

S. Chirumbolo***, A. Conforti*, S. Lussignoli*, R. Ortolani**, P. Bellavite***

BIOLOGIA MOLECOLARE E FUNZIONI DELLE CITOCHINE

Il termine citochine si riferisce ad una vasta serie di componenti proteiche prodotte dalle cellule in risposta ad una varietà di stimoli inducenti. I classici ormoni peptidici soddisfano una simile definizione ma essi sono prodotti da organi endocrini specifici mentre le citochine sono prodotte da diversi tipi cellulari in differenti tessuti [1,2].

Tutte le citochine condividono, dal punto di vista molecolare, la caratteristica comune di essere piccoli fattori proteici (tipicamente di 15-30 kDa), in alcuni casi modificati da residui carboidratici (glicoproteine).

In generale, si può ritenere come valido il concetto generale che l'azione delle citochine è quella di una componente che agisce su recettori definiti presenti sulle cellule bersaglio ed attiva una serie di modificazioni funzionali che possono essere principalmente:

- a** - mediazione della risposta immunitaria naturale o/e specifica tramite produzione di altre citochine o di altri mediatori e regolazione delle molecole di membrana (recettori);
- b** - azione sulla crescita ed il differenziamento cellulare;
- c** - azione sull'espressione e la sintesi proteica di altri fattori.

L'interazione citochina-cellule "target" (o "bersaglio") può essere distinta in tre categorie: autocrina, se la citochina agisce sulla cellula che l'ha prodotta; paracrina, se la citochina agisce su una cellula contigua ma differente rispetto al tipo cellulare che l'ha prodotta; telecrina se la citochina, prodotta da un definito tipo cellulare, viene rilasciata nel circolo sanguigno per agire su una cellula bersaglio in altra sede.

Per quanto riguarda la classificazione, si possono delineare alcune classi o raggruppamenti di citochine sulla base delle loro funzioni e del loro ruolo.

Una prima distinzione prevede il raggruppamento delle citochine in fattori di crescita, linfocine, fattori stimolanti le colonie o CSF (la lista delle abbreviazioni usate è riportata in fondo), fattori di crescita trasformanti o TGF, fattori di necrosi tumorale o TNF ed interferoni o IFN.

Una seconda classificazione distingue le linfocine (prodotte dai linfociti), le monochine (prodotte dai fagociti mononucleati) e le chemochine (dette anche intercrine), citochine pro-infiammatorie prodotte da diverse cellule [3]. Queste classificazioni assumono un semplice significato didattico, in quanto la maggior parte delle citochine ha un notevole pleiotropismo di bersagli e ridondanza d'azione e pertanto il ruolo di una citochina di un gruppo può spesso sovrapporsi a quello di una seconda citochina di altro raggruppamento. Tale concetto è illustrato dall'esempio riportato in figura 1, dove si vede come i fagociti (in questo caso i macrofagi) attivati da vari stimoli producono varie citochine che hanno varie azioni, più o meno ad ampio spettro.

Compatibilmente con delle esigenze didattiche, si può disegnare un quadro generale della funzione delle citochine prendendo in esame le loro attività come:

- agenti capaci di promuovere la crescita, la proliferazione ed il differenziamento cellulare (fattori di crescita);
- agenti capaci di instaurare reti di comunicazione nel sistema immunitario (linfocine ed interleuchine);
- agenti coinvolti nelle reazioni infiammatorie (chemochine, linfocine).

* Istituto di Farmacologia

** Istituto di Immunopatologia

*** Istituto di Chimica e Microscopia Clinica
Università di Verona

Ovviamente, un argomento di tale vastità non può essere trattato esaurientemente in una singola rassegna. Qui ci si limiterà ad alcune note di carattere generale ed a fornire notizie essenziali sulle azioni della maggior parte delle citochine note, rimandando ulteriori approfondimenti alla letteratura citata.

RUOLO DELLE CITOCINE COME FATTORI DI CRESCITA E DI DIFFERENZIAMENTO CELLULARE

Uno dei ruoli più significativi delle citochine è quello di promuovere e controllare la crescita, la proliferazione ed il differenziamento cellulare; numerose citochine assolvono questo compito in modo pressoché univoco e per tale motivo vengono più comunemente conosciute con il nome di fattori di crescita (growth factors).

I fattori di crescita rappresentano una vastissima classe di componenti particolarmente implicate nella crescita e nel differenziamento cellulare. Sebbene, come avremo modo di constatare, ci sia una sovrapposizione di ruoli tra citochine diverse (ad esempio: l'interleuchina 3 è un noto fattore emopoietico), si possono considerare fattori di crescita le citochine elencate in Tabella 1.

Molte di queste componenti agiscono su cellule di origine ectodermica, sulle cellule epiteliali e su cellule di origine mesodermica e sono raggruppate in famiglie, come ad esempio la famiglia dei fattori di crescita trasformanti beta, TGF- β , di cui si conoscono almeno due dozzine di membri [4].

Un gruppo che si va ampliando è rappresentato dalla famiglia dei fattori di crescita epidermici di cui il fattore di crescita epidermico (EGF) è il rappresentante più noto [5]. Questa famiglia include diversi mitogeni, tra cui il fattore di crescita trasformante alfa (TGF- α) [6], il fattore di crescita vaccinico [7], il fattore di crescita derivato dall'anfregulina/schwannoma (AR o SDGF) [8], il fattore simil-EGF legante l'eparina (HB-EGF) [9], il fattore di differenziamento neuronale neu (NDF) [10] e le ereguline [11].

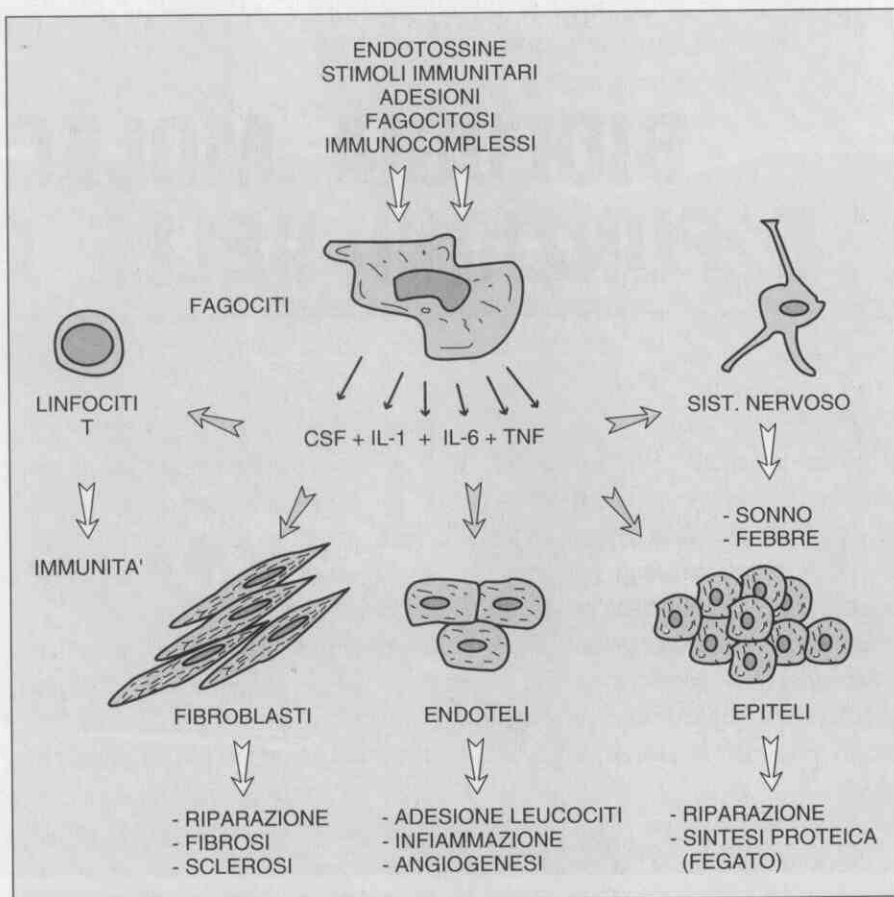


Fig. 1 - Rappresentazione schematica del pleiotropismo di funzioni caratterizzante l'azione delle citochine nella fisiologia dell'organismo. Vari stimoli di natura esogena od endogena innescano la produzione di citochine (citochine infiammatorie) da parte del sistema fagocitario. Questo meccanismo induce la risposta immunitaria specifica ed una serie di reazioni riguardanti: a) la riparazione dei tessuti lesi (azione sulle cellule mesodermiche ed epiteliali, fibroblasti, eventuale formazione di strutture fibrotiche o sclerotiche); b) l'endotelio (espressione di molecole adesive per i leucociti e le piastrine, produzione di sostanze legate all'infiammazione, angiogenesi); c) la sintesi di proteine epatiche (proteine della fase acuta); d) un'azione sul sistema nervoso centrale e sull'asse ipotalamo-ipofisario (produzione di ACTH, febbre, sonnolenza).

Tutti questi membri si legano al medesimo recettore di superficie di 170 kDa e condividono una rilevante omologia di sequenza con alcuni domini dell'EGF, soprattutto per la conservazione di 6 residui di cisteina nelle posizioni 35-40.

Come l'EGF anche il TGF- α è un potente fattore angiogenico *in vivo* ed inoltre è uno stimolatore della migrazione dei cheratinociti. L'azione su cellule di origine ecto o mesodermica rappresenta uno degli elementi chiave nel ruolo assunto dalle citochine nello sviluppo e nella riparazione dei tessuti. Diversi fattori di crescita presentano anche pro-

prietà angiogeniche, cioè di crescita cellulare dei vasi sanguigni, proprietà che sono appannaggio di una citochina recentemente caratterizzata da linee tumorali umane di adenocarcinoma al colon, l'angiogenina umana (ANG) [12], le cui caratteristiche molecolari permetterebbero di includerla nella superfamiglia delle ribonucleasi. Attualmente, non esistono evidenze circa l'esistenza di un effetto diretto dell'ANG sulla crescita dei vasi: sembra, piuttosto, che essa faciliti il ruolo di altri fattori come il TGF- β e gli FGF acido e basico che vedremo più avanti. Inoltre, favorisce l'adesione e la migrazione

NOME	CARATTERISTICHE	FUNZIONI BIOLOGICHE
TGF- α	50 aa, 6 kDa	Mitogeno per fibroblasti. Induzione sviluppo epitelio e migrazione cheratinociti.
TGF- β	112 aa, 25 kDa Tre forme: TGF β 1, β 2 e β 3	Soppressione di funzioni dei linfociti T e B e di cellule NK e di monociti. Stimolazione chemiotassi dei fagociti. Stimola formazione di ECM e osteoblasti. Controllo dello sviluppo.
EGF	53 aa, 6 kDa	Crescita e differenziamento di epitelio e cellule mesenchimali. Inibizione della secrezione gastrica.
HB-EGF	86 aa	Ruolo nella riparazione delle ferite.
FGF	18-28 kDa 7 forme di FGF	Mitogeno per fibroblasti ed altre cellule di natura ecto, endo o mesodermica.
CSF	Distinti in GM-CSF, G-CSF e M-CSF	Ematopoiesi.
HGF	Due subunità: α (440 aa, 50.8kDa) e β (234 aa, 26 kDa) Presenza kringle	Stimolazione melanociti e cheratinociti, epitelio renale, dell'endotelio e sviluppo epatico.
IGF	Due forme: IGF-I (70 aa) e IGF-II (67 aa)	Crescita e mantenimento del tessuto nervoso. Regolazione crescita ossa e fetale.
NGF	121 aa, 13.5 kDa	Induzione Ig in linfociti B, Attivazione cellule infiammazione. Crescita del sistema nervoso.
PDGF	200 aa, 30 kDa	Attività mitogenica.
Vasculotropina	130 aa, 34-42 kDa	Attività angiogenica.
Angiogenina	123 aa, 14.2 kDa	Attività angiogenica.
SCF	189 aa, 23 kDa	Ematopoiesi.

Tab. 1 - Citochine e fattori di crescita

dei fibroblasti legandosi alla matrice extracellulare (ECM), e si pensa che favorisca la polimerizzazione ed il rilascio dell'actina della superficie cellulare, pre-requisito per l'ancoraggio delle cellule epiteliali all'ECM ed importante, ad esempio, nel caso della crescita dell'epitelio della cornea. Fondamentale è soprattutto il ruolo delle citochine nella crescita e fisiologia dei fibroblasti il quale viene assunto da alcuni fattori come l'HB-EGF [9], un fattore mitogenico specifico per i fibroblasti, che non agisce sulle cellule endoteliali a differenza di altre componenti della famiglia degli EGF a cui appartiene e, come gli FGF che vedremo avanti, interagisce con gli eparan-solfato proteoglicani (HSPG) presenti, ad esempio, sulla superficie delle cellule muscolari lisce: quest'ultima condizione sembra che venga ri-

chiesta per il legame ad alta affinità di HB-EGF al recettore per l'EGF. Probabilmente quest'ultimo dato indicherebbe che l'interazione con i componenti della matrice extracellulare, con le cellule epiteliali e/o endoteliali, sia, per molte citochine, un requisito importante per il ruolo come fattori di crescita: l'interazione rappresenta, probabilmente, un elemento in un complesso sistema di comunicazioni, finemente regolato, tra i diversi tessuti.

Nell'ambito dei fattori di crescita significative, a questo proposito, appaiono due categorie di citochine: i fattori di crescita del fibroblasto (FGF) e i fattori di crescita delle colonie emopoietiche (CSF). La famiglia degli FGF comprende almeno 7 membri finora noti i quali assumono un ruolo fondamentale nella fisiologia dei fibroblasti. Essi favori-

scono lo sviluppo, il mantenimento e la riparazione dei tessuti, la loro rigenerazione e riparazione ed inoltre sono implicati anche nella tumorigenesi e nelle metastasi.

I membri della famiglia hanno circa il 30-50% di omologia di sequenza, agiscono su cellule di origine meso-, ecto- ed endodermica, e quasi tutti sono mitogenici per i fibroblasti [13]. FGF-1 e FGF-2, ad esempio, stimolano tutte le cellule di origine mesodermica, oltre a cellule di altra origine. Il KGF o FGF-7, di 28 kDa, è un fattore legante l'eparina (da questo punto di vista simile all'HB-EGF) che viene prodotto in rilevanti quantità durante la reazione di riparazione dei tessuti, insieme ad un incremento di espressione del suo recettore (KGFR).

L'attività proliferativa e di crescita può riguardare molti altri tessuti ed organi, ad esempio: a) il tessuto nervoso, verso cui agisce la famiglia dei fattori di crescita simil-insulina (insulin-like), che hanno un ruolo anche nel differenziamento del tessuto timico e il fattore di crescita dei nervi (NGF) che, come vedremo più avanti, ha un ruolo anche nel sistema immunitario; b) il fegato, nei confronti del quale agisce il fattore di crescita degli epatociti (HGF).

Questa citochina ha un notevole pleiotropismo in quanto promuove anche la crescita e la sintesi di DNA nei melanociti dell'epidermide, nei cheratinociti, nell'epitelio gastrico, nell'endotelio vascolare, negli epatociti e nell'epitelio biliare.

Inoltre è interessante notare che la struttura molecolare dell'HGF presenta un motivo *kringle*, struttura condivisa anche dal fibrinogeno e dalla lipoproteina Lp(a).

I diversi distretti tissutali sono più o meno influenzati dall'azione dei fattori indicati; molto spesso l'azione proliferativa è da collegarsi con una risposta adattativa dell'organismo. È il caso, ad esempio, di alcune citochine coinvolte nella complessità dei meccanismi immunologici.

È ormai accertato che esista uno stretto collegamento tra il sistema immunitario e l'attività ematopoietica. I CSF sono un gruppo di citochine che possiedono la capacità

di stimolare *in vitro* la formazione di colonie di cellule progenitrici ematopoietiche. *In vivo* il loro ruolo è quello di stimolare la proliferazione e la funzione delle linee granulocito/monocitiche (GM-CSF), neutrofiliche (granulocitiche) (G-CSF) e macrofagiche (M-CSF) [14-16].

Il GM-CSF, di 124 aa, P.M. 35 kDa, codificato da un gene sul cromosoma 5 (linked ai geni per l'IL-3, l'IL-4 e l'IL-5), stimola la proliferazione delle colonie immature di neutrofili, monociti/macrofagi ed eosinofili ma anche quella dei progenitori della linea eritroide e dei megacariociti. La citochina viene espressa, come l'IL-3, dai linfociti T, ma anche dai fibroblasti e dalle cellule endoteliali del midollo osseo.

In effetti, quest'ultimo tipo di cellule esprime anche gli altri CSF citati, G-CSF, citochina attiva sulla linea granulocitaria, e M-CSF che è attiva sulla linea monocitico/macrofagica.

Queste due citochine non vengono prodotte dai linfociti T ma dall'endotelio, dalle cellule stromali del midollo, dai neutrofili e dai macrofagi.

La citochina M-CSF, viene prodotta anche dai fibroblasti. Attualmente si conosce una ulteriore citochina ematopoietica, il fattore di crescita della cellula staminale (*stem cell factor*) o SCF, detto anche fattore di Steel. Questo fattore, prodotto dalle cellule stromali, agisce sui progenitori della linea mieloide e linfoide ma in particolare sui mastociti immaturi e maturi, per cui viene definito anche fattore di crescita delle mast cells o MGF, stimolando la proliferazione delle colonie e la produzione di mediatori infiammatori nei mastociti maturi, sia in assenza che in presenza di stimoli IgE-associati [17].

Il ruolo assunto dalle citochine come fattori di crescita, proliferazione cellulare e differenziamento è una caratteristica abbastanza comune alla maggioranza di questi fattori. Si tratta di una proprietà che consente a queste molecole di controllare la fisiologia cellulare in un modo che ricorda molto da vicino quello assunto dai classici ormoni peptidici.

Da questo punto di vista, si tratta di una funzione molto delicata e per ciò stesso "vulnerabile" dalla patologia: un'eccessiva produzione o una abnorme struttura molecolare delle citochine può rappresentare un elemento patogenetico fondamentale nello sviluppo delle neoplasie, come è dimostrato dal fatto che i geni codificanti per molte citochine si comportano da oncogeni quando affetti da mutazioni.

INTERLEUCINE E RUOLO DELLE CITOCINE NEL SISTEMA IMMUNITARIO

Molte citochine sono definite in un contesto molto più stringente e strategico che è quello della risposta immunitaria. In questo caso, comunque, non è appropriato fare una reale distinzione poiché molte citochine mediano la risposta immunitaria specifica (anticorpo dipendente) a quella aspecifica (fagociti) ed inoltre popolazioni cellulari coinvolte primariamente nei fenomeni di immunità naturale ed infiammatori (granulociti) producono citochine importanti nel reclutamento e nella comunicazione con i linfociti B e T.

Sicuramente, si possono ritenere citochine per antonomasia un gruppo di citochine prodotte dal sistema immunitario e definite *interleuchine*. Questo termine è attribuito ad un gruppo di almeno 15 molecole note a tutt'oggi che hanno il compito precipuo di mediatori nella risposta immunitaria naturale e/o specifica (Tabella 2).

Queste molecole assolvono un compito strategico mediando la funzione del sistema immune naturale o aspecifico con quella del sistema immunitario specifico o anticorpo dipendente (Figura 2). La funzione stessa di queste citochine costituisce un "network" di interazioni nella quale medesime citochine agiscono su più cellule bersaglio.

L'interleuchina-1 (IL-1), definita anche pirrogene endogeno, agente della febbre, è probabilmente una delle citochine più note ed importanti [18]. Esistono due forme di interleuchina 1: l'IL-1 α e IL-1 β . Entrambe possiedono uno spettro di proprietà infiamma-

torie, metaboliche, fisiologiche, ematopoietiche ed immunologiche simili.

L'IL-1 α , attiva anche come pro-peptide di 31 kDa, ed l'IL-1 β esercitano i loro effetti legandosi a recettori specifici appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline: un recettore di 80 kDa, indicato con IL-1RtI, presente sui linfociti T, i fibroblasti, i cheratinociti, le cellule endoteliali, le cellule della sinovia, i condrociti e gli epatociti, con un dominio intra-citoplasmatico di 213 aa, ed un recettore di tipo II, indicato con IL-1RtII, espresso sui linfociti B, i neutrofili e le cellule del midollo osseo, del P.M. di 68 kDa, con una porzione citoplasmatica ridotta di 29 aa. L'azione delle due forme riguarda l'uso di entrambi i recettori, pur avendo struttura molecolare diversa e probabilmente funzione diversa.

Un ruolo per il recettore di tipo II, sprovvisto di una porzione che conduca a ritenere l'uso di un sistema di trasduzione del segnale come per il recettore di tipo I, potrebbe essere quello di essere impiegato principalmente come recettore solubile, che serve a regolare l'attività dell'IL-1, in appropriate condizioni. La produzione di IL-1 può essere influenzata da diversi fattori, come ad esempio le prostaglandine e le prostacicline, ed è determinata in seguito ad una infezione o all'incidenza di un danno cellulare. I tipi cellulari che producono citochine comprendono, oltre ai monociti-macrofagi, i linfociti B e T, i fibroblasti, i cheratinociti della pelle, gli astrociti e le cellule della microglia.

Le funzioni dell'IL-1 sono molteplici; probabilmente la sua funzione principe è quella di mediare la risposta infiammatoria dell'ospite nell'immunità naturale. L'IL-1 induce la sintesi dei fattori di necrosi tumorale e di IL-6 dai monociti/macrofagi, attiva le cellule T, soprattutto quelle CD4+, facendo esprimere, in questi linfociti, il recettore per l'IL-2 e inducendo nel contempo anche la produzione di IL-2. L'azione dell'IL-1 sui linfociti T inoltre induce sintesi di GM-CSF e di IL-4 da queste cellule. Inoltre IL-1 agisce sulle cellule natural killer (NK), come la IL-2, la IL-12 e la IL-15, e contribuisce con queste ultime citochine all'attività tumoricida.

NOME	CARATTERISTICHE	FUNZIONI BIOLOGICHE
Interleuchina 1	Due forme: IL-1a 159 aa ed IL-1b 153 aa. P.M. 17 kDa febbre.	Induzione e/o soppressione di altre citochine. Induce e attiva endotelio. Induce sintesi APP. Azione sinergica con IL-3 e GM-CSF. Co-stimolazione di linfociti B e T.
Interleuchina 2	133 aa, 15-18 kDa	Differenziamento dei linfociti T. Stimola i linfociti B e cellule NK.
Interleuchina 3	134.140 aa, 28 kDa	CSF multipotente. Stimola la crescita dei mastociti.
Interleuchina 4	120 aa, 19 kDa	Proliferazione linfociti B. Induce sintesi IgG ed IgE. Sinergismo con G-CSF.
Interleuchina 5	115 aa, 34 kDa	Differenziamento eosinofili
Interleuchina 6	189 aa, 21 kDa	Crescita e differenziamento di linfociti B. Co-stimola i linfociti T. Induce APP. Stimolazione epatica.
Interleuchina 7	152 aa, 15 kDa	Proliferazione timociti e linfociti T. CSF per la linea linfoide.
Interleuchina 8	72 aa, 8 kDa	Attivazione e chemiotassi dei neutrofili.
Interleuchina 9	126 aa, 14 kDa	Crescita dei CD4+. Stimolazione del BFU-E.
Interleuchina 10	160 aa	Inibizione sintesi di IFN e IL-2 dai linfociti T.
Interleuchina 11	178 aa, 19 kDa	Megacariocitopoiesi. Crescita delle linee cellulari indotte da IL-6.
Interleuchina 12	197 aa, 73 kDa	Sinergismo con IL-2 per l'attivazione delle cellule NK. Crescita dei linfociti T.
Interleuchina 13	132 aa	Attivazione di linfociti B. Crescita di linfociti B. Inibizione della sintesi di citochine nei monociti.
Interleuchina 14	483 aa	Crescita dei linfociti B. Inibisce secrezione Ig.
Interleuchina 15	114 aa	Proliferazione linfociti T. Attivazione cellule NK.
Fattore di necrosi	157 aa Due forme: α (17 kDa) e β (19 kDa)	Citotossicità per tumori. Crescita e differenziamento linfociti T. Induzione di integrine. Induce febbre. Attiva endotelio.
Interferone γ	143 aa, 20-25 kDa	Effetti anti-proliferativi. Attivazione cellule NK. Espressione antigeni MHC-II. Azione antivirale. Attiva macrofagi.
RANTES	60 aa	Chemioattrattante per monociti e linfociti T.
MCP-1/MCAF	76 aa	Regolazione espressione molecole di adesione e produzione citochine in monociti.
MIP	Due forme: MIP-1a (66 aa) e MIP-1b (69 aa)	Chemiotassi monociti. Attivazione mastociti.
GRO α /MGSA	73 aa	Chemiotassi dei neutrofili.
NAP-2		Chemiotassi dei neutrofili.
Fattore inibitorio leucemico		Sinergismo con IL-3 Attiva APP. Inibizione adipogenesi come IL-11.
Oncostatina M	28 kDa	Regola espressione IL-6 in endotelio. Induce APP ed espressione rec. HDL.
Pleiotrofina	136 aa	Ruolo in embriogenesi.
SLPI	11.7 kDa	Inibizione elastasi dei leucociti.
LMW-BCGF	106 aa, 12 kDa	Stimolazione linfociti B.

Tab. 2 - Interleuchine e citochine implicate nella risposta immune

L'azione modulatrice dell'IL-1 può coinvolgere l'attivazione di fattori nucleari implicati nella trascrizione genica. Si sa attualmente che almeno due fattori sono IL-1 inducibili: il fattore NF κ -B e il fattore AP-1. Questa azione di stimolazione o inibizione dell'espressione genica è varia: l'interleuchina 1 (IL-1) incrementa la sintesi della maggioranza delle interleuchine, dei TNF e di molti CSF, incrementa la sintesi di fattori collegati con le reazioni infiammatorie (complemento, PDGF, proteine amiloidogeniche, molecole di adesione, attivatore del plasminogeno) mentre inibisce, ad esempio, la sintesi di albumina, di tireoglobulina, di citocromo P450.

IL-1 non agisce solo sul sistema immunitario ma ha effetti sul sistema nervoso, aumentando, ad esempio, la funzione del recettore per il GABA, ha effetti sugli epatociti, sia attraverso la produzione di IL-6, sia direttamente, aumentando la sintesi proteica, in particolare di alcuni fattori come la SAA (la proteina siero-amiloide), il fibrinogeno, le metallotionine. È ben noto che la stessa molecola funge da pirogeno endogeno influenzando il centro termoregolatore dell'ipotalamo (insieme a TNF- α e a IL-6).

Recentemente è stato identificato un inibitore endogeno della funzione della IL-1, definito antagonista del recettore per l'IL-1 (IL-1ra) che viene rilasciato *in vivo* in alcuni casi come nella flogosi indotta o in alcune patologie infiammatorie. IL-1ra blocca l'attività di IL-1 sia *in vitro* che *in vivo*, legandosi al recettore di tipo II (IL-1RII); il compito di questo fattore, di 25 kDa, glicosilato, che mostra una omologia del 19% con IL-1 α e del 26% con IL-1 β , è quello di regolare l'attività dell'interleuchina che, se portata a condizioni estreme, può provocare sindromi da shock.

Mentre l'IL-1 assume il ruolo di citochina chiave nella risposta infiammatoria collegata con il sistema immunitario specifico, soprattutto grazie all'azione stimolante l'espressione dei recettori per l'interleuchina 2, quest'ultima citochina assume un ruolo importantissimo nella risposta immunitaria cellulo-mediata.

L'interleuchina 2 (IL-2) viene sintetizzata e secreta primariamente dai linfociti T helper dopo attivazione da parte di APC o mitogeni [19]. Si tratta di un prodotto specifico della linea Th1, la quale produce anche IFN- γ e TNF- β mentre non producono IL-4 e IL-5 che invece sono prodotti, con IL-6 e IL-9, dalla linea Th2.

Fondamentalmente, l'IL-2 si può considerare un fattore di crescita dei linfociti T.

È una glicoproteina caratterizzata per la prima volta nella linea leucemica Jurkat. Oltre ad assumere un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria specifica, la sua azione influenza altre cellule come i neutrofili ed i macrofagi, agisce probabilmente come neuromodulatore, come fattore di crescita delle cellule gliali, stimola l'attività delle cellule NK attivate (LAK) e delle cellule TIL (linfociti infiltrati nei tumori).

Chiave di volta del legame tra risposta immunitaria ed ematopoiesi sono alcune citochine legate sullo stesso cromosoma: l'interleuchina 3, l'interleuchina 4 e l'interleuchina 5: l'associazione genetica tra il GM-CSF ed alcune interleuchine, infatti, cioè la IL-3, IL-4 ed IL-5, suggerisce un ruolo per quest'ultime di mediazione tra la risposta immunitaria e la proliferazione ematopoietica.

Come l'IL-2 anche l'IL-3 viene prodotta dai linfociti T attivati [20]. La sua funzione, però, è proprio quella di un fattore emopoietico, come le citochine CSF, e di collegamento (interleuchina) tra il sistema immunitario maturo e la emopoiesi. Al pari di molte citochine, anche l'IL-3 ha molte cellule bersaglio: macrofagi, neutrofili, eosinofili, progenitori eritroidi, megacariociti, mastociti ed inoltre viene prodotta da diversi tipi cellulari come le cellule dell'epitelio timico e i neuroni/astrociti. Oltre al suo ruolo come ematopoietina, agisce come fattore di crescita dell'epitelio, protegge le *mast cells* dal fenomeno dell'apoptosi, agisce sui linfociti T e sui basofili.

L'interleuchina 4 (IL-4) [21] e l'interleuchina 5 (IL-5) [22] sono due citochine che inducono la proliferazione dei linfociti B, sebbene per l'IL-5 l'azione di proliferazione sui linfociti B è stata vista solo nel topo, mentre sull'uo-

mo è attiva solo sulla linea eosinofila. L'IL-4, prodotta dai linfociti T attivati, è una glicoproteina che attiva i linfociti B aumentando l'espressione degli antigeni MHC di classe II e del CD23, induce lo "switch" isotipico di IgE e di IgG₄, incrementa il potenziale citolitico dei linfociti T CD8+ e delle cellule LAK, funzionando in concerto con l'IL-2, e favorisce, come il fattore di Steel, la crescita dei mastociti. Per il suo ruolo stimolatore della sintesi di IgE, tale interleuchina è certamente coinvolta nella patogenesi delle allergie.

La maggior parte delle interleuchine ha quindi un ruolo nella crescita e della proliferazione linfocitaria e nel reclutamento dei leucociti dell'immunità naturale. D'altra parte, molte interleuchine assumono anche un ruolo determinante nel contesto dell'ematopoiesi e nella funzione e mantenimento delle linee mieloidi e linfoidi mature, oltre che di quelle eritroidi e megacariocitiche.

L'IL-7 è prodotta dalle cellule stromali del midollo ed è un potente fattore di crescita per i linfociti T e per i timociti: secondo alcuni autori essa rappresenta l'analogo dei CSF per la linea linfoide [23].

Anche l'interleuchina 6 ha un ruolo come fattore stimolatorio nei confronti dei linfociti B (la citochina viene infatti anche conosciuta come fattore stimolatorio 2 della cellula B o BSF-2), estrinsecandosi quindi nel differenziamento dei linfociti e nella produzione di anticorpi [24]. La funzione, però, dell'IL-6 è molteplice in quanto agisce sui linfociti T stimolandone la produzione di IL-2 e l'espressione del suo recettore IL-2R e incrementa il differenziamento dei linfociti T citotossici in presenza di IL-2 o interferone gamma (IFN- γ). L'IL-6 è una vera citochina pleiotropica, prodotta da diversi tipi cellulari (monociti/macrofagi, fibroblasti, epatociti, cheratinociti, astrociti, cellule dell'endotelio vascolare, osteoblasti, cellule del Sertoli, vari carcinomi e sarcomi) e che agisce sugli epatociti, stimolando, come l'IL-1, la sintesi di proteine della fase acuta, ed agisce anche sui precursori staminali ematopoietici.

Dell'interleuchina 8 (IL-8) si tratterà nella sezione successiva.

Le restanti interleuchine note, l'interleuchina 9 (IL-9), l'interleuchina 10 (IL-10), l'interleuchina 11 (IL-11), l'interleuchina 12 (IL-12), l'interleuchina 13 (IL-13), l'interleuchina 14 (IL-14) e l'interleuchina 15 (IL-15) sono quelle più recenti come scoperta.

L'interleuchina 9 (IL-9) [25] viene prodotta dalle stesse linee cellulari che producono la IL-4 e la IL-5, cioè i linfociti CD4+ Th2, insieme a tali interleuchine, ed alla IL-10, fa parte di quel gruppo di citochine che assumono un ruolo determinante nella risposta immunitaria specifica. Alcuni autori la ritengono un fattore di stimolazione autocrina per alcuni linfomi. Le sue azioni sono, oggi, ancora poco note: oltre a stimolare i linfociti CD4+, sembra che abbia un'azione sinergica con l'eritropoietina nello sviluppo delle BFU-E (unità formanti la proliferazione eritroide).

Anche l'IL-10 è prodotta dai linfociti CD4+ Th2 ma, a differenza delle interleuchine viste finora, sembra che abbia una attività immunosoppressiva sulla proliferazione e sulla produzione di citochine dei linfociti Th1 e Th2 ed inibendo i macrofagi a presentare l'antigene ai linfociti [26]. Nel topo essa inibisce anche la produzione di IFN- γ e per questo motivo l'IL-10 è stata anche denominata "fattore che inibisce la sintesi delle citochine" o CSIF. Essa può sopprimere la produzione di numerose citochine pro-infiammatorie, incluso il TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, etc., dopo stimolazione dei monociti. Il suo ruolo può essere, dunque, rilevante nell'immunosoppressione, sebbene sia stato riscontrato che l'IL-10 abbia anche attività immunostimolanti nei confronti dei linfociti B, dei timociti e dei mastociti.

L'interleuchina 11, scoperta nel 1990 come fattore capace di indurre la produzione di IL-6 in linee di plasmacitoma umane, è stata evidenziata come fattore di crescita simile alla interleuchina 3 ed ai CSF [27]. La sua azione, infatti, è quella di regolare la crescita ed il differenziamento delle linee ematopoietiche ma è anche rivolta, come l'IL-6, agli epatociti per la produzione di proteine della fase acuta.

L'IL-12 assume un ruolo simile all'IL-2. In realtà, questa interleuchina, nota come fattore di stimolazione delle cellule natural killer o NKSF, una glicoproteina che presenta omologia con l'IL-6, assume un ruolo stimolatorio oltre che nei confronti delle cellule NK anche verso i linfociti T [28,29]. Inoltre contribuisce all'attivazione dei macrofagi tramite la sintesi di IFN- γ .

L'interleuchina 13 (IL-13), definita anche proteina P-600, viene prodotta dai linfociti T [30,31] ma non agisce su queste cellule. Essa induce la crescita ed il differenziamento cellulare dei linfociti B. Inoltre assume un ruolo inibitorio nei confronti della produzione di citochine infiammatorie da parte dei monociti/macrofagi.

Anche l'interleuchina 14 (IL-14) viene prodotta dai linfociti T ma essa sembra che induca la proliferazione solo dei linfociti B attivati e non *resting* (a riposo) [32]. Questo monomero di 468 aa, definito anche high molecular weight B cell growth factor (HMW-BCGF), cioè fattore di crescita dei linfociti B ad alto peso molecolare, inibisce anche la secrezione di immunoglobuline in linfociti B attivati da mitogeni ed assumerebbe, probabilmente, un ruolo nei fenomeni della tolleranza immunologica.

CHEMOCINE, TNF ED IFN E RUOLO DELLE CITOCINE NELL'INFIAMMAZIONE ED IMMUNITÀ NATURALE

Le chemochine [33-36] sono una famiglia di citochine con attività chemiotattica nei confronti dei fagociti mononucleati e dei granulociti polimorfonucleati. Esse assumono un ruolo nel sistema immunitario specifico e, di recente, sono state individuate anche come fattori importanti nel reclutamento delle cellule implicate nelle reazioni allergiche [37].

Inoltre sono importanti anche nella funzione degli eritrociti e nelle patogenesi microbiche [38]. Quest'ultima caratteristica è in relazione con l'omologia che i recettori di alcune chemochine hanno con l'antigene

Duffy, il quale media l'invasione eritrocitaria di *Plasmodium vivax* (plasmodio della malaria) [38,39].

L'IL-8, il rappresentante più noto delle chemochine, è un fattore chemiotattico dei fagociti, dei linfociti T e delle piastrine, che recluta nel focolaio infiammatorio [40]. L'IL-8 fu identificata principalmente sulla base della sua azione sui neutrofili: la citochina induce in queste cellule chemiotassi e rilascio di granuli. La chemiotassi è specifica per i neutrofili poiché l'IL-8 non induce chemiotassi nei monociti e negli eosinofili ma sembra che *in vitro* attragga anche i basofili, inducendo in essi rilascio di istamina e sulfido-leucotrieni.

Le chemochine sono distinte in due sottoclassi, α e β , sulla base della presenza di un motivo di residui cisteinici (C-X-C nell' α e C-C nel β) e della loro funzione: le chemochine α , di cui fanno parte l'IL-8, il NAP-2 e il fattore GRO α /MGSa, sono chemiotattici per i granulociti mentre in quelle β sono compresi fattori chemiotattici (MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 α) per i monociti/macrofagi.

RANTES, come l'IL-8, pare che sia chemiotattica anche verso i linfociti T.

La ricerca ha permesso di identificare due analoghi dell'IL-8, cioè il fattore GRO-a ed il fattore NAP-2, distinto dal fattore NAP-1 con cui viene designata l'interleuchina 8.

Quest'ultimo fattore, a differenza dell'IL-8, non è generato per induzione. Il NAP-2 deriva dal fluido extracellulare per mezzo di una scissione proteolitica di fattori proteici precursori conservati negli a-granuli delle piastrine.

GRO- α /MGSa, un polipeptide di 73 aa, è un membro della sottofamiglia α , un chemioattrattante 10 volte più potente dei neutrofili che l'IL-8, mentre la proteina 1 chemiotattica dei monociti (MCP-1), ad esempio, una proteina di 76 aa, è un membro della sottofamiglia β .

Recentemente, sono state scoperte molte citochine prodotte dai monociti/macrofagi. Si tratta di agenti chemioattrattanti per i monociti che però vengono prodotti anche da

altre popolazioni cellulari (fibroblasti, linfociti B). Tra queste si citano:

- a) - la proteina 1 chemiotattica dei monociti (MCP-1/MCAF), strettamente correlata al fattore MCP-2, MCP-3, probabilmente un monomero di 76 aa che regola l'espressione delle molecole di adesione e della produzione di citochine nei monociti [41];
- b) - la proteina 1 infiammatoria dei macrofagi, presente in due forme monomeriche: MIP-1 α (66 aa) e MIP-1 β (69 aa) (quest'ultima definita anche fattore attivante 2, Act2), prodotta anche dai linfociti T e dai mastociti [42].

Notevole importanza fisiopatologica assumono i fattori di necrosi tumorale (TNF, distinti in TNF- α e TNF- β) e gli interferoni (distinti in IFN- α , IFN- β e IFN- γ o interferone immune) [43-45]. La loro importanza si rivela in due circostanze:

- 1 - azione contro le infezioni (principalmente di tipo batterico per i TNF e di tipo virale per gli IFN);
- 2 - azione contro i tumori. L'immunità naturale, infatti, si avvale fondamentalmente dell'azione dell'IL-1 e dei TNF, oltre all'azione in concerto di altre citochine, soprattutto quelle con funzione emopoietica o chemiotattica e di attivazione delle proteine della fase acuta. Come l'IL-1, anche i TNF sono alla base delle reazioni febbrili. A piccole concentrazioni (10^{-9} M) il TNF- α svolge funzioni essenziali nella risposta immune naturale: attiva i monociti ed i macrofagi in sinergia con l'IFN- γ , è chemiotattico per i monociti, induce la differenziazione di queste cellule proteggendole dall'apoptosi probabilmente perché induce il rilascio di CSF-1, aumenta la risposta dei linfociti T attivati all'IL-2 e la produzione di IL-2, induce la proliferazione dei timociti in presenza di IL-1, IL-2 ed IL-7, regola l'affinità e la risposta ai formil peptidi da parte dei neutrofili.

Inoltre agisce sulle cellule endoteliali, sul sistema della coagulazione, sull'e-

