNF $\alpha$ , IL-1 e ossido nitrico (NO) da parte di monociti e macrofagi (Quentmeier H. *et al.* 1990; Gallily R., *et al.* 1992; Muhlradt P.F., Frisch M. 1994).

L'evidenza che le lipoproteine batteriche sono potenti induttori della risposta immunitaria dell'ospite ne ha rilevato il ruolo nella patogenesi, rimarcando l'effetto potenziale su una vasta gamma di meccanismi di virulenza.

La dimostrazione che l'MDHM era una lipoproteina (Muhlradt P.F. *et al.* 1996) ha portato i ricercatori ad identificarlo con il MALP-2. Il MALP-2 (2-kD macrophage-activating lipopeptide), è stato isolato da un clone di *M. fermentans* esprime una sola variante di un lipopeptide con attività stimolatoria sui macrofagi e, a differenza delle lipoproteine batteriche convenzionali, possiede un terminale NH<sub>2</sub> libero. Il sequenziamento del genoma ha dimostrato l'assenza del gene codificante l'N-aciltransferasi responsabile del trasferimento del terzo acido grasso delle tipiche lipoproteine batteriche triacilate.

La struttura riportata e la sequenza aminoacidica del MALP-2 è S-(2,3-bisacyloxypropyl) cysteine-GNNDESNISFKEK.

Sia il MALP-2 naturale che il lipopeptide sintetico (Fig. 2.6) possiedono la stessa attività biologica, e la metà dell'effetto massimo si ottiene già ad una concentrazione di 0.02 ng/ml (Muhlradt P.F. *et al.* 1997), dimostrandosi una delle molecole con la più elevata attività stimolatoria sui macrofagi.

L'attività pro-infiammatoria del MALP-2 risiede nella capacità di questo lipopeptide di stimolare la sintesi di varie citochine e chemochine pro-infiammatorie come TNF $\alpha$ , IL6, IL8, GRO $\alpha$ , MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$  e MCP1 nei macrofagi, attraverso l'interazione con il TLR2 e TLR6 (Okusawa T. *et al.* 2004).

Ci sono numerose evidenze sperimentali che altre specie di micoplasma producono lipoproteine simili al MALP con attività biologica simile (Muhlradt P.F. *et al.* 1998; Rosati S. *et al.* 1999), confermando che la proprietà generale dei micoplasmi è l'induzione della reazione infiammatoria attraverso lipoproteine e lipopeptidi MALP-simili.

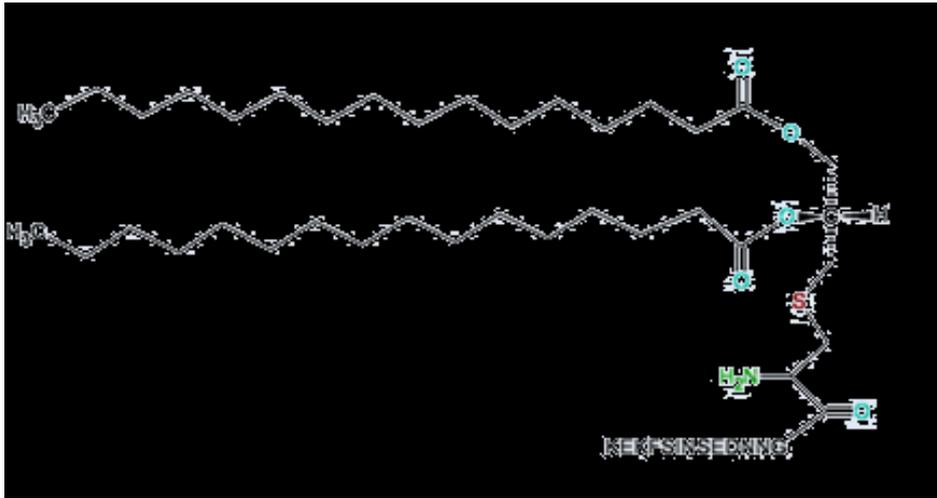


Figura 2.6: Struttura del MALP-2 di sintesi, S-[2,3-bispalmitoyloxy-(2R)-propyl]-cysteinyl-GNNDENISFKEK. Da <http://www.malp-research.de>

Il gene in singola copia *malp* di *M. fermentans* contiene una ORF che codifica per due proteine di membrana. La più piccola è il MALP-2, che corrisponde alla regione N-terminale del MALP-404 che invece rappresenta la lipoproteina matura di 41 kDa.

Queste due forme alternative sono probabilmente il risultato di processi post-trascrizionali e/o post-traslazionali (Davis K.L. and Wise K.S. 2002).

Studi precedenti sulla membrana di *M. agalactiae* avevano concluso che un'alta attività immunogenica era posseduta dalle lipoproteine di superficie con peso molecolare compreso nel range di 45±55 kDa (Tola S. *et al.* 1997).

Sappiamo anche che la P48 è una delle proteine quantitativamente più importanti durante il frazionamento con Triton X-114 (Pittau M. *et al.* 1990).

Studi indirizzati all'identificazione dei geni codificanti in *M. agalactiae* (Rosati S. *et al.* 1999) per caratterizzare i fattori di virulenza coinvolti nella patogenesi dell'agalassia contagiosa (AC) dell'ovino, avevano portato al sequenziamento dell'intera sequenza codificante per l'antigene maggiore di superficie P48, e ne hanno riscontrato la sua omologia col MALP-404 di *M. fermentans*.

## Capitolo 3

### *Artriti Batteriche*

#### **3.1- Micoplasmi e Artriti**

Le numero delle specie di *Mollicutes* conosciute negli animali sono numerose, ma solo una parte di queste viene riconosciuta come patogena. Le specie commensali però giocano un ruolo importante nel controllo ed eradicazione della patologia, perché gli epitopi antigenici espressi sulle membrane delle specie commensali mostrano un elevato grado di similarità con le specie patogene, vanificando procedure diagnostiche e terapeutiche.

È un argomento di particolare interesse che specie anche distanti filogeneticamente tra loro riescano a colonizzare le superfici articolari della specie ospite causando l'artrite, intesa come infiammazione acuta e/o cronica dei tessuti articolari.

Per quanto riguarda i ruminanti, il *M. bovis*, *M. leachii*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. agalactiae*, sono tristemente noti per essere causa di epidemie con forme di artrite e/o poliartite (Hum S. *et al.* 2000; Manso-Silvan L. *et al.* 2009), come anche il *M. meleagridis* e il *M. synoviae* nei polli e tacchini, il *M. hyorhinis* del suino, e infine il *M. arthritidis* nei roditori.

#### **3.2- *Mycoplasma agalactiae***

IL *Mycoplasma agalactiae* (Maga) è l'agente eziologico responsabile dell'Agalassia Contagiosa (AC), una malattia cosmopolita ad andamento acuto, subacuto o cronico che colpisce i gli ovini e i caprini. Questa malattia è conosciuta da più di due secoli, e in Italia venne descritta per la prima volta

nella prima metà del 1800. Il nome “Agalassia Contagiosa” le venne attribuito da Brusasco nel 1871 (Madanat A. *et al.*, 2001). È presente soprattutto nei paesi dove è praticato l’allevamento intensivo di pecore e capre a produzione lattea come il bacino del Mediterraneo e la penisola Balcanica, Asia, Africa, USA, mentre non è mai stata segnalata in Oceania (Bergonier D. *et al.* 1997).

In Sardegna i primi casi furono segnalati intorno ai primi anni ’80, quando la patologia venne importata con alcuni soggetti infetti dalla Sicilia. L’agente eziologico venne denominato inizialmente *Anulomices agalaxie*, nome che venne poi mutato definitivamente da Freundt nel 1957 in *Mycoplasma agalactiae*.

Maga ha un triplice tropismo: mammario, articolare e oculare, ma sono possibili anche localizzazioni all’apparato respiratorio e/o urogenitale.

Il contagio avviene principalmente per contatto diretto da animale ammalato ad animale sano attraverso il latte e le secrezioni lacrimali e, secondariamente, attraverso gli escreti. Possono fungere da serbatoio gli animali che possono essere portatori asintomatici per diversi anni.

Il sangue è uno dei mezzi di trasporto del micoplasma a seguito ad interventi iatrogeni, marchiatura e tosatura.

La via d’infezione inizialmente ritenuta abituale è la via intracanicolare mammaria ascendente attraverso il capezzolo, durante il processo di mungitura, sia esso eseguito manualmente sia con la mungitrice meccanica. Attualmente, col miglioramento della qualità e della pratica di allevamento e con la maggior consapevolezza dello stato fisiopatologico della mammella da parte degli allevatori, questa via è ormai divenuta marginale.

La AC tende a persistere diversi mesi in allevamento, con forte tendenza al ripresentarsi della sintomatologia clinica durante le lattazioni successive sugli stessi animali o su capi diversi se non vengono messi in pratica interventi

mirati. Quando Maga entra in un gregge, si manifesta rapidamente la sintomatologia tipica della malattia nel periodo dei parti e durante l'inizio della lattazione (Szeredi L. *et al.*, 2003) persistendo per settimane o mesi.

La terapia non è in grado di eliminare il microrganismo, garantendo la sua persistenza nel gregge e la recidiva nelle lattazioni successive in quello stesso allevamento (Villalba E.J. *et al.*, 1992).

I sintomi clinici, ben noti agli operatori del settore, sono quelli che vanno a costituire la cosiddetta triade caratterizzata da artrite, cherato-congiuntivite e mastite. Anche se raramente, la triade può essere osservata contemporaneamente nello stesso soggetto. Per quanto riguarda l'andamento dell'infezione, questa può decorrere in tre maniere diverse: asintomatica, acuta e cronica. I sintomi precoci sono ben poco caratteristici: debolezza, calo dell'appetito, ipertermia, lievi problemi neurologici e diarrea. Quando la sintomatologia è al contrario ben manifesta, può condurre l'animale in uno stato di emaciazione, al quale può seguire il rapido decesso senza il minimo sospetto di infezione da micoplasmi (Szeredi L. *et al.*, 2003).

Nella fase acuta della malattia, inizialmente si osserva un rialzo termico transitorio seguito da debolezza, inappetenza e agalassia; dal punto di vista anatomo-patologico viene classificata come mastite interstiziale, caratterizzata da tumefazione, aumento della temperatura e dolorabilità seguita da una grave riduzione della secrezione latte. Istologicamente si osserva l'infiltrazione del connettivo da parte di cellule mononucleate e di neutrofili, atrofia dei dotti secretori ed occasionalmente la desquamazione delle cellule epiteliali. Nei dotti si osserva la presenza di detriti e materiale eosinofilo; il secreto assume un colore giallo-verdastro o grigio-bluastrò con occasionali tracce ematiche, consistenza acquosa che in seguito diviene fioccosa e/o globulosa e può determinare l'ostruzione del dotto capezzolare.

Le forme articolari sono responsabili della rigidità articolare, claudicazione, fino alla completa impossibilità di movimento e del mantenimento della stazione quadrupedale. L'artrite, o poliartrite, si registra prevalentemente a carico delle articolazioni del carpo, tarso e ginocchio.

La sintomatologia artritica è riscontrabile prevalentemente nei becchi e nei montoni. Solo sporadicamente vengono segnalati episodi abortivi.

In conseguenza dell'elevata morbilità e delle perdite economiche che provoca, l'AC è inserita nella lista delle malattie notificabili dell'O.I.E (Office International des Epizooties). Oltre alle perdite in termini di riduzione della produzione latte, bisogna tenere conto delle perdite economiche dovute agli interventi farmacologici e ai costi per l'acquisto dei capi da rimonta.

Spesso le forme di artrite e di cheratocongiuntivite presentano un andamento tale da costringere l'allevatore all'abbattimento degli animali che non rispondono alla terapia. Il Maga è sensibile agli antibiotici della classe dei macrolidi e delle tetracicline, ma la terapia antibiotica si è rivelata efficace solo nell'attenuazione dei sintomi clinici e non nell'eradicazione del patogeno dall'allevamento.

### **3.3- Artriti infiammatorie croniche nell'Uomo**

Il sospetto che i micoplasmi potessero avere un ruolo nelle infiammazioni articolari croniche asettiche nell'uomo viene preso in considerazione già nei primi anni '70 (Taylor-Robinson D. and Keat A. 2001.). Infatti, l'idea che nelle patologie infiammatorie croniche come l'artrite reumatoide (RA) potesse entrare in gioco il ruolo scatenante diretto e/o indiretto di microrganismi ha intrigato un gran numero di ricercatori. La possibilità di un coinvolgimento microbico nell'RA si basa sulla conoscenza di numerosi agenti artritogeni negli animali e nell'uomo, e che queste artriti settiche

posseggono caratteristiche patologiche come alterazioni istologiche, immunologiche e autoimmunitarie in comune con la RA. Ad esempio l'artrite di Lyme sostenuta da *Borrelia burgdorferi*, nella quale, sebbene la distribuzione delle articolazioni colpite sia clinicamente diversa, l'aspetto istologico delle lesioni sinoviali è simile a quelle dell'RA.

Haier J. e collaboratori (Haier J. *et al.* 1999) riportano l'identificazione in PCR di *Mycoplasma spp.* dai PBMC di soggetti con RA. In particolare riportano una positività di 15 soggetti su 28. I micoplasmi identificati erano *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *M. hominis* e *M. penetrans*, e nel 36% dei soggetti le infezioni erano multiple.

Quando questo avveniva, una delle specie era sempre *M. fermentans*.

Altri autori riportano percentuali anche più alte con 31 su 34 soggetti con RA e 9 su 11 con altre forme di artrite positivi a *M. fermentans*, partendo in questo caso da prelievi di liquido sinoviale (Johnson S. *et al.* 2000).

Molti micoplasmi artritogeni causano anche sintomatologia respiratoria nell'ospite. È questo il caso del *M. pneumoniae*, che induce una polmonite atipica nell'uomo, ma anche sequele artritiche. Ramírez A.S. e collaboratori hanno cercato di stabilire la correlazione tra RA e infezioni sostenute da *M. pneumoniae*, valutando il titolo anticorpale (Ramírez A.S. *et al.* 2005). Pur fallendo nell'isolamento dell'agente infettivo, hanno messo in evidenza una forte correlazione tra RA e IgG anti- *M. pneumoniae*, consolidando l'ipotesi che un microrganismo poteva fungere da cofattore nella patogenesi dell'RA. Quest'ipotesi è anche supportata dall'evidenza che i micoplasmi sono la principale causa di artrite nei soggetti immunodepressi (Franz A., *et al.* 1997).

L'identificazione dei microrganismi con tecniche di biologia molecolare come la PCR, ha permesso da una parte di identificare rapidamente un microrganismo, ma ha lasciato irrisolto un quesito molto importante: come

facciamo a definire in modo sicuro e incontestabile che il batterio identificato in un'inflammatione articolare apparentemente asettica sia causa o meno di artrite?

Le conoscenze sui meccanismi di difesa dell'organismo, e la dimostrazione che il risultato finale dell'infezione dipende sia dalle caratteristiche genetiche dell'ospite che da quelle dell'agente patogeno suggerisce che alcune malattie ad eziologia sconosciuta possano essere determinate direttamente o indirettamente da agenti infettivi (Cassel G.H., 1998).

### **3.4- Le sinovie**

Per membrane sinoviali o sinovie s'intendono l'insieme delle strutture connettivali che rivestono la parte interna della capsula articolare, tappezzando internamente l'articolazione. Le sinovie comprendono la lamina superficiale continua di cellule, lo strato intimo, e il tessuto sottostante chiamato strato subintimo. L'intima è costituita da macrofagi, fibroblasti residenti e cellule infiltranti dalla matrice di collagene, mentre la lamina superficiale è costituita da sinoviociti. Nello spazio virtuale compreso tra le sinovie ritroviamo il liquido sinoviale, di solito ricco di acido ialuronico (Smith M.D. and Walker J.G., 2011).

Il liquido sinoviale è contenuto anche all'interno delle borse sinoviali. La funzione di questi elementi anatomici è di proteggere le strutture fra le quali sono interposte (ossa, tendini e muscoli), riducono l'attrito tra i capi ossei, permettono i movimenti e determinano una migliore distribuzione del carico e una riduzione delle sollecitazioni cui sono sottoposte le articolazioni. Nella sinovia possiamo distinguere due tipi principali di sinoviociti. I sinoviociti di tipo A, o cellule sinoviali macrofago-simili, che derivano da precursori della linea monocito-macrofagica ed esprimono il fenotipo della popolazione macrofagica residente (CD68+, CD11b+, CD14+, CD163+); queste cellule

rappresentano vere e proprie cellule della risposta immunitaria innata. Il secondo tipo di sinoviociti dell'articolazione, i sinoviociti B o Fibroblast-like Synoviocytes (FLS) sono le cellule che vanno a formare lo strato di rivestimento della capsula stessa. Queste cellule non possiedono marker fenotipici tipici delle cellule immunitarie, ma esprimono alcuni marker delle cellule mesenchimali come la vimentina (vim), il collagene di tipo IV e V, il V-CAM1 e la Cadherin-11 (Bartok B. and Gary S.F. 2010).

Queste cellule, pur se cellule di rivestimento, si comportano da cellule effettrici in corso di infiammazione contribuendo allo sviluppo e al perpetuarsi dell'artrite. L'interesse per gli FLS come effettori dell'immunità innata nasce dalla conferma, da parte di numerosi gruppi di ricerca, che essi esprimono TLR che quando attivati dal ligando aumentano l'espressione di molecole di adesione, di citochine e di metallo proteinasi della matrice (MMPs).

Gli FLS sono capaci di produrre varie citochine e chemochine pro-infiammatorie (Baumann H. and Kushner I. 1998; Steiner G. *et al.* 1999; Bartok B. and Gary S.F., 2010; Bottini N. and Firestein G.S., 2013;), tra le quali l'IL-6, il TNF- $\alpha$ , l'IL-8, il GM-CSF, il MIP-1 $\alpha$ .

Vari autori hanno dimostrato che l'espressione delle citochine nei FLS era dipendente dall'interazione dei ligandi per i TLR2, TLR4 e TLR6, e quindi dipendente dai meccanismi di difesa dell'immunitaria innata (Jung Y.O. *et al.* 2009; Goh F.G. and Midwood K.S. 2012).

Nel caso limite dell'RA dell'uomo, i FLS subiscono delle alterazioni genetiche e una conseguente trasformazione simil-neoplastica in risposta all'ambiente ricco di mediatori proinfiammatori, che gli conferiscono la capacità di invadere i tessuti sottostanti andando a determinare l'attivazione degli osteoclasti. L'emivita aumentata porta, insieme al richiamo in loco di altre cellule infiammatorie nell'articolazione colpita, all'accumulo di FLS e

alla formazione del “panno” (Bartok B. and Gary S.F. 2010; Feldmann M. *et al.* 1996).

L'importanza delle citochine pro-infiammatorie nell'RA e in altre forme di artrite asettica cronica è dimostrata dall'effetto terapeutico delle cure anti-TNF-  $\alpha$  e anti-IL6 (Feldmann M. *et al.* 2005; Nishimoto N., *et al.* 2004; Maini R.N. and Taylor P.C. 2000).

Un altro ruolo dei FLS nelle artriti è quello di rappresentare il maggior produttore, col contributo di altre cellule (macrofagi, polimorfonucleati, linfociti, cellule endoteliali, etc), di ossido nitrico (NO) quando sottoposti ad uno stimolo inducente da parte delle citochine (Farrell A.J. *et al.* 1992; McInnes I.B. *et al.* 1996).

## Capitolo 4

### *Scopo del lavoro*

Partendo dall'ipotesi che la risposta immunitaria dell'ospite innescata dall'interazione con le lipoproteine e i lipopeptidi dei micoplasmi rappresenti il meccanismo patogenetico comune dei micoplasmi artritogeni, abbiamo focalizzato l'attenzione sui sistemi di attivazione della risposta immunitaria acquisita indotta dai lipopeptidi diacilati di micoplasma. Sappiamo che i micoplasmi possiedono un elevato numero di PAMP che sono in grado di essere riconosciuti dai TLR dei macrofagi, attivando le vie di trasduzione del segnale che attiva alcuni fattori di trascrizione tra cui il più importante sembra essere l'NF- $\kappa$ B, che regola la trascrizione di geni codificanti citochine, chemochine, molecole costimolatorie ed altri fattori immunomodulatori.

Nel 1999 è stata caratterizzata un'importante lipoproteina antigenica di superficie di *Maga*, che rappresenta un antigene maggiore di membrana. Il prodotto maturo, la proteina P48, ha mostrato una significativa omologia e motivi aminoacidici conservati, con lipoproteine di *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *Borrelia* spp., *Bacillus subtilis* e *Treponema pallidum* (Rosati S. *et al.* 1999). La P48 è stata identificata come antigene immunodominante, che viene espressa in elevata quantità rispetto ad altre proteine e viene precocemente riconosciuta dal siero di animali infettati naturalmente o sperimentalmente (Rosati S. *et al.*, 1999). Questa proteina presenta immunodominanza, assenza di variabilità intraclonale e una costante espressione in tutte le fasi dell'infezione.

La P48 è anche il principale prodotto quantitativamente rilevabile nel frazionamento con Triton X-114 (Pittau M. *et al.* 1990.); inoltre, la porzione

Antonio Giovanni Anfossi

"ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI"

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

proteica è fortemente idrofila e condivide motivi conservati con la proteina di membrana MALP-404 di *M. fermentans* (Seya T. *et al.* 1998), le cui attività biologiche sono legate alla attivazione del complemento e all'induzione di citochine. Precedenti analisi in Western blot (WB) avevano dimostrato che la proteina P48 è uno degli antigeni riconosciuti precocemente all'inizio dell'infezione (Contini A. *et al.*, 1989), e un test ELISA indiretto basato su questa proteina di membrana era stato proposto per la diagnosi di AC (Rosati S. *et al.* 2000). Questo rende la P48 un punto di partenza ideale per provare a chiarire i meccanismi patogenetici e immunomodulatori in corso di artriti.

Lo scopo del lavoro è stato quello di sintetizzare un lipopeptide diacilato con formula S-(2,3-bisacyloxypropyl)-cysteinyI CGDKYFKETEVDGV che abbiamo chiamato LipoP48, derivato dalla P48 di *Micoplasma agalactiae*, e di valutarne la capacità di modulare la risposta immune nei confronti di linee cellulari ovine di FLS.

Allo scopo di valutare l'effettiva capacità immunomodulatrice del LipoP48, abbiamo messo a punto i protocolli sperimentali su cellule deputate alla risposta immunitaria come i monociti (MΦ).

L'attivazione delle cellule in seguito a stimolazione con il lipopeptide è stata valutata attraverso la misurazione, in Real-Time PCR quantitativa relativa ( $\Delta\Delta$ -CT), dell'espressione delle citochine IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, Mip1 $\beta$ , GM-CSF, mentre l'espressione di TLR2, MHCII, CD80 e CD86 e la capacità di attivazione attraverso la produzione di NO sono state valutate mediante l'analisi al microscopio confocale.

## Capitolo 5

### *Materiali e Metodi*

#### **5.1 Scelta degli animali e prelievo dei campioni**

Per i prelievi del sangue necessario per le colture monocitarie e per i prelievi di FLS, sono stati scelti animali del Dipartimento di Veterinaria precedentemente testati tramite coltura batterica durante il periodo di lattazione dei capi e risultati negativi per AC.

#### **5.2 Colture cellulari**

##### **Monociti**

Le colture cellulari sono state allestite a partire da prelievi di sangue di ovini in provette con EDTA, e processati entro 1h dal il prelievo.

La procedura è la seguente:

1. Trasferire 10 ml di sangue, in una falcon da 50 ml.
2. Aggiungere un uguale volume di PBS 1X-EDTA 0,5 mM e risospendere bene il campione pipettando ripetutamente.
3. Si trasferiscono 15 ml di Ficoll (GE Healthcare) in una seconda falcon da 50 ml.
4. Si versa goccia a goccia il sangue diluito sul Ficoll, facendo in modo che il sangue si stratifichi senza mescolarsi al ficoll.
5. Si centrifuga a 500x g per 30' alla temperatura di 25°C.
6. Si elimina lo strato di plasma superficiale e si recupera lo strato ricco di PBMC trasferendolo in una nuova falcon da 50 ml.
7. Si effettuano dei lavaggi con tre volumi di PBS 1X-EDTA 0,5mM e si centrifuga a 200x g per 10' a 25°C.

Antonio Giovanni Anfossi

“ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

8. Si fa decantare il surnatante.
9. Se nel pellet permane la presenza di eritrociti, si risospende il pellet in 2 ml di Red Blood Cell Lysis buffer, a temperatura ambiente per 10'.
10. Si effettuano i lavaggi in PBS 1X-EDTA 0,5mM centrifugando a 300x g per 10'a 25°C.
11. Si fa decantare il surnatante, si risospende il pellet in PBS 1X-EDTA 0,5mM e si centrifuga a 300x g per 10' alla temperatura di 25°C.
12. Se necessario si ripete il trattamento con Red Blood Cell Lysis buffer.
13. Ottenuto un pellet pulito si risospende in terreno RPMI I.
14. Si effettua la conta delle cellule con il conta cellule Scepter-Millipore (Handheld Automated Cell Counter) utilizzando puntali da 40 µm.
15. Si distribuiscono nelle piastre per colture cellulari (orange scientific) da 96 well circa 60'000 per pozzetto.
16. Si incubano le cellule a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 4 ore.
17. Allo scopo di ottenere una coltura di monociti il più possibile pura, dopo le 4h si sostituisce il terreno con il RPMI II preceduto da 2-3 lavaggi in PBS 1X, allo scopo di allontanare le cellule che non aderiscono (linfociti e polimorfonucleati)
18. Si lascino le cellule ad incubare a 37°C con il 5% CO<sub>2</sub> per 24 ore circa.
19. Dopo le 24h si eseguiva la stimolazione.

### **Fibroblast-like Synoviocytes**

Le colture di FLS sono state allestite a partire da prelievi ottenuti per dissociazione enzimatica di cellule sinoviali provenienti da articolazioni femoro-tibio-rotulee di agnelli sani, e gentilmente fornite dalla D.ssa Puggioni G. dell'IZS della Sardegna.

Le cellule venivano coltivate in DMEM supplementato, a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>.

Per la quantificazione delle citochine, le cellule venivano espanse in fiasche da 75 ml e, quando arrivavano al 80-85% venivano tripsinizzate e subcoltivate in multiwell da 24 (Becton Dickinson Labware).

Quando subconfluenti, venivano effettuati gli esperimenti di stimolazione.

Per gli esperimenti di immunofluorescenza, le cellule venivano coltivate in Chambers slide da 4 pozzetti e stimolate quando la confluenza era dell'80-85 %

### 5.3 Sintesi del LipoP48

Come abbiamo visto, le lipoproteine di membrana dei micoplasmi sono altamente antigeniche e rappresentano la chiave per la diagnosi e lo sviluppo di vaccini. Tuttavia, la scoperta di proteine di superficie nel micoplasma è complicato dall'esistenza di meccanismi volti ad evadere la risposta immunitaria dell'ospite. Al momento, una delle proteine di superficie di Maga che è dimostrato essere costantemente espressa e altamente immunogena è la lipoproteina P48 (Cacciotto C. *et al.* 2010).

Viste le omologie del MALP 404 con la P48 (Rosati et al 1999) e che la sequenza della porzione N terminale determinata con la degradazione di Edman indicava il probabile sito di clivaggio della proteina, abbiamo fatto sintetizzare un lipopeptide diacilato sintetico, facendo unire i 14 aminoacidi immediatamente a monte del residuo di cisteina di un tipico peptide leader (Fig. 5.1), che rappresenta il probabile sito di acilazione al quale si unisce il palmitato, ad un lipide diacilato sintetico chiamato Pam2Cys (S-(2,3-bisacyloxypropyl)-cysteinyl) che viene riconosciuto dal TLR 2. La molecola

così disegnata presenta forti analogie con il MALP-2 di *M. fermentans* (Fig. 2.6), che come ho accennato prima, è un potentissimo immunomodulatore.

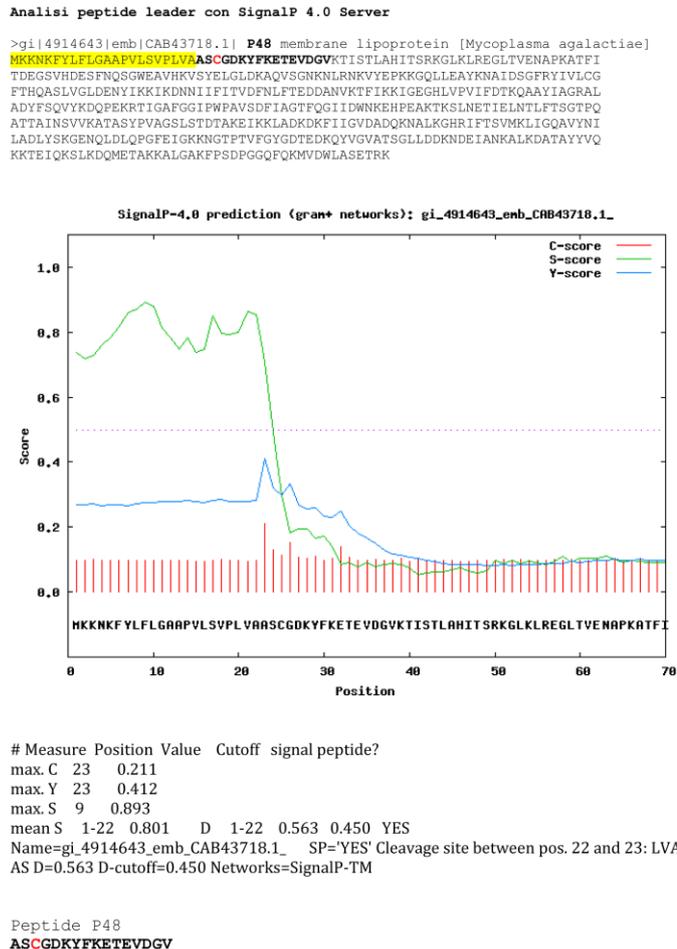


Figura 5.1: Analisi del Peptide Leader che indica il probabile sito di clivaggio tra la posizione 22 e 23: LVA-AS.

## 5.4 Stimolazione dei monociti e dei FLS

### Stimolazione dei monociti

I monociti sono stati stimolati con alcuni PAMPs e raccolti a tre tempi diversi; T1 (un'ora post- stimolazione), T3 (tre ore post-stimolazione) e T5 (cinque post-stimolazione).

Per ogni tempo venivano allestiti:

- tre pozzetti di controllo non stimolati
- tre stimolati con lipopolisaccaridi (LPS from *E. Coli*. Sigma L 4516)

Antonio Giovanni Anfossi

"ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI"

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

- tre con lipoproteine totali di Maga.
- tre con il LipoP48.
- tre con il lipopeptide MALP 2 (Alexis Biochemicals).

Le lipoproteine venivano risospese in una “soluzione di risospensione” allestita con 1 ml di PBS contenente una soluzione 25mM di n-octyl-D-glucopyranoside (ad 1 ml di PBS sono stati aggiunti 7,309 mg di n-octyl-D-glucopyranoside). Si è ottenuta così una concentrazione finale di 100 µg/ml.

Il LipoP48 (2 mg totali) è stato risospeso nella soluzione per risospendere il Lipopeptide, costituita da 1 ml di PBS contenente 2.5% (v/v) di 2-propanolo, 25mM di n-octyl-D-glucopyranoside e l'1% (wt/v) di albumina sierica umana (per 1 ml: PBS 875 µl + 25 µl di 2-propanolo + 10 mg albumina sierica umana + 7,309 mg di n-octyl-D-glucopyranoside). Si è ottenuta così una concentrazione di 2 mg/ml.

50 µl di questa soluzione (2 mg/ml) sono stati diluiti in 950 µl di soluzione per risospendere il lipopeptide (ottenuta come la precedente) per ottenere una concentrazione di 100 µg/ml finali.

Per il Malp-2, 50 µg della soluzione madre (0,1mg/ml) sono stati diluiti in 500 µl di soluzione per risospendere il lipopeptide (concentrazione finale di 100 µg/ml).

Per valutare l'espressione dose-dipendente delle citochine, quando i FLS raggiungevano il 70-80% di confluenza venivano trattate con concentrazioni crescenti di LipoP48 e LPS (come controllo interno) per 3h. Le concentrazioni utilizzate erano di 0,01-0,1-1-10 e 100 µg/mL.

Per valutare l'espressione temporale delle varie citochine/chemochine espresse, i FLS venivano stimolati con LipoP48 e LPS alla concentrazione rispettivamente di 10 µg/mL e 1 µg/mL per 3-6-9-12 e 24h.

Dopo la stimolazione, il surnatante veniva rimosso e stoccato a -80°C per altre analisi eventuali, i monociti aderenti e i FLS venivano recuperati

utilizzando il buffer di lisi del kit RNeasy Mini Kit della Qiagen e successivamente si procedeva all'estrazione dell'RNA come da protocollo del produttore dello stesso kit.

Una volta estratto, l'RNA è stato retrotrascritto con il Kit First Strand cDNA Synthesis della Promega, utilizzando Random Primers.

### 5.5 Quantificazione dell'espressione delle citochine e chemochine

Il cDNA è stato testato in PCR per amplificare i geni corrispondenti alle varie citochine, clonarli e utilizzarli come controlli positivi in Real Time PCR quantitativa relativa.

Per ogni citochina/chemochina il protocollo di amplificazione è stato il seguente con, come unica variazione, i primers utilizzati per l'amplificazione:

<b>H<sub>2</sub>O MilliQ sterile</b>	<b>40.8 µl/campione</b>
<b>10x buffer</b>	<b>5 µl “</b>
<b>dNTP 10 mM</b>	<b>1 µl “</b>
<b>Primer F1 10 µM (0.2 µM finale)</b>	<b>1 µl “</b>
<b>Primer R1 10 µM (0.2 µM finale)</b>	<b>1 µl “</b>
<b>Taq DNA Polymerase 5 U/µl</b>	<b>0.2 µl “</b>
<b>DNA Sample</b>	<b>1 µl “</b>

E il protocollo di Temperature il seguente:

Antonio Giovanni Anfossi

“ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

3' a 94 °C  
1' a 94 °C  
1' a 53 °C  
30' a 72 °C  
10' a 72 °C

} per 35 cicli

fase illimitata a 10°C

Ogni reazione di PCR, per una determinata citochina, è stata allestita con i seguenti primers:

#### IL-1 β:

Primer F: GGTTGATGGCCCTAAACAGA

Primer R: CATCACGGAAGACATGTTCG

Lunghezza attesa dell'amplificato 185 bp

#### IL-6

Primer F: TGCTTGATCAAAACCACTGC

Primer R: GCATCTTCTCCAGCATGTCA

Lunghezza attesa dell'amplificato 196 bp

#### IL-8

Primer F: TGCTCTCTGCAGCTCTGTGT

Primer R: CACACCTCTTTCCGTTGGT

Lunghezza attesa dell'amplificato 190 bp

#### TNF-α

Antonio Giovanni Anfossi

"ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI"

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

Primer\_F: CAACATCCTCTCTGCCATCA

Primer\_R: TATTCCGGCAGGTTGATCTC

Lunghezza attesa dell'amplificato 150 bp

GM-CSF

Primer\_F: ACTGCTGCTGTGATGGATGA

Primer\_R: GGGGGCAGTGTTTCTTGATAG

Lunghezza attesa dell'amplificato 175 bp

Mip-1 $\beta$

Primer F: AAGCTCTGCGTGACTGTCCT

Primer R: GGCTGCTGGTCTCGAAGTAG

Lunghezza attesa dell'amplificato 156 bp

I vari amplificati ottenuti in PCR, corrispondenti alle citochine di interesse, sono stati purificati e clonati nel plasmide pCR-4 (TOPO TA Cloning, Invitrogen). Una volta digeriti, i plasmidi contenenti l'inserto sono stati controllati su gel di agarosio all'1%

I plasmidi sono stati poi inviati alla BMR-GENOMICS per il sequenziamento.

## 5.6 Real Time qPCR

Per valutare l'espressione delle citochine in qPCR è stato utilizzato il Kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega A6001). Ogni esperimento è stato allestito in triplicato per ogni campione, utilizzando come gene house-keeping il GAPDH. Il protocollo di amplificazione, adattato ai primers specifici di ogni citochina, era il seguente:

Antonio Giovanni Anfossi

"ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI"

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

### qPCR mix

Master Mix	12,5 µl
CXR	0,25 µl
Primers R 10 µM	0.5 µl
Primers F 10 µM	0.5 µl
cDna	5 µl
H <sub>2</sub> O MQ fino a	25 µl

Protocollo di Temperature:

2' a 95 °C

15'' a 95 °C  
1' a 60 °C } per 40 cicli  
15'' a 95 °C  
15'' a 60°C  
15'' a 95 °C

### 5.7 Espressione di TLR2, MHCII, CD80 e CD86

Per valutare l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II, e delle molecole costimolatorie CD80 e CD86, gli FLS venivano coltivati in chamber slide da 4 pozzetti (X16 Lab-tek CC2 Thermo Fisher Scientific), e quando raggiungevano il 70-80% di confluenza venivano stimulate con 1 µg/mL di LipoP48 per 3h. Gli esperimenti venivano eseguiti

Antonio Giovanni Anfossi

"ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI"

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

in triplicato e comprendevano triplicati di controllo dell'espressione e controlli positivi e negativi per l'immunofluorescenza (es. omissione dell'anticorpo I°).

Dopo la stimolazione le cellule venivano fissate in alcool-acetone 50/50 v/v per 20' a -20°C, e asciugate all'aria. Dopo trattamento con BSA 2% per 2h, si effettuava l'incubazione ON con l'anticorpo primario. Per il TLR2 e per l'MHC-II abbiamo utilizzato rispettivamente lo human anti-bovine CD282:FITC (AbD Serotec. Clone HCA151F) e il mouse anti-sheep MHC CLASS II:RPE (AbD Serotec. Clone MCA2225PE) entrambi già marcati. Per la valutazione dell'espressione di CD80 e CD86, gli anticorpi utilizzati sono stati il mouse anti-bovine CD80 (Gentaur. Clone IL-A159), il mouse anti-bovine CD86 (Gentaur. Clone IL-A190). Questi ultimi due anticorpi non sono marcati, quindi dopo incubazione ON con l'anticorpo primario, si è proceduto all'incubazione per 2h con il goat anti-mouse IgG (H/L):FITC (Gentaur. Polyclonal IgG). Dopo lavaggio con PBS, le camere delle chamber slide venivano rimosse e si procedeva al montaggio del vetrino coprioggetto con un medium acquoso per fluorescenza (Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium - Sigma-Aldrich).

Tutti i campioni sono stati osservati e scansionati al microscopio confocale Leica SP5 equipaggiato con un obiettivo ad immersione 40X con apertura numerica di 1.25.

Le lunghezze d'onda di eccitazione erano 488 nm per il FITC e 568 nm per l'RPE.

Per valutare se l'effetto stimolatorio del LipoP48 era dovuto alla molecola nella sua interezza, abbiamo effettuato delle stimolazioni di controllo utilizzando separatamente le due porzioni, la sequenza peptidica CGDKYFKETEVDGV e la molecola lipidica *S*-(2,3-bispalmitoyloxypropyl)-cysteine (Pam2Cys).

Infine per stabilire se l'effetto stimolatorio sull'espressione dell'MHCII, del TLR2, di CD80 e CD86 era dovuto al legame con il TLR2, abbiamo ripetuto gli esperimenti di stimolazione bloccando preventivamente il TLR2 con l'anticorpo di blocco TLR2.1 (anti-human Toll-like receptor 2 (CD282) purified TL2.1 eBioscience) per 1h prima della stimolazione.

## **5.8 Induzione della produzione di Ossido Nitrico**

Per valutare se i FLS ovini dopo stimolazione erano in grado di contribuire al danno articolare attraverso la produzione di ossido nitrico (NO), abbiamo utilizzato un kit per il rilevamento al microscopio (NO Detection Kit, Enzo Life Sciences) seguendo le indicazioni del produttore. Il controllo positivo era rappresentato dalle cellule trattate con la L-Arginina, induttore di NO, mentre il controllo negativo era rappresentato dalle cellule trattate preventivamente con c-PTIO (2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide).

## **5.9 Test di citotossicità**

Per stabilire se il LipoP48 aveva un effetto tossico sui FLS, abbiamo applicato una metodica in situ che prevede l'utilizzo del Trypan Blue (Perry S.W *et al.*, 1997). Brevemente: i FLS venivano coltivati su vetrini copri-oggetto da 12mm in multiwell da 24 e trattati a concentrazione crescente del ligando per 3h. Dopo lavaggio le cellule venivano trattate con Trypan Blue 0,2% per 1 minuto.

Rimosso il colorante le cellule venivano fissate in paraformaldeide al 4% per 10 minuti a 20°-22°C.

A questo punto i coprioggetto venivano lavati abbondantemente per eliminare il colorante residuo e disidratate attraverso passaggi sequenziali di un minuto in alcool 70° e 95°, 3 x 1 minuto in alcool 100°, immersione in xilolo e montaggio in Eukitt® mounting medium.

I campi microscopici venivano poi fotografati con il microscopio Nikon DS-L2 equipaggiato con obiettivo 40X e con il software dedicato Nikon 3422.1001.1798.080117. La quantificazione delle cellule positive era determinata per mezzo del software automatizzato Zeiss Axiovision ver. 4.4.

## 5.10 Terreni e reagenti

Materiale necessario per le colture cellulari (monociti e sinoviociti di tipo B):

### **PBS 1X:**

PBS tablets (Gibco® - Life Technologies)

### **EDTA 100mM**

FW: 372,2  
37,22 g/L

### **Terreno I:**

RPMI 1640	50 ml
100X L-glutamina	500 µl
100X Aminoacidi non essenziali	500 µl
100X Antibiotico/Antimicotico	500µl
100X Vitamine	500 µl
Gentamicina 1:1000	50 µl
2-Mercaptoetanololo 50mM	17.35 µl

### **Terreno II:**

Antonio Giovanni Anfossi

“ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

RPMI 1640	50 ml
100X L-glutamina	500 µl
100X Aminoacidi non essenziali	500 µl
100X Antibiotico/Antimicotico	500µl
100X Vitamine	500 µl
Gentamicina 1:1000	50 µl
2-Mercaptoetanol 50mM	17.35µl
Sodio piruvato 100mM	diluire 1/100
Siero fetale bovino inattivato al 10%	

### **Terreno per FLS**

DMEM	500 mL
Siero Fetale Bovino 10%	50 mL
Peni/Strepto + Gentamicina	1 mL

### **Tripsina**

Tripsina al 2,5%

### **Red Blood Cell Lysis buffer**

NH <sub>4</sub> Cl	0,16 M
Tris HCl pH= 7.6	0,17 M
Working Solution	9:1

La soluzione viene portata a pH 7.2 con HCl

### **PPLO medium**

PPLO broth	21 g/L
Tryptone	10 g/L
Yeast extract	5 g/L

Antonio Giovanni Anfossi

“ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

Horse serum                      20% v/v  
H<sub>2</sub>O MilliQ a volume

**Mycoplasma solid medium**

Blood agar base                40 g/L  
Horse serum                      20% v/v  
H<sub>2</sub>O MilliQ a volume

**TAE buffer**

Tris acetato                      0.04 mM  
EDTA                                1 mM

## Capitolo 6

### *Risultati*

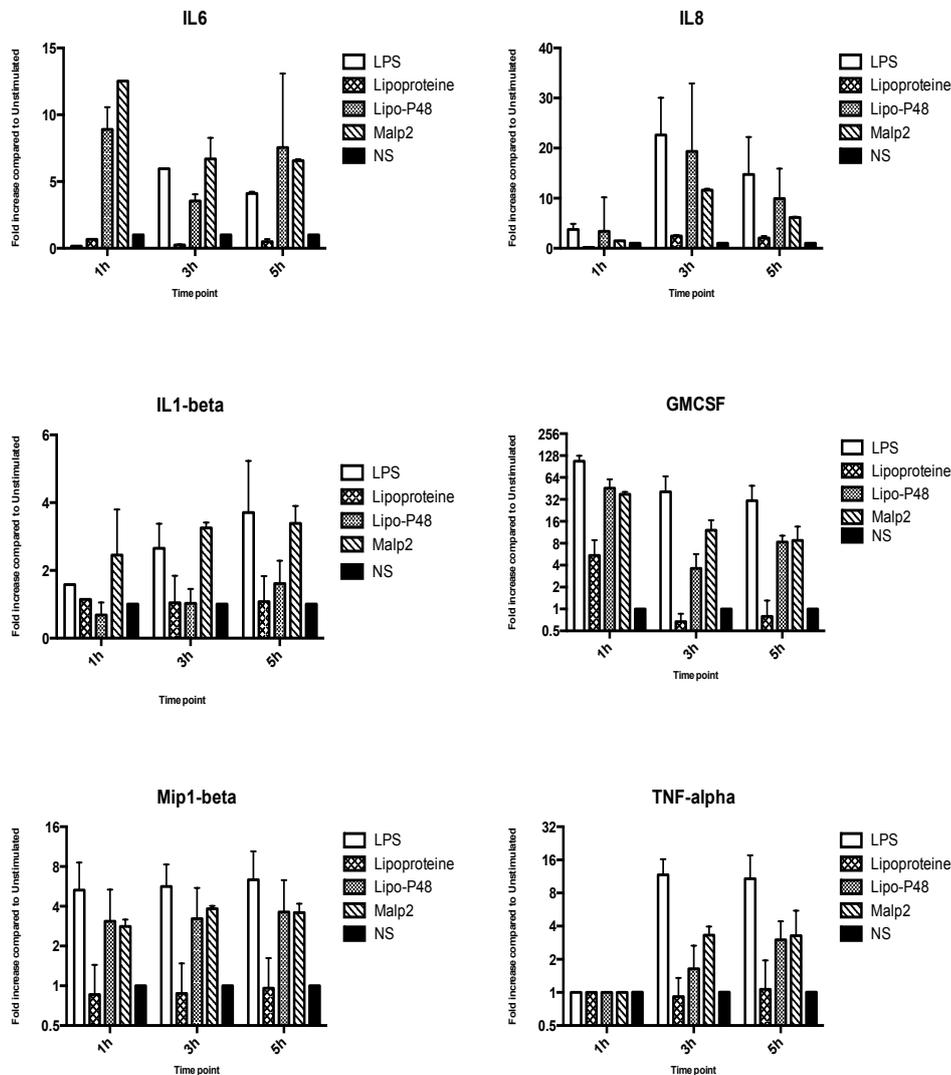
#### **6.1-Espressione delle citochine nei monociti stimolati.**

Il cambiamento morfologico indotto nelle cellule stimolate con il lipoP48 suggerisce l'attivazione dei monociti. Per misurare questa variazione ci siamo avvalsi dell'analisi dell'espressione genica della principali citochine implicate nelle prime fasi della risposta immunitaria.

Con lo scopo preliminare di valutare la funzionalità del LipoP48 su cellule della risposta immunitaria e valutare la cinetica della produzione delle citochine da parte di queste cellule, le colture primarie di monociti di ovino sono state stimolate a tempi crescenti (1h - 3h - 5h) con le lipoproteine totali di un ceppo di campo di *Mycoplasma agalactiae*, con il lipoP48 e con MALP-2. Cellule stimolate con LPS sono state utilizzate come controlli interni in quanto riconosciuti dal TLR4.

Dai risultati illustrati nella tavola 6.1 relativa all'espressione delle citochine e chemochine, mostrano una chiara e robusta induzione dell'espressione di IL6, di IL8, GM-CSF, Mip1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nelle cellule stimolate con il lipoP48. Questa induzione si evidenzia già dopo un'ora post-stimolazione per IL6, e dopo 3 ore dalla stimolazione per IL8. L'aumento di espressione rispetto al controllo non stimolato raggiunge il valore più elevato per il GM-CSF già dopo la prima ora post-stimolazione per poi attenuarsi alla quinta ora. Il Mip1 $\beta$  si mantiene invece costantemente espresso ad elevati livelli dalla prima alla quinta ora dalla stimolazione. I risultati relativi alla citochina TNF- $\alpha$  mostrano un aumento dell'espressione a 3 ore e 5 ore dalla stimolazione, mentre non è stato possibile evidenziare un aumento

dell'espressione dei geni specifici nelle cellule stimulate alla prima ora, comprese le cellule trattate con LPS. Di modesta entità, ed evidenziabile solo alla 5 ora dalla stimolazione, risulta l'espressione di IL1 $\beta$  nelle cellule stimulate con il lipopP48.



**Tavola 6.1:** Espressione genica delle citochine IL1-beta, IL6, IL8, GM-CSF, Mip1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  dopo stimolazione (1h, 3h, 5h), di monociti di pecora con: - lipoproteine totali di *M. agalactiae*, - lipoP48 di *M. agalactiae*, - MALP-2 di *M.fermentans*, - LPS (controllo positivo). Un gruppo non stimolato (NS) è stato utilizzato come calibratore. Sull'asse delle ascisse è indicato l'aumento di espressione delle cellule stimulate rispetto al controllo non stimolato, sull'asse delle ordinate sono indicati i tempi di stimolazione. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Antonio Giovanni Anfossi

“ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

L'aumento dell'espressione delle citochine IL6 ed IL8, GM-CSF, Mip1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  dopo stimolazione con il lipoP48 è, per alcuni tempi, comparabile se non superiore all'aumento ottenuto con il lipopeptide MALP-2 di *M. fermentans*, mentre le cellule stimulate con le lipoproteine totali di Maga non mostrano nei diversi tempi aumenti significativi di espressione genica rispetto al controllo non stimolato.

Questi risultati preliminari indicano che il LipoP48 è capace di indurre una forte espressione delle citochine responsabili delle prime fasi di attivazione della risposta immune nei monociti e ci ha indotto ad intraprendere gli esperimenti sul target di nostro interesse, i fibroblast-like synoviocytes.

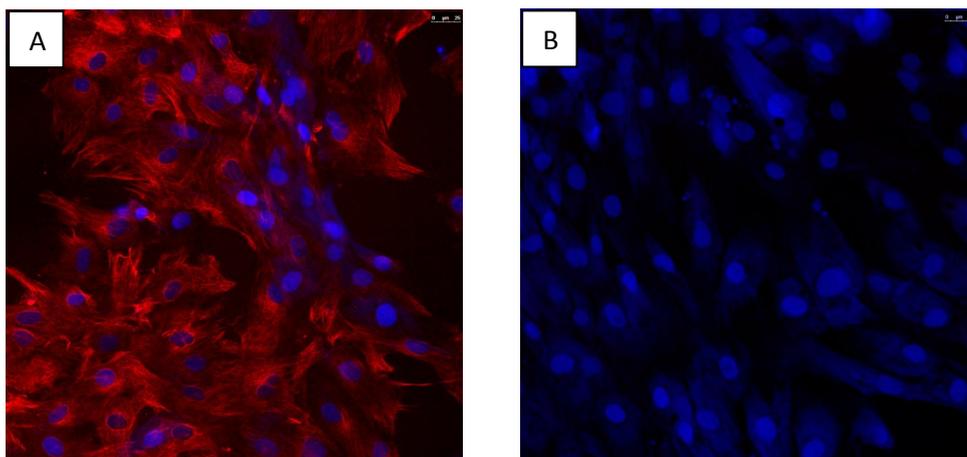
## **6.2- Espressione delle citochine nei FLS stimolati**

I risultati ottenuti sui monociti hanno permesso di determinare in modo preliminare l'attività immunomodulatoria del LipoP48 su cellule deputate alla risposta immunitaria.

Per valutare se questo lipopeptide possa giocare un ruolo nell'eziopatogenesi dell'artrite da micoplasmi nei piccoli ruminanti, abbiamo sviluppato un protocollo simile al precedente per valutare l'attivazione di sinoviociti di tipo B in coltura provenienti da articolazioni di agnelli sani.

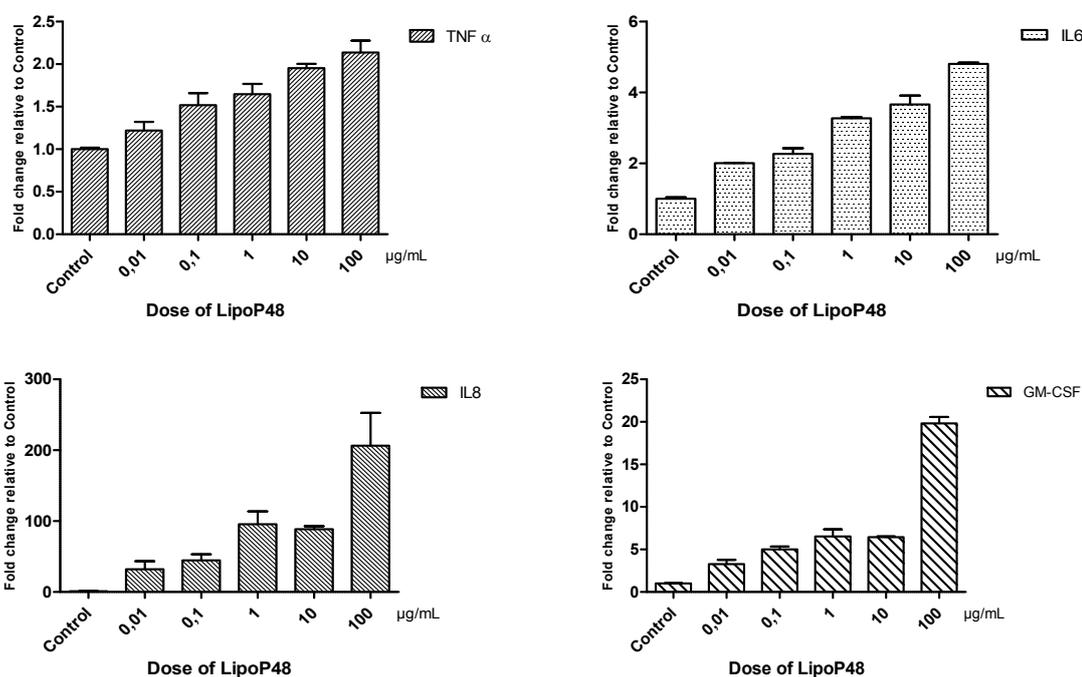
Dal momento che i sinoviociti possono appartenere alla popolazione dei macrofago-simili o a quella dei fibroblasto-simili, per assicurarci di lavorare solo con quest'ultima popolazione cellulare, abbiamo effettuato la caratterizzazione immunofenotipica delle cellule in coltura dopo il 4° passaggio, in quanto i sinoviociti di tipo A rappresentano cellule al termine della loro differenziazione e incapaci di replicarsi, quindi scompaiono dalle colture dopo il 3°-4° passaggio.

Dalla figura 6.1 si vede che le nostre cellule sono totalmente negative al CD68 e positive alla Vimentina, indicando l'appartenenza ai FLS.



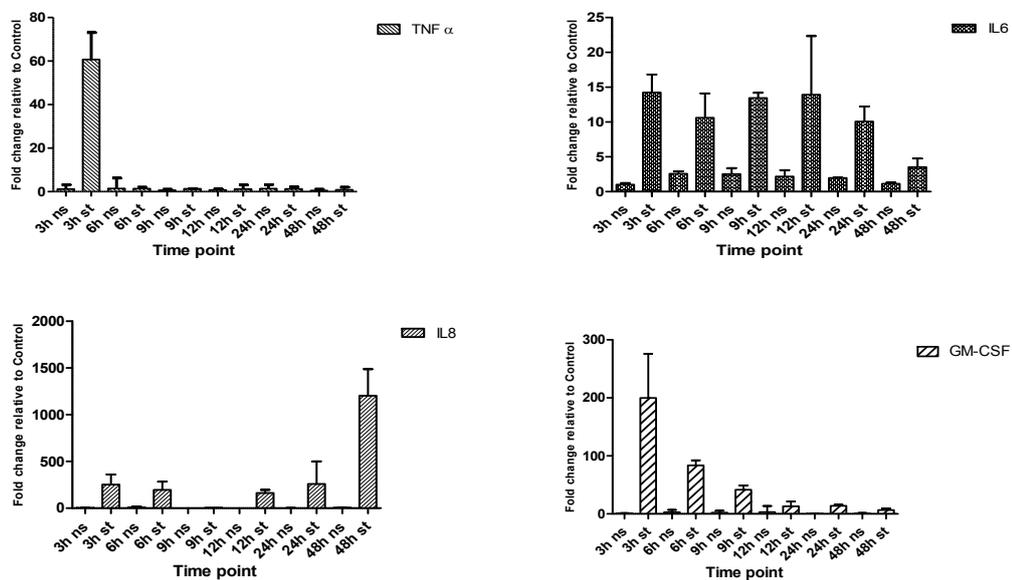
**Figura 6.1. A) Intensa positività dei FLS al marker Vimentina; B) Le stesse cellule sono completamente CD68 negative.**

Nella Tavola 6.2 sono riportati i risultati dell'espressione dopo stimolazione con dosi crescenti del ligando. Per tutte le citochine/chemochine testate



**Tav. 6.2: Risultati dell'espressione di TNF-α, IL-6, IL-8 e GM-CSF dopo 3h di stimolazione con dosi crescenti di LipoP48:**

(TNF-α, IL-6, IL-8 e GM-CSF) l'espressione mostra un andamento che appare dose-dipendente, nel range tra 0,01µg/mL a 100 µg/mL.

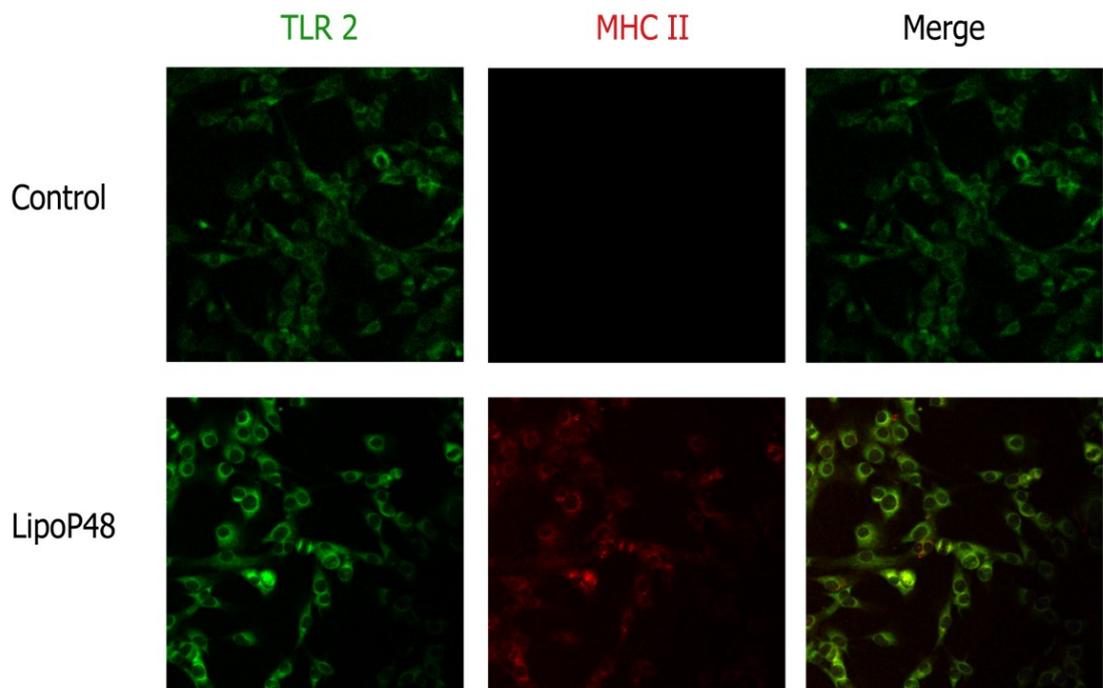


**Tav. 6.3: Risultati dell'espressione delle citochine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e GM-CSF dopo 3h di stimolazione con differenti dosi di LipoP48;**

Livelli significativamente elevati di queste citochine erano evidenziabili già con 1  $\mu\text{g/ml}$  di LipoP48, mentre l'IL-1 $\beta$  non mostrava lo stesso andamento. I risultati della stimolazione a tempi crescenti da 3h a 48h (Tav.6.3), mostra che il TNF- $\alpha$  viene espresso esclusivamente nelle prime ore post-stimolazione per poi scomparire completamente nei tempi successivi, mentre la citochina IL-6 e la chemochina IL-8 vengono espresse a livelli elevati rispetto al controllo non stimolato in pressoché tutti i tempi di stimolazione. Per quanto riguarda il GM-CSF, l'andamento risulta decrescente col passare del tempo.

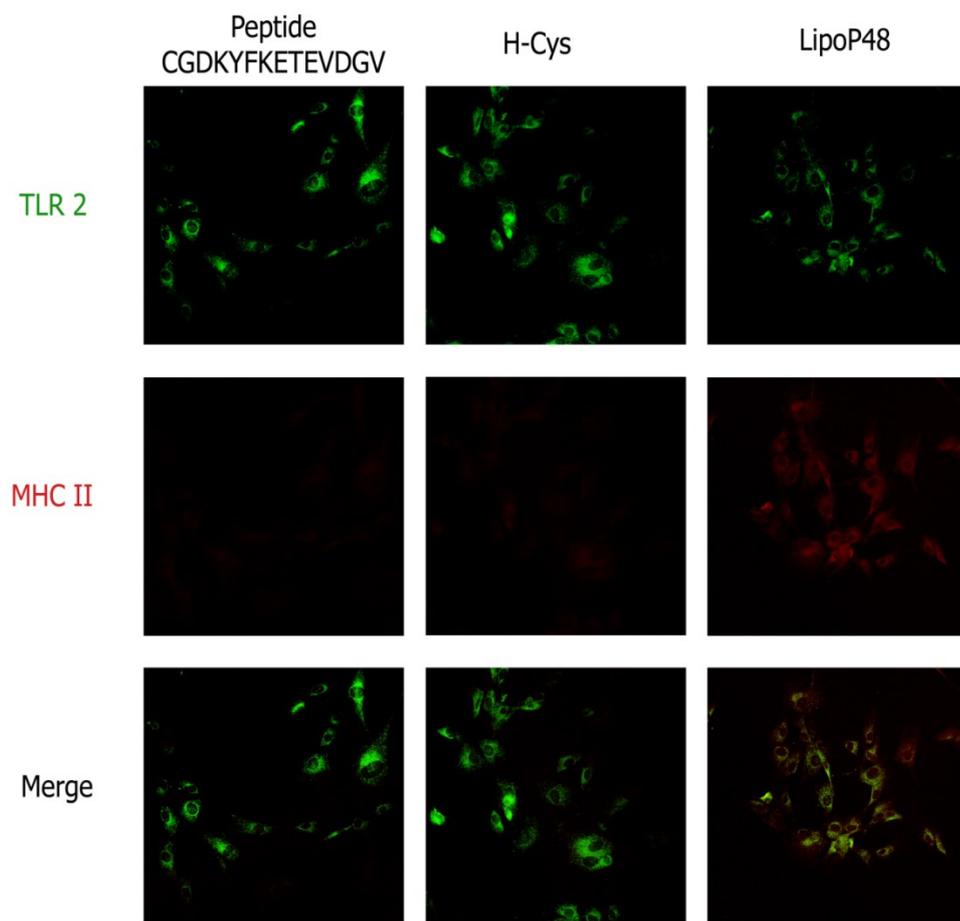
### 6.3 Espressione di MHCII e TLR2

L'esame al microscopio confocale ha messo in evidenza che dopo 3h di stimolazione l'espressione di TLR2 appariva moderatamente aumentata. Più interessante, invece, è la comparsa nello spettro del rosso dell'espressione dell'MHC di classe II (Fig. 6.2).



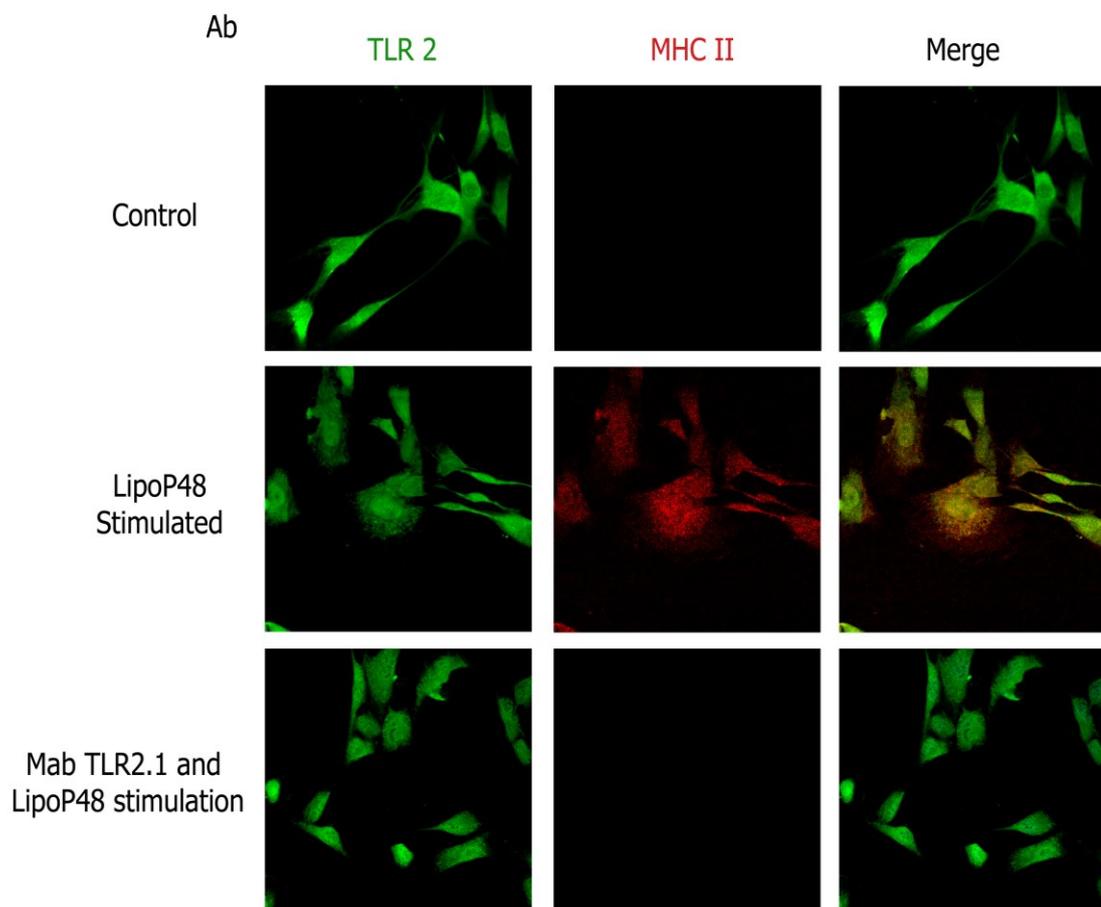
**Fig. 6.2: Espressione al confocale di TLR2 e MHC-II in FLS ovini. Dopo solo 3h di stimolazione si osserva un incremento dell'espressione di TLR2 e la comparsa dell'espressione dell'MHC-II;**

Dalla figura 6.3, appare chiaro che questo effetto è attribuibile al LipoP48 nella sua interezza, in quanto la sola porzione peptidica CGDKYFKETEVDGV e/o la porzione sintetica Pam2cys non sono in grado di determinare questo effetto.



**Fig. 6.3: Espressione di TLR2 e MHC-II in FLS ovini dopo solo 3h di stimolazione con le porzioni separate del lipoP48. Si osserva un incremento dell'espressione di TLR2 e di MHCII solo nei FLS stimolati con la molecola intera.**

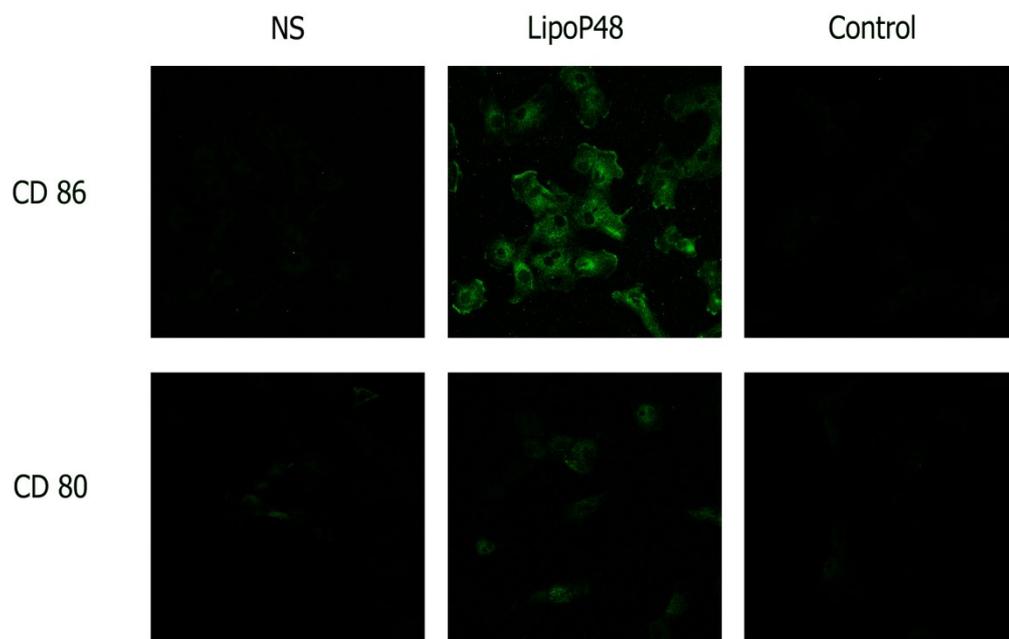
Gli esperimenti eseguiti bloccando il TLR2 (Fig. 6.4) con l'anticorpo TLR2.1 hanno dimostrato che l'induzione dell'espressione di MHCII era attribuibile all'interazione del LipoP48 col TLR2.



**Fig. 6.4: Espressione post-stimolazione di TLR2 e MHC-II in FLS ovini dopo blocco del TLR2. L'espressione dell'MHCII indotta dal LipoP48 è impedita dal blocco del TLR specifico.**

## 6.4 Espressione delle molecole costimolatorie

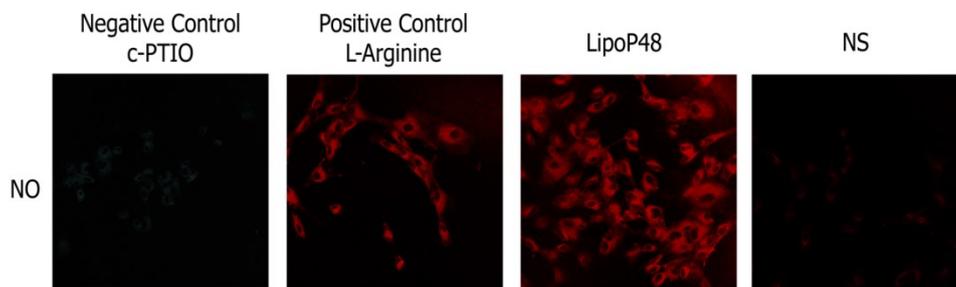
Dai nostri risultati si ricava che la stimolazione dei FLS per 3h con il LipoP48 porta ad un incremento dell'espressione delle molecole costimolatorie, modesto per il CD80 ed elevato di CD86 (Fig.6.5).



**Fig. 6.5: Espressione di CD80 e CD86 dopo 3h di stimolazione con LipoP48;**

## 6.5 Produzione di NO

Dopo stimolazione per 3h con 1 $\mu$ g/ml di LipoP48 , è rilevabile una forte produzione di NO nei sinoviociti ovis, dimostrando che dopo un adeguato stimolo queste cellule possono contribuire al danno articolare anche con la produzione di NO (Fig. 19).



**Fig. 6.6: Induzione della produzione di NO dopo 3h di stimolazione con LipoP48**

## 6.6 Test di citotossicità

Il Trypan blue test *in situ* ha dimostrato l'assenza di tossicità del lipoP48 sui FLS, infatti non è evidenziabile una differenza tra controlli e stimolati con concentrazioni crescenti di LipoP48.

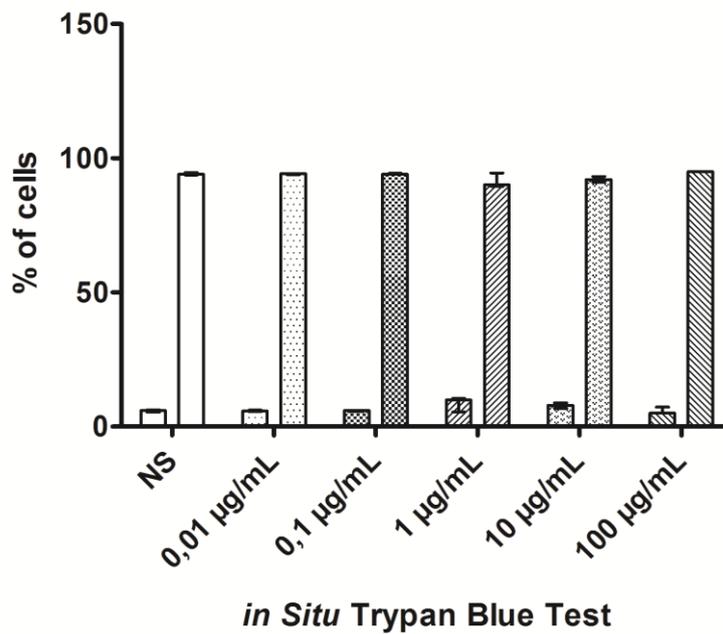


Fig. 6.7: Grafico riportante i risultati del test di citotossicità *in situ*.

## Capitolo 7

### *Conclusioni*

I risultati ottenuti, nel loro insieme, suggeriscono che il lipopeptide sintetico LipoP48 interagendo attraverso il TLR2/TLR6, è capace di indurre *in vitro* la sintesi di mediatori dell'infiammazione sia su colture primarie di monociti che di FLS di ovini sani. Questo meccanismo d'azione, sappiamo essere alla base di molte patologie croniche e autoimmunitarie, la cui patogenesi è governata dall'alterazione dell'espressione di mediatori proinfiammatori.

Molto interessante è la comparsa di MHC II e l'induzione dell'espressione di molecole costimolatorie dopo stimolazione con LipoP48. Dalla maggior parte della bibliografia consultata, abbiamo visto che le colture cellulari di FLS utilizzate dai vari autori provenivano da articolazioni colpite da RA. Questo target cellulare per gli studi della patologia è molto peculiare. Queste cellule, infatti, non sono sinoviociti fisiologici ma hanno subito delle trasformazioni che non gli consentono di ritornare allo stato precedente e reagiscono alle citochine e all'INF- $\gamma$  in modo molto potente.

Quando sono in loco in un'articolazione colpita da RA, i FLS esprimono fortemente l'MHC II, e lo perdono dopo alcuni giorni di coltura. Per ripristinare l'espressione dell'MHC II, le cellule vengono trattate con INF- $\gamma$ .

I FLS trasformati sono anche capaci di presentare l'antigene ai linfociti CD4+ e determinarne la proliferazione clonale.

Il fatto che il LipoP48 induca, attraverso i recettori dell'immunità innata, l'espressione sia di MHC II che di CD80 e CD86, fa pensare che queste cellule siano pronte ad attivare una risposta immunitaria locale contribuendo con i sinoviociti di tipo A e altre cellule immunitarie all'innesco e al perpetuarsi della malattia cronica articolare.

Antonio Giovanni Anfossi

"ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI"

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

Un altro dato interessante è l'induzione della sintesi di NO indotta dalla stimolazione dei TLR2/TLR6, che conferma il ruolo importante dei sinoviociti di rivestimento nel danno tossico causato dal NO.

Ci sono ancora alcuni aspetti da chiarire sull'effetto del LipoP48 sul modello FLS ovini. Alcuni esperimenti in corso ci permetteranno di dire se queste cellule assumono, come nell'RA, la capacità invasiva, quella di fagocitare e quella di fungere da APC. Infine andremo a valutare l'espressione dell'IL-23 che nell'RA assume particolarmente importanza per l'asse IL-23/Th17. Con il lavoro di questa tesi abbiamo messo a punto una metodica economicamente vantaggiosa per stimolare il sistema immunitario innato di alcuni citotipi ovini attraverso il complesso TLR2/TLR6 e quantificarne l'espressione attraverso Real Time qPCR per le citochine e chemochine pro-infiammatorie. Questa scelta riflette sia l'economicità della metodica, sia l'incompletezza del modello ovino per la quantificazione dei risultati con l'impiego di altri mezzi (es. ELISA).

Questi esperimenti dimostrano che il LipoP48, come altre molecole simili (MALP-2) è capace di attivare il complesso TLR2/TLR6, ma non ci dice se e quanto sia importante la sequenza peptidica sul livello della risposta infiammatoria. Se, come avviene per le BmpA/BmpB di *Borrelia burgdorferi*, la porzione peptidica è molto importante per la potenza della risposta infiammatoria innescata, potrebbe essere interessante valutare su un modello maggiormente standardizzato come quello murino le differenze quantitative nell'immunomodulazione indotta sia dal LipoP48 che da altri suoi analoghi (LipoP48-2; LipoP48-3) che abbiamo fatto sintetizzare e che si differenziano per il sito di clivaggio della P48.

## Bibliografia

1. **Anderson K.V., Bokla L., Nüsslein-Volhard C.** 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: The induction of polarity by the *Toll* gene product. *Cell* 42 (3): 791–798.
2. **Akira S., Takeda K.,** 2004. Toll-like receptor Signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499-511.
3. **Akira S., Uematsu S., Takeuchi S.** 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell.* 124: 783-801.
4. **Bartok B., Firestein G.S.** Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. 2010. *Immunol Rev.* 233(1):233-55.
5. **Baumann H., Kushner I.** 1998. Production of interleukin-6 by synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 152(3):641-4.
6. **Bergonier D., Berthelot X., Poumarat F.** 1997: Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. Sci. Tech. OIE.* 16: 848 – 873.
7. **Bhugra B., Dybvig K.** 1992. High-frequency rearrangements in the chromosome of *Mycoplasma pulmonis* correlate with phenotypic switching. *Mol. Microbiol.* **6**:1149–1154.
8. **Bottini N., Firestein G.S.** 2013. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol.* 9(1):24-33.
9. **Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.** 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
10. **Carle P., Laigret F., Tully J.G., Bove J.M.** 1995. Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 178-181.

11. **Cassell G.H.** 1998. Infectious causes of chronic inflammatory diseases and cancer. *Emerg Infect Dis.* 4(3): 475–487.
12. **Davis L.K. and Wise K.S.** 2002. Site-Specific Proteolysis of the MALP-404 Lipoprotein Determines the Release of a Soluble Selective Lipoprotein-Associated Motif-Containing Fragment and Alteration of the Surface Phenotype of *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun.* 70(3):1129–1135.
13. **Farrell A.J., Blake D.R., Palmer R.M., Moncada S.** 1992. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 51(11):1219-22.
14. **Feldmann M., Brennan F.M., Foxwell B.M., Taylor P.C., Williams R.O., Maini R.N.** 2005. Anti-TNF therapy: where have we got to in 2005? *J Autoimmun.* 25 Suppl:26-8.
15. **Feldmann M., Brennan F.M., Maini R.N.** 1996. Rheumatoid arthritis. *Cell.* 85(3):307-10.
16. **Franz A., Webster A.D., Furr P.M., Taylor-Robinson D.** 1997. Mycoplasmal arthritis in patients with primary immunoglobulin deficiency: clinical features and outcome in 18 patients. *Br J Rheumatol.* 36(6):661-8.
17. **Gallily R., Salman M., Tarshis M., Rottem S.** 1992. *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) induces TNF alpha and IL-1 production by human monocytes and murine macrophages. *Immunol Lett.* 34(1):27-30.
18. **Garcia J., Lemercier B., Roman-Roman S., Rawadi G.** 1998. A *Mycoplasma fermentans*-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kB activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem.* 18;273(51):34391-8.
19. **Gay N.J., Gangloff M.** 2007. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annu. Rev. Biochem.* 76:141–65.
20. **Glew M.D., Papazisi L., Poumarat F., Bergonier D., Rosengarten R., Citti C.** 2000. Characterization of a Multigene Family Undergoing High-Frequency DNA

- Rearrangements and Coding for Abundant Variable Surface Proteins in *Mycoplasma agalactiae*. *Infect. Immun* 68: 4539-4548.
21. **Goh F.G., Midwood K.S.** 2012. Intrinsic danger: activation of Toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Rheumatol.* 51(1):7-23.
  22. **Groebel K., Hoelzle K., Wittenbrink M.M., Ziegler U., Hoelzle L.E.** 2009. *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes. *Infect. Immun.* 77: 576-584.
  23. **Haier J. Nasralla M. Franco A.R. Nicolson G.L.** 1999. Detection of mycoplasmal infections in blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 38 (6): 504-509.
  24. **Hankte K. and Braun V.** 1973. Covalent Binding of Lipid to Protein Diglyceride and Amide-Linked Fatty Acid at the N-Terminal End of the Murein-Lipoprotein of the *Escherichia coli* Outer Membrane. *Eur. J. Biochem.* 34,284-296.
  25. **Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkl E., B.-C. Li, Herrmann R.** 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 24:4420–4449.
  26. **Himmelreich R., Plagens H., Hilbert H., Reiner B., Herrmann R.** 1997. Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Res.* 25:701–712.
  27. **Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S.** Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. 1999. *J Immunol.* 162(7):3749-52.
  28. **Huang Y., Robertson J.A., Stemke G.W.** 1995. An unusual rRNA gene organization in *Mycoplasma fermentans* (incognitos strain). *Can. J. Microbiol.* 41: 424-427.
  29. **Hum S., Kessell A. Djordjevic S. Rheinberger R. Hornitzky M. Forbes W. and Gonsalves J.** 2000. Mastitis, polyarthritis and abortion caused by *Mycoplasma* species bovine group 7 in dairy cattle. *Aust. Vet. J.* 78:744-750

30. **Jan G., Fontenelle C., Le Henaff M., Wroblewski H.** 1995. Acylation and immunological properties of *Mycoplasma gallisepticum* membrane proteins. Res. Microbiol. 146:739-750.
31. **Jan G., Fontenelle C., Le Henaff M., Wroblewski H.** 1996. Selective acylation of plasma membrane proteins of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, the contagious bovine pleuropneumonia agent. Curr. Microbiol. 32:38-42.
32. **Janeway C.A. Jr, Medzhitov R.** 2002. Innate Immuno Recognition. Annu. Rev. Immunol. 20: 197-216.
33. **Jin M.S., Kim S.E., Heo J.Y., Lee M.E., Kim H.M., Paik S.G., Lee H., Lee J.O.** 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. Cell. 130(6):1071-82.
34. **Johnson S., Sidebottom D., Bruckner F., Collins D.** 2000. Identification of *Mycoplasma fermentans* in synovial fluid samples from arthritis patients with inflammatory disease. J Clin Microbiol. 38(1):90-3.
35. **Jung Y.O., Cho M.L., Lee S.Y., Oh H.J., Park J.S., Park M.K., Park M.J., Ju J.H., Kim S.I., Park S.H., Kim H.Y., Min J.K.** 2009. Synergism of toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and TLR6 ligation on the production of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in a spontaneous arthritis animal model of interleukin (IL)-1 receptor antagonist-deficient mice. Immunol Lett. 123(2):138-43.
36. **Kang J.Y., Nan X., Jin M.S., Youn S.J., Ryu Y.H., Mah S., Han S.H., Lee H., Paik S.G., Lee J.O.** 2009. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. Immunity 31(6):873-84.
37. **Kobe B., Kajava A.V.** (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. Curr. Opin. Struct. Biol. 11, 725–732.
38. **Kovacs-Simon A., Titball R.W., Michell S.L.** (2011) Lipoproteins of bacterial pathogens. Infect. Immun. 79, 548–561
39. **Kurokawa K., Ryu K.H., Ichikawa R., Masuda A., Kim M.S., Lee H., Chae J.H., Shimizu T., Saitoh T., Kuwano K., Akira S., Dohmae N., Nakayama H., Lee B.L.** 2012. Novel bacterial lipoprotein structures conserved in low-GC content gram-

Antonio Giovanni Anfossi

“ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

- positive bacteria are recognized by Toll-like receptor 2. *J Biol Chem.* 287(16):13170-81.
40. **Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A.** 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973–983.
41. **Lien E., Sellati T.J., Yoshimura A., Flo T.H., Rawadi G., Finberg R.W., Carroll J.D., Espevik T., Ingalls R.R., Radolf J.D., Golenbock D.T.** 1999. Toll-like Receptor 2 Functions as a Pattern Recognition Receptor for Diverse Bacterial Products. *J Biol Chem.* 274 (47):33419-25.
42. **Lo S.C., Dawson M.S., Wong D.M., Newton P.B. 3<sup>rd</sup>, Sonoda M.A., Engler W.F., Wang R.Y., Shih J.W., Alter H.J., Wear D.J.** 1989. Identification of *Mycoplasma incognitus* infection in patients with AIDS: an immunohistochemical, in situ hybridization and ultrastructural study. *Am J Trop Med Hyg.* 41:601-16.
43. **Lysnyansky I., Rosengarten R., Yogev D.** 1996. Phenotypic Switching of Variable Surface Lipoproteins in *Mycoplasma bovis* Involves High-Frequency Chromosomal Rearrangements. *Journ. Bact.* 178: 5395-5401.
44. **Madanat A., Zendulková D., Pospíšil Z.** 2001. Contagious Agalactia of Sheep and Goats. A Review. *Acta Vet. Brno* 70: 403–412.
45. **Maini R.N., Taylor P.C.** 2000. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Med.* 51, 207–229.
46. **Manso-Silvan L., Vilei E.M., Sachse K., Djordjevic S.P., Thiaucourt F., Frey J.** 2009. *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(6):1353-8.
47. **Matsushima N., Tanaka T., Enkhbayar P., Mikami T., Taga M., Yamada K., Kuroki Y.** 2007. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics.* 21;8:124.

48. **McInnes I.B., Leung B.P., Field M., Wei X.Q., Huang F.P., Sturrock R.D., Kinninmonth A., Weidner J., Mumford R., Liew F.Y.** 1996. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med.* 184(4):1519-24.
49. **Medvedev A.E.** 2013. Toll-Like Receptor Polymorphisms, Inflammatory and Infectious Diseases, Allergies, and Cancer. *J Interferon Cytokine Res.* 33(9):467-84.
50. **Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr.** 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
51. **Melchers F, Braun V, Galanos C.** 1975. The lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*: a B-lymphocyte mitogen. *J Exp Med.* 142(2):473-82.
52. **Minion F.C., Jarvill-Taylor K.J., Billings D.E., Tigges E.** 1993. Membrane-associated nuclease activities in mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 175:7842–7847.
53. **Much P., Winner F., Stipkovits L., Rosengarten R., Citti C.** 2002. *Mycoplasma gallisepticum*: influence of cell invasiveness on the outcome of experimental infection in chickens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34:181–186.
54. **Mühlradt P.F., Meyer H., Jansen R.** 1996. Identification of S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein in a macrophage-activating lipopeptide from *Mycoplasma fermentans*. *Biochemistry.* 35(24):7781-6.
55. **Muhradt P.F., Kieß M., Meyer H., Sussmuth R., Jung G.** 1997. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J. Exp. Med.* 185: 1951
56. **Muhradt PF, Kiess M, Meyer H, Sussmuth R, Jung G.** 1998. Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from *Mycoplasma hyorhinis*. *Infect Immun.* 66(10):4804-10.
57. **Nishimoto N., Yoshizaki K., Miyasaka N., Yamamoto K., Kawai S., Takeuchi T., Hashimoto J., Azuma J., Kishimoto T.** 2004. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 50(6):1761-9.

Antonio Giovanni Anfossi

“ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

58. **Okusawa T., Fujita M., Nakamura J., Into T., Yasuda M., Yoshimura A., Hara Y., Hasebe A., Golenbock D.T., Morita M., Kuroki Y., Ogawa T., Shibata K.** 2004. Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun.* 72(3):1657-65.
59. **Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.S., Lee H., Lee J.O.** 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458:1191–1195.
60. **Perry S.W., Epstein L.G., Gelbard H.A.** 1997. In situ trypan blue staining of monolayer cell cultures for permanent fixation and mounting. *Biotechniques* 22(6):1020-1, 1024.
61. **Phythian-Adams A.T., Cook P.C., Lundie R.J., Jones L.H., Smith K.A., Barr T.A. Hochweller K., Anderton S.M., Hämmerling G.J., Maizels R.M., MacDonald A.S.** 2010. CD11c depletion severely disrupts Th2 induction and development in vivo. *J. Exp. Med.* 207: 2089–2096
62. **Pittau M., Fadda M., Briguglio P., Farina S., Carboni A.Q., Contini A.** 1990. Triton X-114 phase fractionation of *Mycoplasma agalactiae* membrane proteins and affinity purification of specific antibodies. *Proc. Ann. Meet. Ital. Soc. Vet. Sci.* 44, 925±928.
63. **Quentmeier H, Schmitt E, Kirchhoff H, Grote W, Mühlradt P.F.** 1990. *Mycoplasma fermentans*-derived high-molecular-weight material induces interleukin-6 release in cultures of murine macrophages and human monocytes. *Infect Immun.* 58(5):1273-80.
64. **Razin S.** 1967. The cell membrane of mycoplasma. *Ann. NY Acad Sci.* 143(1):115-29.
65. **Razin S.** 1978. The mycoplasmas. *Microbiol. Rev.* 42:414–470.
66. **Razin, S.** 1991. The genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, and *Asteroplasma* p.1937-1959. In A. Balows, H.G. Truper, M.Dworkin, W.Harder,

- and K.H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, vol. II, 2a ed. Springer-verlag, New York, N.Y.
67. **Razin, S.** 1992. *Mycoplasma* taxonomy and ecology, p. 3-22. In J. Maniloff, R.N. McElhaney, L.R. Finch, and J.B. Baseman (ed.), *Mycoplasmas molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
  68. **Razin S., Freundt E.A.** 1984. The Mollicutes, Mycoplasmatales, and Mycoplasmatacae, p. 740–742. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
  69. **Razin S., Kahane I., Kovartovsky J.** 1972. Pathog. Mycoplasmas, Ciba found. Symp., pp. 93-122.
  70. **Razin S., Yogev D., Naot Y.** 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1094-1156. **Ramírez A.S., Rosas A., Hernández-Beriain J.A., Orenco J.C., Saavedra P., de la Fe C., Fernández A., Poveda J.B.** 2005. Relationship between rheumatoid arthritis and *Mycoplasma pneumoniae*: a case-control study. *Rheumatol.* 44(7):912-4.
  71. **Rosati S., Pozzi S., Robino P., Montinaro B., Conti A., Fadda M., Pittau M.** 1999. P48 Major Surface Antigen of *Mycoplasma agalactiae* Is Homologous to a malp Product of *Mycoplasma fermentans* and Belongs to a Selected Family of Bacterial Lipoproteins. *Infect Immun.* 67(11):6213-6.
  72. **Seya T., Matsumoto M.** 2002. A lipoprotein family from *Mycoplasma fermentans* confers host immune activation through Toll-like receptor 2. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(8):901-6
  73. **Smith M.D., Walker J.G.** 2011. The synovium. *Rheumatology* Editors Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt, Weisman, Eds. 5th ed.; vol 1: pp. 51-6.
  74. **Steiner G., Tohidast-Akrad M., Witzmann G., Vesely M., Studnicka-Benke A., Gal A., Kunaver M., Zenz P. Smolen J.S.** 1999. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatol.* 38:202–213
  75. **Suresh R. Mosser D.M.** 2013. Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Adv Physiol Educ* 37: 284–291.

Antonio Giovanni Anfossi

“ALLESTIMENTO DI STRUMENTI PER LO STUDIO ED IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICOPLASMI”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche Indirizzo Microbiologia e Immunologia.

Università degli Studi di Sassari

76. **Szeredi L., Tenk M., Schiller I., Révész T.** 2003. Study of the role of *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma* and other microaerophilic and aerobic bacteria in uterine infections of mares with reproductive disorders. 51 (1): Acta Vet. Hung. 51 (1): 45–52.
77. **Taylor-Robinson D., Davies H.A., Sarathchandra P., Furr P.M.** 1991. Intracellular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. Int. J. Exp. Pathol. 72:705–714.
78. **Taylor-Robinson D., and Keat A.** 2001. How can a causal role for small bacteria in chronic inflammatory arthritides be established or refuted? Ann. Rheum. Dis. 60:177-184.
79. **Takeuchi O., Kawai T., Mühradt P.F., Morr M., Radolf J. D., Zychlinsky A., Takeda K., Akira, S.** 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. Int. Immunol. 2001. 13: 933–940.
80. **Theiss P., Wise K.S.** 1997. Localized frameshift mutation generates selective, high-frequency phase variation of a surface lipoprotein encoded by a mycoplasma ABC transporter operon. J. Bacteriol. 179:4013–4022.
81. **Tully J.G., and Razin S. (ed.).** 1996. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, vol. I. Diagnostic procedures. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
82. **Tola S., Manunta D., Cocco M., Turrini F., Rocchigiani A.M., Idini G., Angioi A., Leori G.** 1997. Characterization of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. FEMS Microbiol. Lett. 154, 355±362.
83. **van der Merwe J., Prysliak T., Perez-Casal J.** 2010. Invasion of Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells and Erythrocytes by *Mycoplasma bovis*. Infect. Immun. 78: 4570-4578.
84. **Villalba E.J., Poveda J.B., Fernandez A., Rodriguez J.L., Gutierrez C., Gomez-Villamandos J.** 1992. An outbreak caused by *Mycoplasma mycoides* species in goats in the Canary Islands. Vet. Rec. 130: (15) 330-331.

85. **Vogl G., Plaickner A., Szathmary S., Stipkovits L., Rosengarten R., Szostak M.P.** 2008. *Mycoplasma gallisepticum* Invades Chicken Erythrocytes during Infection. *Infect. Immun.* 76: 71-77.
86. **Winner F., Rosengarten R., Citti C.** 2000. *In Vitro* Cell Invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect. Immun.* 68: 4238-4244.
87. **Wise K. S.** 1993. Adaptive surface variation in mycoplasmas. *Trends Microbiol.* 1:59–63.
88. **Woese C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221–271.
89. **Yavlovich A., Katzenell A., Tarshis M. Higazi Abd A.-R., Rottem S.** 2004 *Mycoplasma fermentans* binds to and invades HeLa cells: involvement of plasminogen and urokinase. *Infect. Immun.* 72: 5004–5011.