

57/M79

D. MIȘCALENCU

FLORICA MAILAT

G. A. SZEGLI

FAMILIA CITOKINELOR IL-2

EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI
1999



BIBLIOTECA CENTRALA
UNIVERSITARA
Bucuresti

Cota IV 516 416

Inventar 0199904435

D. MIȘCALENCU

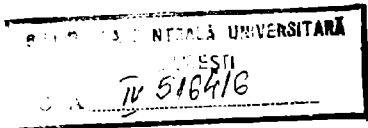
FLORICA MAILAT

G. A. SZEGLI

**FAMILIA
CITOKINELOR IL-2**

**EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI
1999**

Referenți științifici: Prof. dr. VIORICA MANOLACHE
Prof. dr. IRINA TEODORESCU



B.C.U. București



C199904435

© Editura Universității din București
Șos. Panduri, 90-92, București - 76235; Telefon/Fax 410.23.84

Tehnoredactare computerizată: FLORIAN MIHALCEA

Tiparul s-a executat sub c-da nr. 538/1999, la
Tipografia Editurii Universității din București

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale

MIȘCALENCU, DUMITRU

Familia Citokinelor IL-2 / Mișcalencu Dumitru, Mailat Florica, Szegli Gluzo

București: Editura Universității din București, 1999

92 p.; 29 cm.

Bibliogr.

ISBN 973-575-316-2

I. Mailat, Florica

II. Szegli Gluzo

615.277.3(075.8)

PREFAȚĂ

Lucrarea se adresează îndeosebi, cititorilor familiarizați cu noțiuni de histologie, hematologie, genetică, imunologie și biochimie.

Sunt prezentate date recente privind citokinele, care în ultimii ani au declanșat o adevărată emulație în cercetarea biologică cu remarcabile ecouri în studiul diverselor maladii umane și animale. Investigații complexe au fost și sunt incitate în ideea înțelegerii mecanismelor celulare și moleculare ale unor afecțiuni considerate incurabile.

Reunirea în familia citokinelor interleukina-2 (IL)-2 a IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 și IL-13 are ca argument, prezența în structura receptorului lor celular, a lanțului gamma c (proteină de 65 kD) cu rol de transductor al semnalelor în celule. Se apreciază că, datorită acestei prezențe, citokinele familiei IL-2 au implicat și unele funcții similare, în ciuda absenței omologiilor structurale.

Codificarea alterată sau absența lanțului gamma c duc la blocarea activității citokinelor familiei IL-2, prin incapacitatea endocitării receptorului și prin aceasta, imposibilitatea transmiterii semnalelor către nucleu. Activitatea receptorilor este determinată și de lanțurile alpha și beta, care însă, sunt specifice fiecărei citokine.

Funcția de factor de creștere și de diferențiere a celulelor este finalizată de intermediarii citosolici și nucleari a căror integritate este, de asemenea, obligatorie. Proteinkinazele Jak și Tyk sunt intermediarii prin fosforilarea cărora semnalul este transmis intermediarului final - STAT (Signal Transducer and Activation of Transcription), care acroșează un anumit locus din DNA, declanșând transcrierea.

Dacă până la un moment dat, IL-2 era considerat coordonatorul absolut al sistemului imunitar, tot mai frecvent se constată și alte citokine ale acestei familii mimiează, cel puțin parțial, inducția anumitor stări funcționale în celulele subordonate influenței lor.

Lucrarea prezintă fiecare citokină sub următoarele aspecte: tipul celular în care a fost descoperită, structura moleculară, structura genei și a cromosomului purtător al genei. De asemenea, sunt prezentate tipurile celulare vizate de aceste citokine, anormalitățile structurale ale lor și receptorilor lor, dar și ale intermediarilor intracitoplasmatici care bulversează funcțiile normale.

Deosebită atenție se acordă tipurilor celulare care elaborează citokinele acestei familii și care, în cazul disfuncționalității lor, pot declanșa neoplazii.

Sunt prezentate în primul rând, relațiile celulelor din sistemul imunitar, cu dominanță în activitatea limfocitelor T și B, a mononuclearelor, mastocitelor etc. De asemenea o serie de date relevă interacțiunile dintre citokinele familiei IL-2 și alte citokine, în activarea unor tipuri celulare sau în uciderea unor celule tumorale.

Nu în ultimul rând, lucrarea relevă intervenția acestor citokine în eliminarea celulelor infectate cu virusuri, dar și ineficiența lor în distrugerea celulelor infectate cu HIV. De asemenea, sunt prezentate date privind artritele reumatoide și diversele parazitoze, privite în contextul implicării citokinelor acestei familii. Pe de altă parte, pentru fiecare citokină prezentată, sunt considerate și tentativele terapeutice care și-au dovedit sau nu, eficiența.

Lucrarea aduce informații la zi asupra citokinelor acestei familii, autorii străduindu-se să prezinte stadiul actual al cercetărilor în acest domeniu relativ nou și deosebit de interesant, atât sub aspectul științific cât și aplicativ.

Autorii
Noiembrie 1998

INTERLEUKINA-2 (IL-2)

Interleukina-2 este una din limfokinele cu funcții majore în reglarea sistemului imunitar. Polipeptidul matur secretat, conține 133 resturi aminoacizi cu o greutate moleculară de 15,420. Principala sursă secretoric de IL-2 este limfocitul Th CD4+. În 1983 s-a izolat o clonă cDNA IL-2, din linia celulară leucemică Jurkat, înalt producătoare de IL-2, iar în 1984 această clonă a fost exprimată în *Escherichia coli*, iar produsul rezultat a fost analizat și caracterizat, stabilindu-i-se proprietățile biologice.

IL-2 este o limfokină care induce principalmente proliferarea limfocitelor T stimulate de antigeni sau mitogeni, fiind cunoscută inițial ca factor de creștere a celulelor T. Datorită proprietății de a activa linia celulară cu funcții imunologice foarte diferite, IL-2 este experimentată și folosită promițător în imunoterapie (1).

IL-2 este citokina majoră mitogenică pentru celulele T mature; este un factor de creștere ce induce expresia unui număr de gene incluzând proteinele structurale, protooncogenele și enzimele metabolice. După stimularea cu antigeni sau mitogeni, IL-2 este reclamat pentru proliferarea celulelor T activate și pentru expresia receptorilor IL-2-specifici. De asemenea, modulează funcțiile limfocitelor B, monocitelor, celulelor NK (Natural Killer) și K (Killer) activate de limfokine (LAK). Reglează producția altor citokine precum IFN gamma, factorul de creștere al limfocitelor B și factorul stimulator de formare a coloniilor (CSF).

IL-2 joacă un rol major ca reglator central sau mediator al răspunsului imunitar, iar prin mecanisme indirecte afectează proliferarea și maturarea celulelor hematopoietice. Cele două lanțuri ale IL-2R (alpha/beta) sunt prezente în celulele limfoide, în fibroblastele pulmonare embrionare, în celulele scuamoase, în celulele fibrosarcomatoase și în celulele melanomului..

Urmărindu-se influența IL-2 asupra proliferării limfocitelor din splina șobolanilor Fischer 344, ca și asupra proteinelor nucleare ale acestor celule stimulate cu fitohemaglutinină, s-a constatat că după incubarea cu IL-2, crește atât indicele mitotic al celulelor de la 3-4% la 8,19% cât și sinteza proteinelor nucleare cu masa moleculară de 13, 18, 20 și 80kD (2).

Ca răspuns la acțiunea IL-2, limfocitele din sângele periferic uman proliferază (proces apreciat cu timidină marcată ³H), iar numărul celulelor cultivate in vitro se dublează în ziua 8-a și a 11-a, creșcând în continuare în a 2-a și a 3-a săptămână. Celulele

proliferate exprimă antigenii CD3, CD4 și CD8 (care cresc progresiv în procesul cultivării), dar nu exprimă antigenii specifici celulelor NK, ai limfocitelor B sau ai fagocitelor mononucleare (3).

Activarea limfocitelor T din sângele uman de către celulele dendritice se explică prin stimularea eficientă a secreției IL-2: această observație a rezultat în urma unui studiu comparat, al efectului acțiunii celulelor dendritice și monocitelor asupra proliferării celulelor T. Celulele dendritice induc proliferarea limfocitelor T, deoarece secretă mai eficient IL-2 (4).

Disfuncția limfocitelor T și B în cadrul SIDA reprezintă exprimarea perturbată a genei IL-2 datorită unui deficit de mRNA ce duce, în consecință, la scăderea producției de IL-2. Tentativele de a induce diferențierea limfocitelor B cu mitogeni sau prin adăugarea în cultură a celulelor T, nu a dus la restabilirea relațiilor dintre aceste celule. Totuși, în tentativele terapeutice de stopare a SIDA s-a obținut ameliorarea stării bolnavilor prin administrarea de IL-2 recombinat (5).

Studierea rolului proteinkinazei C (PK-C) în proliferarea limfocitelor T sub acțiunea unei serii de agenți stimulatori ai proliferării (printre care și IL-2) a demonstrat că celulele PK-C negative sunt rezistente la acțiunea factorilor stimulatori ai creșterii datorită alterării capacității de transcriere a genelor activatoare a proliferării și nu datorită scăderii cantității receptorilor de suprafață și nici distrugerii receptorilor timpurii. PK-C este indispensabilă pentru reacția limfocitelor T la liganzii intermediari de la suprafața celulelor, dar nu este necesară pentru acțiunea IL-2 (6).

Invadarea repetată cu enterotoxine, determină la șoareci o scădere a producției de citokine de către celulele T CD4+ și CD8+; celulele activate sunt deletate sau devin anergice, iar administrarea IL-2 poate preveni răspunsul diminuat al CTL (CD8+).

Administrarea la șoareci a superantigenului bacterian SEA (Enterotoxina Staphylococică A) determină activarea marcată a producției de citokine, cu scăderea implicită a activității celulelor T CD4+ și CD8+. SEA se cuplează ca proteină neprocesată la celulele MHC clasa II, stimulând limfocitele T care poartă lanțul V beta al receptorilor TCR.

CTL pot fi utilizate contra celulelor tumorale care exprimă MHC clasa II, folosind SEA ca moleculă de legătură dintre CTL și celula țintă. Injectarea repetată cu SEA la ficare a 4-a zi, duce la reducerea severă a activității citotoxice, prin deleția celulelor ca principal mecanism. Tratamentul combinat SEA+IL-2 crește numărul celulelor citotoxice în splină, activitatea citotoxică crescută putându-se asocia cu numărul crescut de celule CD8+, dar și cu IL-2R-alpha. Se sugerează că IL-2 menține capacitatea citotoxică a limfocitelor T CD8+.

Celulele TCR-Vbeta11 + CD8+ sortate, arată că tratamentul combinat SEA+IL2 crește activitatea citotoxică pe celulă, în comparație cu tratamentul exclusiv cu SEA. În concluzie se afirmă că IL-2 in vitro crește expresia limfocitelor T indusă de SEA, ca și activitatea citotoxică per CTL și previne deleția indusă de SEA (7).

IL-2 restaurează răspunsul litic al celulelor tratate cu PMA, în timp ce alte limfokine precum IL-1, CSF-1, GM-CSF sau IL-3 sunt inefficiente. Reactivitatea răspunsului imunitar al IL-2 nu se corelează cu producția de IFN-gamma. Deci, această citokină are abilitatea de a restaura activitatea litică a celulelor tratate cu PMA, dar nu induce producerea de IFN-gamma. De asemenea, amplifică răspunsul litic preexistent al

celulelor clonate netratate, fără să stimuleze producția de IFN gamma. CTL clonate tratate sau nu, au însă capacitatea de a produce IFN-gamma când sunt cultivate cu mitogeni. Astfel, în procesul de restaurare a activității citolitice indusă de IL-2, nu există o legătură cu producția de IFN-gamma de către CTL (8).

Reactivarea răspunsului litic de către IL-2 apare în absența proliferării celulare, sugerând că citokina poate regla expresia activității litice, pe lângă emiterea semnalului proliferativ pentru expresia clonată a CTL. Rezultate asemănătoare s-au raportat pentru CTL cu memorie și pentru clone CTL care arată schimbări ciclice în activitatea litică. Astfel, pentru celulele citolitice mature, IL-2 este suficient pentru revigorarea activității litice.

IL-2 este un factor de creștere major pentru limfocitele T și este transcris în celulele T inactivate după ligația TCR combinat cu o costimulare adecvată. Activitatea de inducere a genei IL-2 se realizează în regiunea de 300pb enhancer-promotor localizată imediat amonte de locul de start.

Pentru a fi activate, limfocitele T solicită cel puțin două semnale: primul implică legarea CMH la TCR iar al doilea implică adeziunea costimulatorului la ligandul receptorului. CD2 și CD28 sunt cei doi receptori de adeziune ai limfocitelor T care transmit semnale costimulatoare cu liganzii LFA-3 și B7-1. LFA (Factor Activator Limfocitar, iar B7-1, costimulator). Calea CD2-LFA-3 contribuie la adeziunea celulelor T dependente de antigen, pentru a induce IFN și TNF și nivele scăzute de IL-2. În schimb, calea CD28-B7-1 supraproduce IL-2 și suportă creșterea paracrină a celulelor. Ligația CD-28R poate preveni inducția anergică a limfocitelor T, în timp ce calea CD2-LFA-3 poate avea un rol în reversul unei stări anergice stabile.

Reglarea activității transcripționale a genei IL-2 se face la locul de cuplare distal al factorului nuclear al celulelor T activate (NF-AT) , la locul de cuplare al factorului nuclear kB (NF-kB), la elementele responsabile de activarea proteinei-1 ((AP-1), la elementele responsabile CD28 (CD28-RE) și la elementele octamer responsabile (OCT-1).

În stare inactivă, factorii de transcriere NF-kB/Rel sunt complexați cu subunitățile inhibitorii specifice numite proteine I κ B. Proteinele NF-kB/Rel sunt implicate în complexul proteic nuclear care se cuplează la CD28-RE, sugerând că acest ultim element este definit ca un element major responsabil de calea transducției semnalului CD28-B7-1.

Factorul de transcriere AP-1 este un complex format din proteinele jun și fos. Heterodimerii acestei proteine o fac mai activă în cuplarea DNA decât homomerii proteinelor jun și fos luate separat în transactivare. Acești factori pot acționa în complexe cu NF-AT și OCT-1, ceea ce poate duce la reglarea unei serii de elemente responsabile. NF-AT a fost descrisă ca o ciclosporină (CsA), factor de cuplare sensibil la promotorul genei IL-2 în celulele T. Proteina NF-AT este transcripțional activă în limfocitele B și activată, poate deține membrii familiei fos sau jun demonstrând că este o proteină multicomplexă. Cele două căi (CD2 și CD28) induc astfel modele distincte de factori nucleari în activarea genei IL-2. Proteina NF-AT este un factor nuclear potențial țintă pentru calea CD2-LFA-3, pe când inducția proteinei c-Rel, care conține complexul de cuplare CD28-RE, este indusă pe calea CD28-B7-1.

Se sugerează o selectivitate în inducerea factorilor nucleari, prin cele două căi care converg în suprainducția elementelor responsabile NF-AT și AP-1, și în transcrierea condusă de CD28-RE în celulele T. Dacă se produce o mutație în amplificatorul promotorului IL-2, activitatea în locul responsabil pentru CD28, se reduce cu 80% după costimularea cu B7-1 și B7-1-LFA-3, în timp ce activarea transcripțională indusă de LFA-3 nu este afectată. De asemenea, se sugerează o selectivitate în inducția factorilor nucleari de către căile CD2-LFA-3 și C28-B7-1, care poate contribui la reglarea nivelelor IL-2 induse de costimulatorii, LFA-3 și B7-1 favorizând astfel răspunsul autocrin și respectiv paracrin al celulelor T (9).

Dintre receptorii interleukinei-2, citokină prezentă în colostrul de bovine, factorul inhibitor al colostrului (CIF) (inhibă sinteza de IL-2 în limfocitele T auxiliare) împiedică acumularea de mRNA IL-2. În plasmide care conțin gena IL-2 se constată că intervenția CIF inhibă inducția genei, ca și ciclosporina care afectează activarea elementelor NF-AT fără însă a inhiba inducția altor numeroase elemente ale secvenței activatoare a genei. Inhibarea prin control NF-AT, detașează CIF sau ciclosporina, de alți inhibitori ai IL-2 (10).

Hydrochinona din fumul de țigară inhibă activarea indusă de mitogeni asupra limfocitelor T și B. NF-kB, factorul de transcriere care reglează expresia unui număr de gene critice pentru activarea normală a limfocitelor T, poate imunosupresa hydrochinona. Un micromol de hydrochinonă poate inhiba producerea de TNF-alpha care, la rândul lui, poate induce activarea NF-kB în celulele umane T CD4+ primare. Inhibarea lui NF-kB este reversibilă, iar pe măsură ce hydrochinona nu mai acționează, acesta își reia activitatea în celulele T. În concluzie, NF-kB poate fi o țintă moleculară a imunotoxicității hydrochinonei sau benzenului (11).

Expresia proto-oncoproteinei Tpl-2 activează NF-AT și induce expresia IL-2 în linii de limfocite T. După stimularea splenocitelor de șobolan cu ConA, aceasta induce IL-2 în timpul activării celulelor T. Tpl tip-sălbatic și capătul C-terminal trunchiat activează NF-AT și induce expresia IL-2 în celulele EL4. În celulele Jurkat, Tpl-2 trunchiat, activează NF-AT și induce IL-2, iar cel de tip-sălbatic îl activează numai când este cotransfectat cu constructe ce conțin NF-AT; de aici concluzia că, Tpl-2 poate induce semnale de activare NF-AT. Activarea NF-AT de către Tpl în diferite tipuri celulare, definește un mecanism molecular care poate contribui la potențialul său oncogenic (12).

Limfocitele Th1 și Th2 mediază funcțiile efectoare via secreției de citokine ca răspuns la agresiunea imunologică. Celulele Th precursor transcriu după activarea sistemului, citokinele IFNgamma, IL-2 și IL-4. În prezența IL-4 limfocitele Th duc la apariția fenotipului Th2 diferențiat și își pierde abilitatea de a transcrie gena IL-2. Supresia expresiei IL-2 în limfocitele Th2 și parțial în cele Th1 este mediată de ZEB (un finger zinc) care este factor de transcriere ce cuplează box E; el cuplează la un element regulator negativ NRE-A în promotorul IL-2, acționând astfel un potent represor al transcrierii IL-2 (13).

Limfocitele T CD4+ produc IL-2 în cantități reduse la pacienții cu transplant, comparativ cu martorii. La cei dinții, CsA poate induce producția de IL-2 via celulele T CD4+, reprezentând parametrul funcțional al efectului CsA asupra sistemului imunitar

(14). Celulele Th CD4+ au un rol crucial în reacția alogrefelor, ceea ce reprezintă un răspuns imun mediat celular, limfocitele Th producând o varietate de citokine esențiale pentru inițierea reacției alogrefelor.

După profilul citokinelor pe care le secretă, limfocitele Th sunt de fenotip Th1 care produc IL-2 și IFN-gamma asociate cu reacția alogrefelor, și Th2 care produc IL-4 și IL-10 prezente în modelele în care se exprimă toleranță. Aceste procese sunt numite „paradigma Th1/Th2”. Trecerea de la un model la altul prin manipularea producției de citokine reprezintă un mecanism cu eventuale aplicații terapeutice (15).

Șoarecii IL-2 (-/-) dezvoltă o severă boală hematologică caracterizată prin neutropenie și anomalii ale celulelor mieloidale. Numărul PMN din măduva osoasă scade la 65% iar precursorii factorilor de creștere sunt reduși la 50%, condiții în care mielopoieza nu poate fi susținută. Adăugarea de IL-2 exogen la celulele din măduva osoasă a acestor animale, restaurează parțial activitatea hematopoietică. Mielopoieza defectivă a acestora este, în parte, consecința dependenței lor directe de IL-2 și de reglarea creșterii celulelor mieloidale imature, citokina având astfel un rol important în reglarea generării celulelor mieloidale (16).

La șoarecii imunocompetenți cu coriomeningită virală s-a demonstrat că limfocitele CD8+ produc predominant IFN-gamma și că expresia in vivo a acestor celule este independentă de a celor CD4+. La șoarecii deficienți în IL-2 inițierea producției de IFN-gamma și IL-4 in vivo, poate fi declanșată cu IL-2 exogen care menține un nivel înalt al producției de IFN-gamma. Totuși, proliferarea limfocitelor T CD8+ depinde de IL-2 atât exogen cât și endogen elaborat de celulele T CD4+ care susțin eliberarea continuă de citokine de către limfocitele T CD8+ activate (17).

Șoarecii cu deficiență în IL-2 dezvoltă și afecțiuni ale sistemului hematopoietic imunitar, caracterizate prin anemie, hiperplazie limfocitară dar și colite. 20 din 25 șoareci IL-2(-/-) (de 8 săptămâni) infectați, manifestă anemie, hiperplazie limfocitară și autoimună similară cu cele observate la animalele neinfectate care fac colite. Astfel, șoarecii IL-2(-/-) liberi de patogeni, reprezintă un unic sistem în care rolul deficitului IL-2 în bolile sistemului hematopoietic și imunitar poate fi investigat în disociere de complicațiile ce pot duce la colite (18).

IL-2 induce generarea și proliferarea rapidă a LGL (limfocite mari granulare) NK1.1+ din timocitele TCR+ beta/alpha DN (dublu negative) NK1.1, dar nu a celulelor TCR+NK 1.1 alpha/beta DN. Celulele LGL manifestă activitate NK și produc IFN-gamma. În contrast cu IL-2, IL-7 nu induce celule LGL sau activarea NK provenite din celulele TCR+ NK 1.1 alpha/beta, dar produce nivele înalte de IL-4 prin TCR (prin legare încrucișată). S-a demonstrat că celulele TCR+alpha/beta DN au mai multe subpopulații distincte și că IL-2 și IL-7 reglează diferențiat funcțiile acestora prin acționarea diferitelor tipuri de celule efector (19).

Celulele dendritice se dezvoltă de-a lungul unei linii mieloidale sau limfoide prin diferențiere propagată cu citokine hematopoietice din precursori timici timpurii medulari. Astfel, s-a indus diferențierea celulelor dendritice din sângele cordonului ombilical, a celulelor CD34+ inițiată de IL-2 sau IL-2+SCF+TNF-alpha cultivate 28-35 zile (20).

Receptorul interleukinei-2 (IL-2 R)

Interleukina-2 este o citokină cu capacitate de a acționa în cadrul sistemului imunitar pe mai multe tipuri celulare, printre care limfocitele T și B, monocitele și NK. Activarea acestor celule se efectuează prin IL-2R care sunt clasificați în 3 clase : receptori de joasă afinitate care leagă prin lanțul alpha, receptori de afinitate intermediară care leagă prin lanțurile beta și gamma și receptori de înaltă afinitate care leagă prin toate cele trei lanțuri (alpha, beta, gamma).

Lanțul beta este un component și al IL-15 R, iar lanțul gamma este comun pentru receptorii interleukinelor IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 și IL-15. În limfocite, IL-2R beta și IL-2R-gamma sunt exprimați constitutiv, pe când IL-2R-alpha se exprimă numai ulterior activării cu IL-2. Când sunt induse toate lanțurile receptorului (alpha, beta, gamma), receptorul cu afinitate intermediară se transformă în receptor cu afinitate înaltă.

Reglarea expresiei IL-2R-alpha este strict controlată la nivelul transcrierii, în interacțiunea elementelor reglatoare pozitive cu multiplii factori de transcriere cum sunt: STAT-5 (Signal Transducer and Activators of Transcription), Elf-1, HMG-I (Y) și NF-kB. Deși evenimentele ce duc la declanșarea genei IL-2R-alpha nu sunt clare, se știe însă, că există multe proteine reglatoare pentru această genă.

Printre proteinele fosforilate la tirozină ca răspuns la IL-2, se înscrie și IL-2R beta, lanț ce conține 6 tirozine citoplasmatică. Tirozina 338 mediază fosforilarea proteinelor în activarea ras, iar tirozinele 392 și 510 pot activa independent STAT-5.

În linia progenitorilor mioeloidi 32D stabilizată cu IL-2R-beta tip-sălbatic, care are 6 tirozine citoplasmatică, s-a stabilit că numai două (Tyr 392 și Tyr 510) mediază activitatea STAT-5. Acestea contribuie la expresia genei IL-2R-alpha indusă de IL-2, fiind suficientă numai una din cele două tirozine.

IL-7R conține secvența Tyr429 asemănătoare cu cele două secvențe ale IL-2R beta, secvență care ar putea activa STAT-5 și ar declanșa expresia mRNA IL-2R-alpha, în celulele 32D transfectate cu IL-7R uman. Prin substituirea cu fenilalanină a uneia din cele două tirozine (Tyr 392 și Tyr 510) nu mai are loc expresia mRNA. Deci, IL-2 mediază inducerea genei IL-2R-alpha, rol critic având în această relație două tirozine funcționale ale IL-2R-beta, reziduuri care mediază, se pare, mai mult decât activarea STAT-5 (21).

În concluzie, receptorii IL-2 și IL-15 exprimă constitutiv la suprafața limfocitelor, lanțurile gamma și beta dorminde. Citokinele acestora (IL-2 și IL-15) induc răspunsuri foarte similare în celulele limfoide stimulând proliferarea celulelor T activate și a NK, induc celulele efectoare citotoxice și activează costimulând, producția de imunoglobuline de către limfocitele-B.

Lanțurile alpha ale IL-2R și IL-15R sunt exprimate pe suprafața limfocitelor T numai după activarea cu mitogeni sau antigeni specifici. Ele conferă înaltă afinitate pentru transducția eficientă a semnalelor. Înalta afinitate a IL-2R se exprimă în câteva boli autoimune, precum sclerozele multiple, artritele reumatoide, uveite.

Anticorpilor monoclonali anti IL-2R sunt eficienți în prevenirea rejecțiilor de greșă, ca în modelele de autoimunitate la rozătoare (22). Lanțul alpha din receptorul IL-2 este de 55 kDa, iar lanțul beta este de 75 kDa (23).

Rohwer F.et al (24) arată că IL-2R este format din trei proteine majore: p55 (lanțul alpha) ce este important pentru afinitatea înaltă, p75 (lanțul beta) pentru

exprimarea constitutivă și necesar pentru cuplarea IL-2 și transmiterea semnalelor și p65 (lanțul gamma) care are funcția de a transduce semnalele pentru citokinele întregii familii IL-2R, respectiv IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R și IL-15R.

IL-2 stimulează activitatea unui număr de mesageri secundari incluzând tirozin kinazele (ambele kinaze Jak și membrii familiei src, kinazele ser/Thr, proteinele adaptor și proteinele mici G). La rândul lor, acești mesageri secundari induc factori transactivatori precum NF-kB, CREB și proteinele STAT ce sunt responsabile de producția de mRNA. Aceste produse ce răspund la IL-2 includ un număr de gene reglatoare ale proteinelor de cuplare DNA și ale ciclului celular (21).

IL-2 are efect asupra inițierii transcrierii, prin creșterea numărului și/sau schimbarea stării unor factori ai transcrierii. Tratarea celulelor cu IL-2 crește „half-lives” unor mRNA determinând astfel numărul proteinelor care pot fi formate de fiecare mRNA produs. Prin aceasta, sunt reglate un număr de gene cum sunt: pim-1, c-myb, c-myc, c-fos, CSF-1 și PCNA (Antigeni Nucleari Celulari Proliferatori), care relevă anumite reacții comune la acțiunea IL-2.

Celulele timice blastice deprivate de IL-2 arată o marcată atenuare a transcrierii la capetele 3' ale genelor pim-1 și c-myb (24, 25).

Lanțul gamma c al receptorului IL-2

Lanțul gamma c joacă un rol critic în dezvoltarea limfoidă, prin participarea la structura receptorului pentru familia citokinelor IL-2 (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 și IL-15). Absența lui duce la limfopoieză anormală și la imunodeficiență, așa cum demonstrează expresia SCID-X la om și în modele canine și murine corespunzătoare (26). S-a demonstrat că celulele hematopoietice expun două transcripte gamma c care diferă în carboxilul terminal; un transcript este gamma c lung iar celălalt, gamma c scurt care arată o deleție de 72 nucleotide, alterare ce presupune o pierdere de 24 aminoacizi inclusiv reziduu tirozină, care se conservă și este prezent la câțiva membri ai familiei receptorului.

Această combinație duce la pierderea unui loc potențial SH2 „docking” în lanțul gamma c scurt, ceea ce sugerează că va urma o cale de acțiune în semnalizare, diferită față de cea a lanțului gamma c lung; astfel, are un rol deosebit în răspunsul celulelor activate cu IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 și IL-15 (27).

Studierea subunității gamma a receptorului IL-2 în celulele T inactive din sânge, înalt purificate, arată că subsetul gamma nu se detectează la suprafața celulelor TCD4+. Setul gamma este constitutiv exprimat la nivel de mRNA și proteină conservată, ca o componentă intracelulară în limfocitele TCD4+ inactive, care astfel rămân insensibile la acțiunea citokinelor ce folosesc lanțul gamma c al IL-2R (IL-2, IL-4, IL-7 și IL-15).

IL-2R-gamma este translocat în membrana celulară numai după activarea limfocitelor T și inducerea genelor IL-2R-alpha /beta. Deci, în celulele T există o mare rezervă de IL-2R-gamma, translocația lui la suprafața celulei depinzând de expresia lanțului gamma și/sau beta pentru IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 și IL-15 (28).

Limfocitele din sângele cordonului ombilical și de la nou născut sunt puțin abile în reacția imunitară. Gamma c se exprimă în limfocitele de la adult, în proporție de 1/3.

O expresie redusă a lanțului gamma s-a observat în toate celulele T (CD4+, CD8+), limfocitele T-gamma/delta, limfocitele B CD16+, NK și NK CD56 (right) din sângele cordonului ombilical (29).

IL-2R-gamma se exprimă în proporție de 10%, în celulele progenitoare hematopoietice eritroide CD34+ din măduva osoasă, iar în cele din sângele cordonului ombilical, în proporție de 12%. De aici concluzia că celulele CD34+/IL-2R-gamma conțin clone imature deja angajate pe linia eritroidă (30).

Celulele Langerhans, celulele dendritice murine 4F7 din splină și celulele dendritice X552 derivate din epiderm, care dețin funcții importante similare cu ale celulelor Langerhans, exprimă constitutiv mRNA gamma c. Acest lanț este, de asemenea, prezent și în receptorul mononuclearelor, neutrofilelor și celulelor NK (31). Semnalizarea IL-2 reclamă dimerizarea IL-2-beta și gamma c, lanțul gamma fiind un component și pentru IL-4R, IL-7R și IL-9R.

Celulele Caco-2, HT-29 și T-84 (linii de celule epiteliale intestinale) exprimă constitutiv transcripse pentru lanțul gamma c și IL-4R. Lanțul IL-2R-beta se exprimă numai în celulele Caco-2 și HT-29. Nici una din aceste linii nu expun mRNA pentru IL-2R-alpha. După stimularea 24 de ore cu EGF, celulele menționate exprimă transcripse pentru IL-7R, iar mRNA pentru IL-9R exprimă numai celulele Caco-2 și HT-29. Receptorii pentru IL-2, IL-4, IL-7 și IL-9 de pe liniile celulelor epiteliale intestinale sunt funcționali. Stimularea cu citokine determină fosforilarea la tirozină în celulele epiteliale intestinale primare umane (32).

SCID-X (Sever Combined Immuno Deficiency X) este o boală ereditară umană caracterizată prin profunda diminuare a imunității umorale și a celei mediate celular. SCID se datorează mutațiilor din gena lanțului gamma c care codifică componenta esențială pentru receptorul citokinilor IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 și IL-15. Inactivarea lanțului gamma al receptorului, declanșează fosforilarea la tirozina kinazelor Jak1 și Jak3. Celulele leucemice LCL transformate cu EBV de la pacienți cu SCID-X nu au capacitatea de a fosforila aceste tirozinkinaze.

Introducerea în celulele LCL-SCID a genei gamma c tip-sălbatic, printr-un vector retroviral, restaurează funcția IL-2R care poate acționa în declanșarea fosforilării celor două tirozinkinaze. Această reabilitare a IL-2R permite sugestia unei terapii genice în afecțiunea SCID-X (33, 34).

Gena gamma c transferată la pacienții cu SCID-X pentru celulele B, restaurează înalta afinitate a receptorului. Liniilor celulare de la asemenea pacienți, la care limfocitele B sunt transformate de EBV, li s-a transferat un vector retroviral derivat din virusul Moloney cu cDNA al lanțului gamma c, folosindu-se ca promotor LTR viral. În urma integrării provirusului, gena gamma c codifică o proteină completă care restabilește funcțiile IL-2R. Ulterior endocitozei IL-2, are loc și fosforilarea la tirozină a kinazei Jak3 (35).

Șoarecii lipsiți de lanțul gamma c (-/-) au timus hipoplazic. Timocitele acestora răspund la mitogeni dar nu la stimuli dependenți de gamma c. Limfocitele T splenice sunt dominante la vârsta de 3 săptămâni, iar cele CD4+ crește marcat la 4 săptămâni. De aici reiese importanța lanțului gamma c în dezvoltarea limfoidă. Diferențele între subiecții umani și șoarecii care nu exprimă lanțul gamma c sunt diferențe specifice (36).

Lanțul beta al receptorului IL-2

IL-2R-beta se exprimă pe o varietate de tipuri celulare hematopoietice, pe NK și pe subseturi de limfocite T necondiționale, cum sunt limfocitele intraepiteliale. Ultimele două tipuri celulare deficiente în IL-2R arată grave defecte în creștere și dezvoltare. Astfel, șoarecii IL-2R-beta (-/-) dețin o populație anormală de limfocite intraepiteliale caracterizată prin reducerea dramatică a celulelor TCR-alpha/beta, CD8+ și TCR-gamma/delta. Această selectivă reducere demonstrează că limfocitele intraepiteliale sunt dependente de IL-2R-beta în dezvoltarea și diferențierea lor. Dependența de expresia IL-2R-beta a NK și a unor subseturi de limfocite intraepiteliale subliniază rolul esențial pentru semnalizare, a acestei subunități din IL-2R IL-2, pentru dezvoltarea subseturilor de limfocite de origine extratimică (37).

IL-2 induce heterodimerizarea IL-2R-beta/gamma c a receptorului său și activează membrii familiei tirozinkinazelor (TK) Janus Jak1 și Jak3. Jak1 se asociază cu IL-2R-beta, iar Jak3 se asociază primar cu subunitatea gamma c a receptorului. Inducerea a 4 mutații în IL-2R-beta reduce proliferarea impusă de IL-2, scăzând activitatea Stat; mutațiile din regiunea receptorului proximală membranei, duc la diminuarea asocierii cu TK Jak ceea ce înseamnă că activitatea acestora depinde de această regiune a receptorului. De asemenea, trunchierea în capătul C-terminal al IL-2R-beta, afectează diferențiat asocierea la aceste două kinaze. Asocierea TK Jak1 cu IL-2R-beta este independentă de TK Jak3 și este importantă funcțional, iar asocierea TK Jak3 cu IL-2R-beta este independentă de Jak1 și este importantă pentru activarea Stat-5 indusă de IL-2. Cele două TK se pot cupla simultan la IL-2R-beta, ceea ce sugerează că acest proces are loc în prezența IL-2. Se subliniază că în aceste cuplări sunt importante atât regiunile proximale ale membranei cât și cele distale. (38).

Se consideră că IL-2R-beta din celulele carcinomului uman răspund de semnalizarea negativă, care este diferită de cea exprimată pe celulele hematopoietice. Analiza comparată a DNA genomic din celule normale și din linii de carcinom nu semnalează mutații sau deleții în gena IL-2R-beta din celulele carcinoatoase. Mesajul pentru toate domeniile lanțului beta apare identic cu al celulelor limfoide martor. În plus, IL-2R-gamma care participă la semnalizarea IL-2/IL-2R se exprimă și în celulele carcinoatoase. În expresia TK Jak3 din celulele tumorale, se constată totuși, o diferență, care poate fi responsabilă de semnalizarea aval de IL-2 alterată. Aceași cale (IL-2/IL-2R) este însă operativă în carcinomul uman ca și în celulele limfoide și epiteliale (39).

Celule timice imunocompetente sunt deja prezente în zilele 14-15 de dezvoltare embrionară, când sunt rearanjate genele IL-2R-beta al celulelor T (40).

Lanțul alpha al receptorului IL-2

Subunitatea IL-15R-alpha murină este înrudită structural cu IL-2R-alpha și cuplează singură IL-15 cu o afinitate de 1000 ori mai mare decât IL-2R-alpha. Domeniul citoplasmatic al IL-15R-alpha, asemenea celui al IL-2R-alpha, este indispensabil pentru semnalizarea mitogenilor, sugerând că rolul esențial al lanțului alpha este de a conferi înaltă afinitate de cuplare. La concentrație înaltă, IL-15 ca și IL-2, poate însă semnaliza printr-un complex IL-2R-beta/gamma, în absența subunității alpha (41).

IL-2R inductibil pe celulele dendritice nu pare necesar pentru dezvoltarea acestora și pentru stimularea sau reglarea răspunsului limfocitelor T. Subseturi de celule dendritice IL-2R-alpha(-/-) și normale răspund similar proliferativ (42).

Fibroblastele umane izolate din diferite țesuturi exprimă IL-2R. IL-2(¹²⁵I) cuplează la fibroblastele măduvei, pielii și plămânului embrionar. Fibroblastele transcriu constitutiv genele care codifică IL-2R-alpha/beta, acumulând mRNA, dar acțiunea IL-2R-gamma asupra nivelului mRNA și proteinei este afectată. Se constată că, adăusul de IL-2 culturii de fibroblaste nu alterează semnificativ cinetica creșterii acestor celule. Complexul IL-2R prezent pe fibroblaste pare să fie funcțional, deoarece adăusul de IL-2 duce la amplificarea expresiei genei JE care codifică MCP1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1). Deci, spectrul țintelor celulare ale IL-2 este mai larg decât s-a apreciat inițial, deoarece citokina poate servi la integrarea fibroblastelor și mononuclearelor în răspunsul coordonat al țesutului conjunctiv inițiat de limfocitele T (43).

IL-2 se asociază cu complexul CD3/TCR și interacționează cu oligozaharidul lui CD3 prin domeniul său de recunoaștere carbohidrat. Aceasta induce fosforilarea la tirozină a IL-2R-beta prin ++p56 (lck), prima treaptă a semnalizării IL-2. Deoarece această asociere specifică este perturbată in vitro de oligomonozide cu 5 și 6 reziduuri de manoză, s-a emis ipoteza că celulele bolnave și microorganismele ar putea cupla IL-2, perturbând consecutiv răspunsul dependent de această citokină.

Se arată că ciuperca *Candida albicans*, în contrast cu tulpina ei nepatogenă cuplează mari cantități de IL-2, ca și celulele canceroase. Spre deosebire de acestea din urmă, *Candida a.* nu cuplează lectina CSL specifică, Man6GlcNAc2, un amplificator endogen al activării semnalelor. Se urmărește demonstrarea faptului că IL-2 este o lectină specifică pentru oligozaharide, ceea ce ar explica existența unei noi funcții a acestei citokine, ca moleculă bifuncțională care se cuplează la receptorul său (44).

Transmiterea semnalului post-IL-2R

La transmiterea semnalului prin lanțul beta participă TK Jak1, Jak3, LCK și Syk. Jak1, LCK și Syk sunt asociate cu domeniul citoplasmatic al lanțului beta, pe când Jak3 este asociată cu domeniul citoplasmatic al lanțului gamma care este prezent în receptorii IL-2, IL-4, IL-7 și IL-15. S-a demonstrat că Jak1 este asociată cu lanțul alpha al receptorilor pentru IL-4, IL-7, IL-15 și cu lanțul beta al IL-2R. Două reziduuri prolină din regiunea box-1 care se conservă în IL-2R-beta/alpha al receptorilor citokinelor sunt esențial implicate în asocierea cu TK Jak1.

Transfectanți MOLT4 cu mutații în box-1 a IL-2R-beta, nu se asociază cu Jak1, răspunsul IL-2 exprimându-se prin termenii de activare Jak3 și Stat-5 și inducând creșterea celulei. Aceasta sugerează că Jak1 este dispensabilă pentru semnalizarea creșterii celulare mediate de IL-2 (45).

Celulele care exprimă o formă trunchiată a hIL-2R și pot induce expresia Bcl-2 și c-myc, dar nu a Stat-5, nu sunt protejate de apoptoză de către IL-2 și deci nu pot crește îndelung în prezența acesteia. Totuși, IL-2 inițiază progresia ciclului celular al celulelor care poartă hIL-2R-beta trunchiat cu viabilitate în fazele Go/G1, S și G2/M, similar cu celulele care exprimă hIL-2R tip-sălbatic.

Transplantarea la hIL-2R-beta trunchiat a unei regiuni din EpoR ce conține un loc pentru Stat-5 (y 343), restaurează abilitatea IL-2 de a induce activarea acestuia și protecția de apoptoză. Transplantarea unei regiuni din hIL-2R-alpha care conține situsul Stat-6 conferă, de asemenea, protecție contra apoptozei (46). Absența interacțiunii specifice Jak3 cu lanțul gamma c al IL-2R reprezintă baza biochimică pentru boala SCID-X, această imunodeficiență manifestându-se prin infecții recurente severe ce pot duce frecvent la decesul copiilor afectați.

O copie cDNA Jak3 a fost transdusă cu un vector în linii de celule B obținute de la subiecți cu SCID, deficienți în Jak3. Restaurarea expresiei JAK3 a permis fosforilarea prin IL-2 și IL-4. Celulele pacienților cărora li s-a transdus JAK3 au căpătat abilitatea de a prolifera normal ca răspuns la IL-2. Deci, deficiențele celulelor cu deficit în JAK3 pot fi corectate in vitro prin transfer de genă mediată retroviral, oferind astfel o bază terapiei genice pentru tratarea SCID cu deficit de Jak3 (47).

IL-2 induce rapid fosforilarea la tirozină a substratelor intracelulare precum sunt: lanțul beta al IL-2R, Jak1, Jak3, proteine care transmit semnalul activând transcrierile. Ea induce și asocierea SHP-1 (SH2-containing protein tyrosine phosphatase) cu complexul IL-2R, ceea ce conduce la scăderea IL-2R-beta și a tirozinkinazelor asociate Jak1 și Jak3 fosforilate la tirozină.

Expresia SHP-1 este scăzută considerabil sau chiar nedetectabilă într-un număr de linii T transformate de HTLV-I, independent de IL-2 și care au constitutiv Jak/Stat. Se sugerează că SHP-1 antagonizează calea transmiterii semnalului indus de IL-2 și că infecția HTLV-I și transformarea oncogenă pot conduce la pierderea expresiei SHP-1 ducând la o activare constitutivă a răspunsului T reglate de IL-2 (48).

IL-2 și virusurile

Administrarea IL-2 in vivo protejează șoarecii susceptibili la infecția persistentă cu virusul TMEV (Theiler Murine Encephalomyelitis Virus), un picornavirus care determină la șoarecii sensibili demielinizarea, inducând scleroze multiple. Tulpina DA a TMEV injectată intracranian, declanșează o manifestare bifazică; inițial afectează neuronii inducând encefalomyelită acută, iar ulterior abordează substanța albă unde produce inflamație cronică și demielinizare primară. Limfocitele T CD4+ intervin determinant în protecție, în stadiile timpurii, prin producerea de anticorpi anti-TMEV.

Șoarecii deficițari în beta-microglobuline nu dețin molecule MHC clasa I, celule CD8+ funcționale și precursori CTL specifici TMEV, fiind astfel inabili în a elimina virusul.

Celule tumorale secretoare de IL-2 administrate șoarecilor DBA/2 protejează total animalele contra infecției persistente cu TMEV. De asemenea, tratamentul cu IL2, arată o creștere de 3-4 ori a precursorilor CTL virus-specifici. Se impune ca tratamentul să se facă timpuriu în infecție (care să nu s-a cronicizeze), deoarece CTL sunt prezente la animalele rezistente la virus, în fazele timpurii ale infecției (49).

Celule din noduli limfatici autologi de la pisici infectate cu FeLV în culturi pe termen scurt cu concentrații scăzute de IL-2, modulează cursul infecției retrovirale la animalele infuzate i.v. cu $0,13-3,9 \times 10^8$ celule (50).

Infecția cronică a hepatocitelor cu virusul RNA HCV este mediată imunitar de limfocitele citotoxice. Activate, aceste celule eliberează forma solubilă (s)IL-2R a cărei concentrație este corelată cu gradul activării limfocitelor. Nivelul sIL-2R de la subiecți sănătoși și purtători de HCV pentru scurt timp, este același. Subiecții cu hepatită HCV cronică dețin nivele înalte de sIL-2R, care sunt legate mai curând de boala activă decât de replicarea virusului, ceea ce poate fi un marker pentru evoluția bolii (51).

Printre diferiții reglatori ai promotorului genei IL-2R-gamma, se consideră și proteina tax a HTLV-I, care crește expresia acestei gene, Dimpotrivă, IL-2 scade transcrierea IL-2R-gamma. Deci, expresia lanțului gamma este reglată la nivel transcripțional, de stimuli extracelulari și poate fi implicată în sistemul imunitar (52).

IL-2 și cancerul

Verificându-se rolul IL-2 în controlul proprietăților și potențialului de creștere al limfocitelor T transplantate în cultură, s-a constatat că alterarea funcțiilor sale ca și a receptorilor ei, duc la apariția formelor celulare aberante, cu implicații neoplazice în leucemia limfocitelor T adulte. În mod similar, transformatele cu un vector retroviral, care exprimă gena IL-2 umană în celulele T/CTLC-2 de șoarece, capătă capacitate nelimitată de creștere autonomă. Transplantate la șoareci timectomizați, aceste celule induc tumori (53).

Liniile celulare de melanom uman care exprimă IL-2R au abilitatea de a secreta IL-2. În linia M14 apare transcriptul specific de 0,9kb al genei IL-2, iar după 72 ore de cultură este elaborat IL-2 biologic activ ce susține specific proliferarea celulelor liniei CTLL2, linie limfoidă murină dependentă de IL-2. În celulele M14, rIL-2 induce scăderea expresiei ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule) de la suprafața acestor celule, ceea ce ar putea facilita unor celule din melanom să eludeze recunoașterea citolitică și astfel să favorizeze metastazarea (54).

Deci, citokinele au efecte potente asupra dezvoltării răspunsului imun anti-tumoral. Prin amplificarea acestui răspuns, ele pot susține reacția gazdei în rejectarea tumorilor. CTL pot juca un rol critic în succesul pe termen lung al imunoterapiei cancerului, pentru că au memorie și pot funcționa în absența citokinelor. IL-2 și IFN gamma amplifică sinergic dezvoltarea CTL in vitro, iar IL-2 crește și proliferarea efectorilor maturi (55).

Cu virusul Vaccinia recombinat cu gena pentru IL-2 uman, s-au infectat linii de adenocarcinom de colon CA51 și CT26 obținute de la șoareci BALB/c și cultivate în monostrat. S-a constatat liza rapidă a tumorilor, ceea ce a sugerat ideea că aceasta s-ar datora imunoterapiei impusă de IL-2 din recombinatul vaccinia-IL-2 (56,57).

Stabilirea prezenței IL-2R la nivelul celulelor nehematopoietice umane de origine mezenchimală și neuroectodermală, a condus la funcționalitatea acestei citokine; de aceea unele acțiuni citotoxice în timpul bioterapiei cu IL-2, s-ar datora interacțiunii acestei citokine, cu respectivele celule dotate cu IL-2R.

IL-2R funcțională s-a identificat și la nivelul unor tipuri de celule derivate din tumori solide umane. În unele cazuri, IL-2 inhibă creșterea celulelor carcinoamelor de cap, gât, gastric și renal, dar în alte cazuri ea stimulează creșterea și expansiunea acestor

tumori, cum sunt cele intestinale, mamare, pulmonare, glioamele, fibrosarcoamele și melanoamele. În unele linii celulare de carcinom mamar și melanom, s-a constatat secreția de IL-2 biologic activ. În celulele melanomului s-au descoperit transcriptele IL-15, care utilizează lanțurile beta și gamma ale IL-2R (58).

Activarea celulelor sistemului imunitar a permis elaborarea unei biotehnologii rDNA pentru limfokine, în ideea studierii potențialului acestora în activarea celulelor sistemului, mediind astfel distrucția celulelor tumorale. Celulele sistemului imunitar sunt implicate via produselor lor, și în rejectarea alogrefelor, a celulelor infectate cu virusuri și a celulelor neoplazice,

Deoarece IL-2 are o funcție critică în activarea limfocitelor citotoxice, care reprezintă principalele instrumente de distrucție a celulelor tumorale, ea este utilizată în terapia bolii canceroase. Terapia cu IL-2 este însă limitată de toxicitatea dozei ce poate determina hipotensiune, edem pulmonar, febră, oboseală, diaree. Terapia combinată IL-2+IFN+TNF sau cu anticorpi anti-antigenii asociați tumorii, aplicată pe modele animale, a relevat bune rezultate în special în cazul carcinoamelor renale. Se remarcă îndeosebi, combinația IL-2+IFN-alpha, spre deosebire de IL-2+IFN-beta, care are efecte mai limitate. TNF singur sau combinat cu IL-2 sau cu IFN-gamma este toxic și are efecte antitumorale foarte slabe (59).

Limfocitele T-TIL care nu manifestă citotoxicitate tumor-specifică, pot fi stimulate cu celule preactivate ale limfomului folicular, via CD40. Limfocitele T-TIL autologe se pot extinde prin adaus de IL-2 exogen. Aceste celule pot fi ulterior extinse in vitro, cu adaus exogen de IL-4, IL-7, IFN-gamma, dar nu de IL-12. Activate, ele se dovedesc citotoxice pentru limfomul folicular la 4 din 5 pacienți (60).

Administrarea subcutană timp de 3 zile a IL-2, induce limfopenie, iar activarea imună duce la creșterea procentului de NK (CD56) și de celule aparținând subsetului CD3/HLA-DR+ (limfocite T activate), fără nici o schimbare în procentul de celule T ale subsetului CD4+ sau a altor limfocite T (61).

La subiecți cu sindrom mielodisplazic, scad funcțiile celulelor NK și LAK; injectarea subcutană zilnică timp de 12 săptămâni a 10 pacienți cu un milion unități IL-2, arată că numărul celulelor CD16+/CD56+ se păstrează, statutul hematopoietic rămâne neschimbat, iar toxicitatea este minimă (62).

Linii imunogenice de melanom secretor de IL-2, pot induce reacții sistemice, care ar putea afecta leziunile metastazate. Pacienți cu melanom visceral și/sau subcutan au fost vaccinați subcutan cu celule melanotice în care s-a transdus gena hIL-2. Tratamentul diferit la grupe diferite de purtători de melanom a dat numai rezultate parțiale (63).

Blastele primare din AML (Acute Myeloid Leukemia) sunt rezistente la acțiunea PBMC activate de IL-2 obținute de la indivizi normali, de la pacienți alogenici și autologi, în 5, 6 și 8 din 10 probe. S-a observat un efect sinergic al dozelor mici de IL-2+IL-12, liza celulelor fiind mai mare decât cea declanșată de fiecare citokină în parte. Deci, blastele rezistente la IL-2 pot fi lizate de combinația IL-2+IL-12 în doze mici (64).

S-a construit un mic imunoliposom ca vehicul pentru rhIL-2, în scopul activării celulelor T cu înaltă afinitate pentru IL-2R. Acest sistem este valabil pentru indivizii la care IL-2 nu produce reacții toxice pentru sistemul imunitar și pentru alte țesuturi. Finalmente se obține rejectarea grefei tumorale (65). Toxicitatea tratamentului cu doze

mari de IL-2 îi limitează folosirea în terapia antitumorală, în special la persoane în vârstă. Se încearcă tratamentul cu IL-2 prin impulsuri (expunere puls-scurte) pentru a se obține celule citotoxice LAK la pacienți cu un anumit tip de cancer (66).

Folosirea ca agent anti-neoplazic a citokinei IL-2 este limitată datorită toxicității ei, în funcție de doză. În toxicitate intervine NO și TNF. Animalele purtătoare de hepatom stabilizat, tratate cu IL-2+guanil hidrazona CNI-1493, arată că 10 din 10 tumori regresează de la 1cm³ la sub 1mm³. La aceste animale, nivelele intracitoplasmice de TNF sunt crescute în țesuturile normale. Pe de altă parte, gradul apoptozei după terapia cu IL-2 nu este diferit față de tratamentul cu IL-2+CNI. Deci, dozele mici și infrecvente de guanil hidrazonă CNI-1493, protejează marcat animalele, de toxicitatea IL-2 și nu afectează răspunsul tumorilor la terapia cu această citokină (67).

NO mediază un spectru de procese fiziologice în vascularizație. Este principalul determinant al tonusului vascular, supraprodusul lui fiind implicat în patogeneza supresiei și în hipotensiunea induse de citokine. Enzima care produce NO, nitric oxid sintaza, există în 3 izoforme: NO sintaza inductibilă se exprimă în numeroase tipuri celulare numai în urma stimulării cu citokine și/sau endotoxine și generează cantități mari de NO timp îndelungat. Enzima se produce în serul persoanelor cu un tip de cancer, în urma terapiei cu IL-2, ceea ce duce la producerea excesivă de NO. Terapia cu IL-2 este asociată cu un spectru de toxicitate cardiovasculară și cu alterări hemodinamice care nu se disting de cele din șocul septic.

Multe efecte hemodinamice sunt legate de NO via unor citokine care induc NO. Inhibarea sintezei de NO este o nouă terapie prin care se poate limita toxicitatea cardiovasculară asociată cu terapia cu IL-2 exprimată prin hipotensiune (68). Terapia cu IL-2 și creșterea producției de NO conduc la o cascadă de evenimente, care direct sau indirect, afectează scurgerea de fluide din capilare. La șoarecii tratați cu IL-2 este posibilă blocarea hiperproducției de NO fără a afecta efectul antitumoral al citokinei (69).

Diferite experimente demonstrează că IL-2 poate acționa și în stimularea creșterii tumorilor. IL-2 și IL-4 participă la reglarea creșterii autonome și a genezei celulelor limfoide transformate. Liniile tumorale murine de LSA (limfom indus de virusul leucemic EL4), de limfom indus chimic (PE-3T) și de plasmocitom (P815) exprimă abundent genele IL-2R și IL-4R. Numai liniile LSA și PE-3T exprimă constitutiv aceste gene, în timp ce linia P815 exprimă constitutiv numai gena IL-4.

Anticorpi monoclonali anti-IL-2, anti-IL-4 și anti-IL-2R inhibă specific in vivo proliferarea liniei LSA, dar nu și a celorlalte linii tumorale. Adăugul de IL-2 sau IL-4 exogene în culturi de celule tumorale, determină amplificarea semnificativă a celulelor PE-3T și nu afectează celelalte linii. Deci, IL-2 și IL-4 servesc ca factori de creștere autocrini în proliferarea celulelor tumorale, în special a celor induse de retrovirusuri (70).

IL-2, IL-2R și mRNA lor sunt prezente în carcinoamele umane, atât in vitro cât și in vivo. În faza G2/M a ciclului lor, celulele carcinomatoase acționează sinergic și exprimă semnificativ mai multă IL-2 și IL-2R-beta/gamma citoplasmice, decât celulele tumorale aflate în faza Go/G1. Cea mai marcată expresie a IL-2 în celulele tumorale mitotice, s-a identificat prin dubla colorare cu anticorpi anti-Ki 67, iar nivelul cel mai înalt al expresiei IL-2-Ki-67 s-a observat în carcinomul slab diferențiat (index 67,2% pentru IL-2 și 68,8% pentru Ki-67). În schimb, carcinoamele diferențiate conțin mai puține proteine (35% pentru IL-2 și 26,5% pentru Ki-67) (71).

1. Taguchi T. Interleukin-2 (IL-2). *Gan.To-Kagaku-Ryoho*, 1994, 27 (5), 719-724.
2. Morris SM. Aidaoo A. Domon E. McGrawy L. Kodell RL. Schol HN. Hinson WG. Pipkin JL. Environ. Effect of interleukin-2 on cell proliferation, sister-chromatid exchange induction and nuclear stocss protein phosphorylation in PHA-stimulated Fischer 344 not spleen lymphocytes: modulation by 2-mecaptoethanol. *Environ and Mol.Mutagenesis*, 1990, 15, 1, 10-18.
3. Mooker JEE. Chen PB. Pauly JL. IL-2-induced polyclonal proliferation of human peripheral blood lymphocytes: functional and phenotypic characteristics of proliferating cells. *Immunology*, 1989, 66, 2, 176-182.
4. Vakkila J. Hurme M. Activation of T-cells by human dendritic cells is based on efficient stimulation of interleukin-2 secretion. *J.Cell Biochem.*,1989, suppl.13A, 211.
5. Pihwa R. Chotila T. Pahwa S. Paradise C. Doy NK. Geha R. Schwartz SA. Slade H. Oyaizu N. Good RA. Recombinant interleukin-2 therapy in severe combined immunodeficiency disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 13-C, 5069-5073.
6. Valge VE. Wong JGP. Datiof BM. Sinsker AJ. Hoo A. Protein kinase C is required for responses to T cell receptor ligands, but not to interleukin-2 in T cells. *Cell*, 1988, 55, 1, 101-112.
7. Belfrage H. Dohlsten M. Hedlund G. Kalland T. Prevention of superantigen-induced down-regulation of T-cell mediated cytotoxic activity by IL-2 in vivo. *Immunology*, 1997, 90, 183-188.
8. Finke JH. Yen-Lieberman B. Scott JW. Proffitt MR. Orosz CG. Phorbol Ester-Inactivation of Cloned Cytotoxic T Lymphocytes: Restoration of Lytic Activity by Interleukin 2 and Induction of Interferon Production are Separable Events. *Lymphokine Research*, 1985, 4, 4, 299-302.
9. Parra E. Varga M. Hedlund G. Kalland T. Dohlsten M. Costimulation by B7-1 and LFA-3 Targets Distinct Nuclear Factors That Bind to the Interleukin-2 Promoter: B7-1 Negatively Regulates LFA-3-Induced NF-AT DNA Binding. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17, 3, 1314-1323.
10. Sambasivarao D. Hooton J. DostA. Paetkau Y. A novel immunosuppressive factor in bovine colostrum blocks activation of the interleukin-2 gene enhancer at the NFAT site. *Biochem. Cell Biol.*, 1996, 74, 585-593.
11. Pyett DW. Stilman WS. Irons RA. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF-kappa B in primary human CD4+ T lymphocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1991, 149 (2), 178-84.
12. Tsatsanis C. Patriotis C. Bear SE. Tsihchlis PN. The Tpl-2 protooncprotein activates the nuclear factor of activated T cells and induces interleukin 2 expression in T cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95 (7), 3827-32.
13. Yasui DH. Genetta T. Kadesh T. Williams TM. Swain SL. Tsui LV. Hubert BT. Transcriptional repression of the IL-2 gene in Th cell by ZEB. *Journal of Immunology*, 1998, 160 (9), 4433-40.
14. van den Berg AP. Twilhaar WN. Mcsander G. van Son WJ., van der Bijw, Klampmaker IJ. Slooff MJ. The TH. De Leij LH. Quantitation of immunosuppression by flow cytometric measurement of the capacity of T cells for interleukin-2 production. *Transplantation*, 1998, 65 (8), 1066-71.
15. Steiger JU. Transplantation immunology: is the manipulation of the cytokine network therapeutically justified?. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift Journal Suisse de Medicine*, 1998, 128 (10), 349-55.
16. Reya T. Contractor NV. Couzens MS. Wasik MA. Emerson SG. Carding SR. Abnormal myelocytic cell development in interleukin-2 (IL-2) deficient mice: evidence for the involvement of IL-2 in myeloipoiesis. *Blood*, 1998, 91 (8), 2935-47.
17. Su HC. Consens LP. Fast LD. Slizka MK. Bungire RA, Ahmed R. Biron CA. CD4+ adnd CD8+ T cell interactions in IFN-gamma and IL-4 responses to viral infections: requirements fot IL-2. *Journal of Immunology*, 1998, 160 (10), 5007- 17.
18. Contractor NV. Bassiri H. Reya T. Park AY. Baumgart AC. Wasik MA. Emerson SG. Carding SR. Lymphoid hypoplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. *Journal of Immunology*, 1998, 150 (1), 385-94.
19. Nishizawa K. Koyasu S. IL-2 and IL-7 differentially induce CD4-CD8-alpha beta TCR+NK 1.1 large granular lymphocytes and IL-4-producing cells from CD4-CD8-alpha beta TCR+NK 1.1 cells: implications for the regulation of Th1- and Th2-type responses. *International Immunology*. 1997, 9 (8), 1123-9.

20. Bykowska SN. Buffo MJ. Bunker M. Zhang H. Majors A. Herbert M. Lokshin A. Levitt ML. Iaja A. Scalise D. Kosiban D. Evans C. Marks S. Shogan J. Interleukin-2 induces development of dendritic cells from cord blood CD34+ cells. *Journal of Leucocyte Biology*, 1998, 63 (5), 620-30.
21. Ascherman DB. Migone TS. Friedmann MC. Leonard WJ. Interleukin-2 (IL-2)-mediated Induction of the IL-2 Receptor alpha chain Gene. Critical role of two functionally redundant tyrosine residues in the IL-2 receptor beta chain cytoplasmic domain and suggestion that these residues mediate more than Stat 5 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272, 13, 8704-8709.
22. Crosier YG. Raber J. Chan CC. Kriete MS. Benichou J. Pilon RS. Kerwin JA. Waldmann TA. Hakimi J. Roberge FG. Humanized Antibodies Against the alpha-Chain of the IL2 Receptor and Against the beta-Chain Shared by the IL-2 and IL-15 Receptors in a Monkey Uveitis Model of Autoimmune Diseases. *The Journal of Immunology*, 1997, 158, 452-458.
23. Weissenhorn W. Scheuer W. Kaluza B. Schwirzke M. Reiter C. Flieger D. Lenz H. Weiss EH. Rieber EP. Riethmuller G. Weidle UH. Combinatorial functions of two chimeric antibodies directed to human CD4 and one directed to the alpha-chain of the human interleukin-2 receptor. *Gene*, 1992, 121, 271-278.
24. Rohwer F. Todd S. McGuire KJ. The Effect of IL-2 Treatment on Transcriptional Attenuation in Proto-oncogenes pim-1 and c-myb in Human Thymic Blast Cells. *The Journal of Immunology*, 1996, 157, 643-649.
25. Taniguchi T. Miyazaki T. Minami Y. Kawahara A. Fujii H. Nakagawa Y. Hatakeyama M. Liu ZJ. IL-2 signaling involves recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the IL-2 receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1995, 766, 235-44.
26. Di Santo JP. Kuhn R. Muller W. Common cytokine receptor gamma chain (gamma c)-dependent cytokines: understanding in vivo function by gene targeting. *Immunological Review*, 1995, 148, 19-34.
27. Shi YT. Hill M. Novak A. Chen ZQ. Wang RX. Liew CC. Mills GB. Human hematopoietic cell express two forms of the cytokine receptor common gamma-chain (gamma c). *Cell Research*, 1997, 7 (2), 195-205.
28. Bani L. David D. Moreau JL. Cayota A. Nakarai T. Ritz J. Theze J. Expression of the IL-2 receptor gamma subunit in resting human CD4 T lymphocytes: mRNA is constitutively transcribed and the protein stored as an intracellular component. *International immunology*, 1997, 9 (4), 573-80.
29. Saito S. Morii T. Umekage H. Makita K. Nishikawa K. Narita N. Ichijo M. Morikawa M. Ishii N. Nakamura M. Sujamura K. Expression of the interleukin-2 receptor gamma chain on cord blood mononuclear cells. *Blood*, 1996, 87 (8), 3345-50.
30. Itano M. Tsuchiya S. Morita S. Fujie H. Ishii N. Yanagisawa T. Ohashi Y. Minegishi M. Ugamura K. Konno T. IL-2 receptor gamma chain expression on CD34 positive hematopoietic progenitor cells from bone marrow and cord blood. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 1996; 178 (4), 389-98.
31. Mohamadzadeh M. Ariizumi K. Sugamura K. Bergstresser PR. Takashima A. Expression of the common cytokine receptor gamma chain by murine dendritic cells including epidermal Langerhans cells. *European Journal of Immunology*, 1996, 26 (1), 156-60.
32. Reinecker HC. Padolsky DB. Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92 (18), 8353-7.
33. Taylor N. Uribe L. Smith S. John T. Kohn DR. Weinberg K. Correction of interleukin-2 receptor function in X-SCID lymphoblastoid cells by retrovirally mediated transfer of the gamma-c gene. *Blood*, 1996, 87 (8), 3103-7.
34. Leonard WJ. The molecular basis of x-linked severe combined immunodeficiency: defective cytokine receptor signaling. *Annual Review of Medicine*, 1996, 47, 229-39.
35. Haccin-Bey H. Cavazzana-Calvo M. Le Deist F. Dautry-Varsat A. Fischer A. De Saint BG. Gamma c gene transfer into SCID X1 patients' B-cell lines restores normal high-affinity interleukin-2 receptor expression and function. *Blood*, 1996, 87 (8) 3108-16.
36. Cao Y. Shores EW. Hu-Li J. Anver MR. Kelsall BL. Russel SM. Drago J. Noguchi M. Grienberg A. Bloom ET. et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity*, 1995, 2 (31), 223-38.

37. Suzuki H.et al. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J.Exp.Med.*, 1997,, 185 (3), 499-505.
38. Zhu MH: Berry JA. Russell SH. Leonard WJ. Delineation of the regions of interleukin-2 (IL-2) receptor beta chain important for association of Jak 1 and Jak 3. Jak 1-independent functional recruitment of Jak 3 to IL-2R beta. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 27, 3, 10719-25.
39. Suminami Y. Kashii Y. Law JC. Un WC. Stancon J. Reichert TE. Rabinowich H. Whiteside TL. Molecular analysis of the IL-2 receptor beta chain gene expressed in human tumor cells. *Oncogene*, 1998, 16 (10), 1309-17.
40. Hardt C.et al. Detection of rearranged T cell receptor beta-chain gene and induction of cytolytic function in interleukin-2-responsive day 14-15 murine fetal thymocytes. *Eur.J.Immunol.*,1986, 16 (9), 1087-1092.
41. Anderson DM.et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL-15RA and IL-2RA genes. *Biol.Chem.*,1995, 270 (50), 29862-29891.
42. Kronin V. Vremec D. Shortman K. Does the IL-2 receptor alpha chain induced on dendritic cells have a biological function? *International Immunology*, 1998, 10 (2), 237-40.
43. Gruss HJ. Scott C. Rollins BJ. Brach MA. Herrmann F. Human fibroblasts express functional IL-2 receptors formed by the IL-2R alpha-and delta-chain subunits: association of IL-2 binding with secretion of the monocyte chemoattractant protein-1. *Journal of immunology*, 1996, 157 (2), 851-7.
44. Zanetta JP. Bonaly R. Maschke S. Strecker G. Michalski JC. Differential binding of lectins IL-2 and CsL, to *Candida albicans* and cancer cells. *Glycobiology*, 1998, 8 (3), 221-5.
45. Higuchi M. Asao H. Tanaka N. Oda K. Takeshita T. Sugamura K. Regulation of IL-2 signaling. *Leukemia*, 1997,11, suppl.3, 416-7.
46. Zamorano J. Wang NY. Wang R. Shi Y. Longmore GD. Keegan AD. Regulation of cell growth by IL-2: role of STAT 5 in protection from apoptosis but not in cell cycle progression. *Journal of Immunology*, 1998, 160 (7), 3502-12.
47. Candotti F. Oakes SA. Johnston JA. Notarangelo LA. O'Shea JJ. Blaese RM. In vitro correction of Jak 3-deficient severe combined immunodeficiency by retroviral-mediated gene transduction. *Journal of Experimental Medicine*, 1996, 183 (6), 2687-92.
48. Migone TS. Caccolano NA. Taylor N. Yi T. Waldmann TA. Johnston JA. Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin-2 receptor: loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus type I-transformed T cells. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA*, 1998, 95 (7), 3845-50.
49. Larsson-Sciard EL. Dethlefs S. Brahic M. In Vivo Administration of Interleukin-2 Protects Susceptible Mice from Theiler's Virus Persistence. *Journal of Virology*, 1997, 71, 1, 797-799.
50. Blakeslee J. Noll G. Olsen R. Triazzi PL. Adoptive immunotherapy of feline leukemia virus infection using autologous lymph node lymphocytes. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 1998, 18 (1), 1-6.
51. Gessoni G. Valverde S. Giacomini A. Antico F. Manoni F. In subjects with antibody to hepatitis C virus a high serum level of interleukin-2 soluble receptor suggests activity of liver disease. *Journal of Viral Hepatitis*, 1998, 5 (2), 99-103.
52. Ohbo K. Takasawa N. Ishii N. Tanaka N. Nakamura M. Sugamura K. Functional analysis of the human interleukin-2 receptor gamma chain gene promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (13), 7479-86.
53. Yamada G. Kitamura Y. Sonoda H. Harada H. Taki S. Mulligan RC. Osawa H. Diamantstein T. Yokoyama S. Taniguchi T. Retroviral expression of the human IL-2 gene in a murine T cell line results in cell growth autonomy and tumorigenicity. *EMBO Journal*, 1987, 6, 9, 2705-2709.
54. Alileche A. Plaisance S. Han DS. Rubinstein E. Mingari C. Bellomo R. Jasmin C. Azzarone B. Human melanoma cell line M14 secretes a functional interleukin 2. *Oncogene*, 1993, 8, 1791-1796.
55. McAdam A. Pulaski B. Harkins S. Hutter E. Frelinger J. Lord AE. Coexpression of IL-2 and gamma-IFN Enhances Tumor immunity, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993, 690, 349-351.
56. Bash JA. Active Specific Immunotherapy of Murine Colon Adenocarcinoma with Recombinant Vaccinia/Interleukin-2-Infected Tumor Cell Vaccines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993, 690, 331-333.

57. Bash JA. Recombinant Vaccinia Interleukin-2-Infected Tumor Cell Vaccines in Immunotherapy of Murine Colon Adenocarcinoma. *Journal of Immunology*, 1993, 14, 269-272.
58. Azzarone B. Pottin-Clemenceau C. Rubinstein E. Jasmin C. Scudeletti M. Indiveri F. Are interleukin-2 and interleukin-15 tumor promoting factors for human non-hematopoietic cells? *European Cytokine Network*, 1996, 7 (1), 27-36.
59. Vilcek J. Sen CG. Interferons and other cytokines, 375-394. In *Filds Virology*, 1996. Third Edition, Ed. by Filds BN. Knipe DM. Howley PM. et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia,
60. Schultze JL. Seamon MJ. Michalak S. Gribben JG. Nadler LM. Autologous tumor infiltrating T cells cytotoxic for follicular lymphoma cells can be expanded in vitro. *Blood*, 1997, 89 (10), 3806-16.
61. Johnston SR. Constenla DO. Moore J. Atkinson H. A'Hern RP. Dadian. Riches PG. Gore ME. Randomised phase II trial of BCAT [carmustine (BCNw), cisplatin, dacarbazine (DTIC) and tamoxifen] with or without interferon alpha (IFN-alpha) and interleukin (IL-2) in patients with metastatic melanoma. *British Journal of Cancer*, 1998, 77 (8), 1280-6.
62. Nand S. Stock W. Stiff P. Sosman J. Martone B. Radvany R. A phase II trial of interleukin-2 in myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*, 1995, 101 (1), 205-7.
63. Belli F. Arienti F. Sub-Suso J. Clemente C. Mascheroni L. Cattelan A. Santantonio C. Gallino GF. Melani C. Rao S. Colombo MP. Maio M. Cascinelli N. Parmiani G. Active immunization of metastatic melanoma patients with interleukin-2-transduced allogeneic melanoma cells: evaluation of efficacy and tolerability. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 1997, 44 (4), 197-203.
64. Vitalo A. Guarini A. Latagliata R. Cignetti A. Foa R. Cytotoxic effectors activated by low-dose IL-2 plus IL-12 lyse IL-2-resistant autologous acute myeloid leukaemia blasts. *British Journal of Haematology*, 1998, 10 (1), 150-7.
65. Konigsberg PJ. Godtel R. Kissel T. Richer LL. The development of IL-2 conjugated liposomes for therapeutic purposes. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1998, 1370 (2), 243-251.
66. Provinciali M. Di Stefano G. Stronatis S. Fabris N. Generation of human lymphokine-activated killer cells following an IL-2 pulse in elderly cancer patients. *Cytokine*, 1998, 10 (2), 132-9.
67. Kemeny MM. Botchkina GI. Ochani M. Bianchi M. Urmacher C. Tracey KJ. The tetravalent guanlylhydrazone CNI-1493 blocks the toxic effects of interleukin-2, without diminishing antitumor efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95 (8), 4561-6.
68. Shahidi H. Kilbourn RG. The role of nitric oxide in interleukin-2 therapy induced hypotension. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1998, 17 (1), 119-26.
69. Orucevic A. Lala PK. Role of nitric oxide in IL-2 therapy-induced capillary leak syndrome. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1998, 17 (1), 127-42.
70. Hassuneth MR. Nagarkatti PS. Nagarkatti M. Evidence for the participation of interleukin-2 (IL-2) and IL-4 in the regulation of autonomous growth and tumorigenesis of transformed cells of lymphoid origin. *Blood*, 1997, 89 (2), 610-20.
71. Reichert TE. Watkins S. Stanson J. Johnston JF. Whiteside TL. Endogenous IL-2 in cancer cells: a marker of cellular proliferation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1998, 46 (5), 603-11.

INTERLEUKINA-4 (IL-4)

Interleukina-4 a fost descoperită în 1982, în supernatantul obținut din celulele timomului EL4 stimulate cu PMA. Inițial a fost desemnată ca factor de creștere a limfocitelor B (BCGF), deoarece s-a remarcat prin proprietatea de a determina limfocitele B stimulate-IgM, să intre în faza S a ciclului celular. Este o citokină pleiotropică produsă la om de limfocite T, mastocite și bazofile activate. Ca structură, este un complex glicoproteic de 18-20kD (în gel filtrat) și de 12-15kD (în SDS-PAGE).

Deglicozilarea IL-4 de la șoareci și om rezultă în polipeptidul de 15-16kD care își conservă bioactivitatea. Reducerea moleculei conduce atât la pierderea punțiilor -S-S cât și a bioactivității. hIL-4 este format din 140 reziduuri aminoacizi, iar mIL-4 din 153 reziduuri. Acestea sunt glicoproteinele secretate de 120 aminoacizi (mIL-4) și de 129 aminoacizi (hIL-4). hIL-4 deține 3 punți -S-S, fiind foarte similară cu GM-CSF, M-CSF și hormonul de creștere.

IL-4 cuplează la receptorii ce dețin subunitatea alpha de 140kD, identificată ca parte componentă a receptorilor pentru IL-2, IL-7, IL-9 și IL-15. Domeniul extracelular al lanțului alpha și forma solubilă sIL-4R a proteinei de 140kD sunt formate din 207-223 aminoacizi și au 22,8-23kD. sIL-4R participă la cuplarea cu înaltă afinitate a IL-4.

Subunitatea gamma c poate fi comună pentru receptorii IL-4 și IL-13. Complexul care se internalizează este format din două molecule ale porțiunii extracelulare a receptorului și dintr-o moleculă IL-4.

La om, gena IL-4 este localizată pe cromosomul 5 laolaltă cu genele IL-3, IL-5 și GM-CSF. Prezența acestor gene la distanțe foarte mici a sugerat ideea existenței unei familii de citokine, în ciuda faptului că n-au structură similară, dar aparțin aceluia care intervin în hematopoieză.

La șoareci, genele menționate la om, sunt localizate pe cromosomul 11. Secvențierea genomului și compararea cDNA al celor 4 gene relevă că acestea sunt formate din 4 exoni de dimensiuni similare, cu excepția genei IL-3 unde cel de al treilea exon este clivat în două. De asemenea regiunea netranslatată 5' a fiecărei gene are dimensiuni comparabile. Transcriptele mRNA au diferite dimensiuni datorită lungimii variate a regiunii netranslate 3', de 104pb pentru IL-4 și de 1092pb pentru IL-5 neincluzând coada poliA. Proteina IL-4 prezintă 4 regiuni majore alpha-helicale care, spre deosebire de ale celorlalte 3 gene ale familiei, sunt mai lungi.

IL-4 și IL-5 sunt elaborate de limfocitele Th2, ca răspuns la aceeași stimuli. Limfocitele Th1 CD4+ produc IL-2, IFN-gamma și limfokină, iar Th2 CD4+ produc IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 și IL-13. Cele două populații de limfocite T care elaborează IL-4 și IL-5 s-au identificat în urma cultivării lor îndelungate. Ca urmare a stimulării in vitro cu mitogeni sau cu aloantigeni, limfocitele T proaspăt izolate secretă cele două citokine în cantități insuficiente, dar pot fi stimulate să secrete IL-4 prin adăugarea de anticorpi anti-CD3.

IL-4 elaborat de celulele Th2 induce transformarea limfocitelor T, din fenotipul CD4+ în fenotipul CD8+ (1), fiind astfel implicată în lanțul de reacții ce intervin în reglarea sistemului imunitar. Acest fapt a fost demonstrat in vivo de De Waal MP et al. (2). Cu tehnica imunobloting autorii au stabilit că IL-4 induce în clonele CD4+, expresia genei CD8+, celulele evidențiind antigeni CD8+. Autorii au cultivat celule T care activează limfocitele B transformate de EBV; au introdus în cultură IL-4 și anticorpi monoclonali anti-IL-2, iar în lotul martor IL-4, IL-2 și anticorpi monoclonali exclusiv anti-IL-4. S-a constatat că în lotul în care IL-4 a fost activ, 47% din clonele separate erau de CD4+ și CD8+, în timp ce în lotul martor, unde IL-2 este activ iar IL-4 este blocat, CD4+ nu s-a transformat în CD8+ (2).

IL-4 determină proliferarea timocitelor umane stimulate cu 12-O-tetradecanoil forbol-13 acetat, ceea ce nu se întâmplă cu limfocitele sângelui periferic. Prin cultivarea timocitelor cu IL-4, numărul celulelor care exprimă antigenii de suprafață (CD3, CD5, TCR-1) ai celulelor T mature crește, dar scade numărul celor cu CD1. Răspunsul cel mai marcat la IL-4 îl exprimă limfocitele T mature CD5. Îndepărtarea celulelor care exprimă CD3 duce la diminuarea reacției proliferative indusă de IL-4 (3).

Studiul proceselor de inducere a generațiilor de limfocite citotoxice de către IL-4 endogen, relevă că hrIL-2 determină la șoareci, apariția de subpopulații imature de timocite citotoxice care secretă IL-4. Timocitele normale capătă proprietăți citotoxice și la interacțiunea concavalina A + IL-2. Se constată că în toate populațiile de timocite imature stimulate, are loc suprapunerea citotoxicității cu secreția de IL-4.

În interrelațiile celulelor T cu citokinele, s-a demonstrat că acestea elaborează IL-2 și IFN gamma, care pot induce sinteza de IL-1 de către monocite și macrofage. În funcție de concentrație, IL-4 are efect supresiv asupra IL-1, la nivel transcripțional (3). În cascada reacțiilor implicate în imunitate, se admite că momentul sintezei IL-4 coincide cu toxicitatea limfocitelor T CD8+ care lizează celulele infectate cu virusuri, celulele tumorale și cele senescente.

După diferențierea limfocitelor T în Th1 și Th2, acestea se stabilizează și deci nu se mai pot diferenția într-un fenotip opus sau reversat pentru secreția de citokine naive. IL-4 induce populații sau clone de TCL (Th1CD4+) în condițiile în care acestea pierd abilitatea de a sintetiza IL-2. Aceste celule pot elabora IFN gamma, GM-CSF și TNF, dar nu citokine tip Th2 și nu alterează expresia markerilor de suprafață.

IL-4 inhibă rapid abilitatea celulelor prezentatoare de antigen, de a sintetiza în prezența sau absența IL-2, reieșind că citokina acționează direct pe celulele TCL. Defectul în sinteza IL-2 nu poate fi reversat prin stimularea ulterioară a celulelor potențate de antigeni în prezența IL-2 și a anticorpilor anti-IL-4, anti-CD3 sau anti-CD28.

In vivo, în timpul răspunsului Th1/Th2, IL-4 poate induce conversia TCL-IL-2+, în TCL-IL-2- și astfel poate exprima răspunsul TCL fără a afecta pe termen scurt funcția

de efector. IL-4 este esențial pentru diferențierea Th naive către fenotipul Th2, dar inhibă diferențierea tipului Th1. De asemenea, inhibă abilitatea celulelor TCL-CD28 diferențiate de a sintetiza IL-2 care, în timpul tratamentului cu IL-4 nu reversează situația. Capacitatea funcțională a TCL nu este însă afectată de lipsa secreției de IL-2. TCL-CD8+ care secretă (IL-2+) sau nu (IL-2-) sunt inactivate citolitic, în schimb apărând cantități normale de alte citokine TCL, precum IFN-gamma, GM-CSF și TNF. Totuși, proliferarea ulterioară a TCL-IL-2- devine dependentă de IL-2 exogen, sugerând un proces de inhibare încrucișată a citokinelor Th1 și Th2 (4).

IL-4, limfocitele T și alte tipuri celulare

Citokinele antiinflamatorii IL-4 și IL-13 reglează metabolismul fierului în macrofagele activate, creșterea rezervei de fier în acestea controlându-le funcția de efector în sensul încetinirii acestei funcții, prin supresarea oxidului nitric (NO) via sintezei NO indusă de IFN-alpha/LPS (5).

Șoarecilor BALB/c li s-a injectat ip., liposomi cationici ce conțineau plasmide cu gena hIL-4 sau gena IL-13. La 48 ore, în ficatul și splina animalelor s-a detectat mRNA al ambelor gene. Șoarecii martori au primit doze letale de LPS (obținute din E.coli) cu D-galactozamină. S-a constatat că, transferul genici cu IL-4 reduce producția de TNF-alpha, de unde concluzia că in vivo limfocitele IL-4 și IL-13 au marcată activitate antiinflamatorie. Funcțiile imunitare ale macrofagelor peritoneale sunt semnificativ ameliorate, mai eficientă dovedindu-se IL-13 în capacitatea de modulare imunologică a acestor celule (6).

Apariția la șoarecii DBA/1 a artritelor induse de collagen este însoțită de răspunsul predominant Th1, caracterizat prin producția citokinelor proinflamatorii IFN-gamma și TNF-alpha, ca și prin abundența anticorpilor anti-collagen IgG2a.

În cazul artritelor induse de collagen, s-au urmărit nivelele IgG anti-CII și IgE, după administrarea continuă de IL-4 exogen (citokină Th2). Expunerea continuă timp de 28 zile la IL-4 întârzie apariția artritelor (de la 19 la 37 zile) și supresează simptomele clinice. După oprirea tratamentului manifestările apar între 13-24 zile. Deși simptomele sunt similare cu cele de la martori (care n-au primit IL-4), histologic, leziunile sunt mai puțin severe. În timpul tratamentului, la nivelul celulelor sinoviale scad semnificativ anticorpii anti-collagen și secreția de TNF-alpha (de 1000 ori). Se apreciază că proprietățile antiinflamatorii ale IL-4 sunt mediate, în parte, de reglarea diminuată a răspunsului Th1, mai curând decât de reglarea superioară a răspunsului Th2 (7) și că, această citokină joacă un rol central în patogenia inflamației alergice prin inducerea IgE.

Factorii de transcriere precum GATA-3, NF-IL-6 se exprimă preferențial în celulele Th2 cu rol important în reglarea activității promotorului IL-4. În expresia specifică pentru IL-4 a celulelor Th2, expresie controlată de un sistem multifactorial, pot fi direct implicați și alți factori de transcriere valabili și pentru Th1 (8).

Diferențierea limfocitelor T CD4+ în Th1 și Th2 în urma stimulării cu patogeni este influențată de mediul de citokine în care apare primar antigenul inițial (9). IL-1 și IL-10, ca și hormonii calciferol și progesterol au un rol favorizant pentru dezvoltarea celulelor Th2. Dimpotrivă, citokinele IFN-alpha, IL-12 și TGF-beta joacă un rol negativ (10).

Activitatea celulelor T CD4+ depinde de recunoașterea de către acestea a peptidului MHC cl. II și de costimularea cu CD28-B7. Diferitele nivele ale costimulării pot influența diferențierea Th în Th1 versus Th2. La șoarecii transgenici care exprimă pe celulele B nivele reduse de MHC cl.II, s-a demonstrat că diferențierea Th in vivo este influențată și de densitatea expresiei MHC cl.II. Răspunsul limfocitelor T era dominat de IFN-alpha (citokină Th1), cu nivel redus de IL-4 (citokină Th2) comparativ cu controlul. In vivo, prezentarea antigenului poate determina fenotipul celulei efectoare (11). IL-4 amplifică expresia de suprafață a R4-CXC asupra limfocitelor T din sângele periferic și din cordonul ombilical.

Clonele de Th2 polarizate exprimă nivele variate de R4-CXC, care însă sunt nedetectabile pe clonele Th1, dar expresia poate fi indusă după cultivarea cu IL-4 pe termen scurt.

IL-4 sensibilizează celulele T CD4+ la infecția cu HIV via R4-CXC, și promovează migrarea acestora indusă de SDF-1 (Stromal Derived Factor). R4-CXC indus de IL-4 este funcțional când interacționează cu ligandul său SDF-1. Ea activează kinaza p42 MAP-ERK-2 și induce prin R4-CXC clonele T via moleculelor de suprafață CD28 sau CD3 și CD2 (12).

Semnalizarea CD28 este critică pentru producția de IL-2 prin stabilirea clonelor de Th1. Majoritatea clonelor limfocitelor T provenite de la șoarecii CD28(+/+) suportă multiple stimulări, în timp ce clonele limfocitelor T provenite de la șoarecii CD28(-/-) supraviețuiesc numai în prezența IL-4 sau IL-2 și IL-4. În cultură primară, stimularea în prezența IL-4 crește numărul și viabilitatea ambelor tipuri de limfocite T (+/+) și (-/-). Totuși, celulele CD28(-/-) care au supraviețuit sunt mai dependente de IL-4 decât celulele CD28(+/+) care au supraviețuit, așa încât cultura inițială cu IL-4 permite izolarea clonelor CD28(-/-) ce produc IL-4 care acționează ca un factor de creștere autonom și de supraviețuire (13).

Limfocitele T naturale murine NK-1 sunt o populație de celule care exprimă NK-R și un aranjament TCR invariant. După activare, acestea produc cantități mari de IL-4 sugerându-se că promovează diferențierea Th2. Celulele naturale T produc, de asemenea, cantități crescute de IFN-gamma și IL-4. Limfocitele T naturale V-alpha 24 sunt o sursă potentă de IL-4 și pot juca un rol de primer Th2 în răspunsul imun la om (14).

O proprietate comună a alergenilor este potențialul lor de a genera răspunsul citokinilor Th2. Dermatophagoides pteromyssimus (Der.p1), promovează răspunsul tip Th2 prin modularea balanței dintre IL-4 și IFN-gamma (15). Alergenii din hrană induc răspunsuri proliferative și producția de citokine de către PBMC la copiii cu dermatite atopice produse de alergenele din alune. După stimularea cu extract de alune, CD4+ proliferază corelat cu o semnificativă creștere a expresiei mRNA IL-4. Deci, principala populație de limfocite T ce răspund proliferativ, este diferită după tratarea cu extractul de alune și stimularea policlonală a PBMC de la subiecții cu dermatite atopice la care, preferențial proliferază CD28+, ceea ce se corelează imunologic cu rata producției de IL-4/IFN-gamma (16).

Eozinofilele, mastocitele și limfocitele T contribuie în diferite grade la exprimarea IL-4 și IL-5 în fazele târzii ale alergiei cutanate la subiecții atopici. Se susține că, totuși, celulele T CD3+ nu au abilitatea de a depozita și concentra cantități suficiente de aceste citokine, pentru a induce o imunocombateră eficientă. (17).

IL-4 este o citokină imunoreglatoare care induce proliferarea și diferențierea fenotipului Th2 și intervine important în inducerea sintezei de IgE. Eozinofilele înalt purificate de la subiecți alergici exprimă mRNA IL-4, citokină depozitată în granulațiile specifice, putând fi astfel, o importantă sursă de IL-4 la locul inflamației alergice. Eozinofilele pot acționa ca celule imunomodulatoare, amplificând reacția la alergie prin apariția limfocitelor Th2 și prin inducerea schimbării în limfocitele B umane a izotipului IgE (18).

Inflamația din astm și alte afecțiuni alergice se caracterizează prin producția excesivă de IgE și prin influx de leucocite, îndeosebi eozinofile. IL4 și IL-5 sunt esențiale pentru producția de IgE de către mastocite, în condiții alergice în care glucocorticoizii sunt larg utilizați în terapie. Mastocitele care sunt foarte sensibile la glucocorticoizi exprimă mRNA IL-4 și IL-5 (19).

Anticorprii monoclonali anti-IL-4 inhibă producția de IgE, dar nu afectează eozinofilia căilor aeriene sau hiperreactivitatea acestora. Pe de altă parte, anticorprii monoclonali anti-IL-5 inhibă eozinofilia căilor aeriene, dar nu afectează producția de IgE. Combinarea acestor două tipuri de anticorpi inhibă producția de IgE, eozinofilia și hiperreactivitatea căilor aeriene. Toate aceste teste s-au făcut la șoareci după 3 inhalări de antigeni, constatându-se creșterea numărului de eozinofile în fluidul bronhoalveolar, ca și a nivelului seric al antigenilor specifici IgE (20).

Familia factorilor de transcriere NFAT (Factor Nuclear al T Activate) reglează în timpul răspunsului imun, expresia multor gene care codifică citokine imunoreglatoare. Proteina NFAT se exprimă și funcționează în limfocitele T și B, în mastocite și NK. Șoarecii deficienți în NFAT cu inflamații alergice exprimă o eozinofilie marcată. În vitro, limfocitele T din ganglionii limfatici ai acestor animale, restimulate cu antigeni, exprimă cantități crescute de mRNA pentru citokinele IL-4, IL-5 și IL-13 (citokine Th2).

Apariția eozinofiliei depinde de hiperexpresia IL-4 și IL-5, dat fiind că aceasta este inhibată de anticorprii la aceste citokine. Prezența NFAT-1 ar putea inhiba reacția alergică, probabil prin interferarea celulelor Th2 (21). Activarea eozinofilelor în inflamația alergică este mediată, în parte, de chemoatracțanți și de citokinele Th2. Inducerea fosforilării PK-B din eozinofilele umane este determinată de IL-4 și IL-5 și de chemoatracțanții PAF (Plaketar Activator Factor), C5a și RANTES, relevând un larg profil de activare.

În eozinofilele umane, citokinele tip Th2 activează diferite căi de transducție a semnalului Pi3K (posfatidil inozitol 3-Kinaza) și a MAP (Mitogen Activator Proteinkinaza), cu consecințe funcționale distincte, ceea ce subliniază reglarea complexă a funcției efectoare a eozinofilelor (22).

IL-4 și ICAM-1 sunt implicate în patogeniza bolii alergice. La pacienții cu rinite alergice, nivelul ICAM-1 solubil și al IL-4 din ser și din fluidul care acoperă epiteliul nazal, variază cu sezonul. Este posibil ca în patogeniza acestor afecțiuni, IL-4 să acționeze ca un eventual supresor al ICAM-1 solubil. Această moleculă de adeziune este înalt reglată în etapa timpurie a sezonului, iar în etapa mijlocie este slab reglată dar însoțită de creșterea nivelului IL-4. În etapele mijlocie și târzie, s-a stabilit o corelație negativă între nivelele serice de ICAM-1 și IL-4 (23).

La șoarecii cu granuloame de Schistosoma, deficitari sau nu în IL-4, ca și la cei de control, s-a explorat originea și reglarea IFN-gamma. Granuloamele la șoarecii C57Bl/6

normali sau deficitari în IL-4, secretă puțin IFN-gamma și nu se constată polarizarea Th1, de unde concluzia că, granuloamele conțin puține celule apte să sintetizeze IFN-gamma sau că, asemenea celule se află sub un strict control. În schimb, ele pot elabora IL-10 și TGF-beta, care la rândul lor, pot regla sinteza de IFN-gamma. Analiza IFN-gamma intracitoplasmatic confirmă faptul că unele limfocite T Thy 1.2+ (CD8+ și CD4+) elaborează această citokină.

Granuloamele conțin celule NK 1.1+, dar produc foarte puțin sau deloc IFN-gamma. Thy 1.2+ purificate din granuloame, secretă IFN-gamma in vitro, în timp ce NK 1.1+ izolate secretă puțin chiar atunci când sunt stimulate. De aici concluzia că, la șoarecii deficienți în IL-4, IFN-gamma din granuloame provine din limfocitele T și nu din NK și că, de asemenea, IFN-gamma este reglat de către IL-10 și TGF-beta (24).

Citokinele Th2 IL-4 și IL-13 induc în mononuclearele umane, expresia unui subset distinct de gene și în funcție de doză și timp, induc nivele scăzute de mRNA IL-1RI și IL-1RII. IFN-gamma inhibă la nivel transcripțional creșterea acestor mRNA, ca și IL-10 care inhibă expresia acestor gene în mononuclearele stimulate cu IL-4/IL-13. Inhibarea IL-1R indusă de IFN-gamma și IL-10 nu afectează gena IL-4R, și în consecință, nu este afectată nici cuplarea IL-4 la celulă. Totuși, supresia genei IL-1R este asociată cu scăderea tirozinfosforilării și cu translocarea nucleară a factorului de transcriere Stat-6 indusă de IL-4/IL-13. Există astfel, un potențial mecanism prin care IFN-gamma și IL-10 pot media efecte supresoare, antagonizând abilitatea acestor citokine de a induce în monocite, expresia crescută a genelor IL-1RI și IL-1RII (25).

Legarea CD44 la hialuronan este cheia proinflamatorie care reglează adeziunea limfocitelor și monocitelor, ca și producția de citokine. S-a stabilit că IL-1-alpha, IL-1-beta, IL-3, GM-CSF și TNF-alpha, ca și LPS bacteriene determină direct cuplarea mononuclearelor din sângele periferic, la hialuronan. TNF-alpha, ca factor derivat din limfocite, activează mononuclearele pentru a se cupla cu hialuronanul. Dimpotrivă, IL-4 și IL-13 uman sunt potenți inhibitori ai acestei cuplări indusă de citokinele menționate din serul uman. IL-10 singur induce cuplarea hialuronanului la CD44 monocitic și o inhibă pe cea indusă de IL-1(26).

Mastocitele sunt implicate în patogeneza fibrozelor, deoarece numărul lor crește în reacțiile inflamatorii cronice. Mastocitele umane stimulează proliferarea fibroblastelor după contactul cell-to-cell. Cocultivarea timp de 18 ore a mastocitelor umane linia HMC-1, dublează proliferarea fibroblastelor normale din piele, proces susținut și de IL-4. Acest efect însă, poate fi abrogat prin cocultivarea mastocitelor cu fibroblaste și un anticorp anti-IL-4 (27). IL-4 induce homotipic agregarea mastocitelor umane, prin activarea moleculelor de adeziune LFA-1/ICAM-1 și, de asemenea, a celor din sângele cordonului ombilical în prezența SCF (Factorul Celulei Stem) și a IL-6.

IL-4 crește expresia LFA-1 (Lymphocyte Function Association Antigen-1) și ICAM-1, dar nu a VLA (Very Late Antigen) sau VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecules). Anticorpi monoclonali neutralizează specific LFA-1, iar ICAM-1 inhibă agregarea mastocitelor homotipice indusă de IL-4, de unde concluzia că agregarea este principalmente mediată de interacțiunea LFA-1/ICAM-1 contribuind astfel la migrarea acestor celule în țesuturile inflamate și la interacțiunea cu celelalte celule inflamatorii, prin reglarea moleculelor de adeziune (28).

IL-4 mRNA derivat din mastocite este indus în măduva osoasă prin MHC clasa II, dependent de semnalizarea unei căi patologice. Mastocitele mediate de MHC cl. I dependent de T, duc la transcrierea IL-4 și la eliberarea proteinei.

Dozele de ovalbumină 323-339 determină producția de IL-2 de către un hibridom T specific și cresc transcrierea IL-4 în mastocite. Producția independentă de IgE a IL-4 de către mastocite este rezultatul unei interacțiuni cu limfocitele T CD4, interacțiune critică pentru apariția răspunsului Th2 (29).

IL-4 are un rol important și în funcția diverselor celule imunocompetente și în fiziopatologia diferitelor afecțiuni ale sistemului nervos central. Astfel, astrocitele exprimă mRNA IL-4R, dar nu secretă IL-4, care, se știe, inhibă producția de NO și expresia INOS indusă de stimularea cu LPS. În schimb, secretă puțin TNF-alpha și exprimă slab ICAM-1. Citokina induce secreția de NGF de către astrocite și sinergizează cu LPS și TNF-alpha. Astfel, se sugerează că IL-4 are un rol important în sistemul nervos central, fiind atât un factor neurotrofic cât și unul imunosupresiv (30).

Intervenția IL-4 în producția de IL-3 se confirmă în urma adausului de anticorpi anti-IL-4, la limfocitele T stimulate CD3/CD28. Anticorpii neutralizanți anti-IL-4 induc o drastică reducere a sintezei de IL-3 în celulele T activate, în timp ce secreția de GM-CSF este independentă de neutralizarea IL-4 endogenă.

Producția de IL-3 de către celulele Th este semnificativ inhibată de IFN-alpha, dar este stimulată de CD3/CD28. Adausul de IL-4 exogen duce la creșterea semnificativă (cu 23%) a nivelului IL-3 în supernatant, în timp ce alte citokine precum IFN-gamma și IL-10, nu influențează elaborarea de IL-3. Sinteza de citokine influențată de IL-4 este specifică tipului celular, relevând un efect stimulator diferențiat, asupra producției de IL-3 (31).

IL-4 și limfocitele B

IL-4 participă și la producția de IgE având rol de pivot în dezvoltarea limfocitelor B care secretă IgE, atât la șoareci cât și la om. Activează clasele de IgG1 și IgE în celulele B murine, la rândul lor activate de LPS. Este implicată și în inducerea răspunsului IgE in vivo. Cum s-a menționat, celulele Th2 secretă IL-4 și IL-5 (32). Pentru a induce proliferarea limfocitelor murine B inactive și formarea de izotipuri din IgM și IgD în IgG1 și IgE sunt suficienți ligandul CD40 și IL-4. Celulele B exprimă IgG1 după 3 diviziuni, și IgE, după cinci. Probabilitatea schimbării izotipurilor la fiecare diviziune este independentă de timpul poststimulare și de doza de ligand. Concentrația de IL-4 reglează numărul diviziunilor care preced izotipul schimbat. Pierderea IgM și IgD de la suprafața celulelor este, de asemenea, legată de diviziunea celulară și pare a fi reglată diferit. Proliferarea limfocitelor B este tipic asincronă față de proporția celulelor în diviziuni consecutive, fiind marcată de concentrația ligandului și a IL-4.

Asincronia ciclului de diviziune rezultată din variația dependentă de doză și timp, duce la intrarea în primul ciclu de diviziune. Expansiunea limfocitelor B, dependentă de T este legată de schimbarea funcției cea ce poate explica, în parte, de ce IgE este produsă ca răspuns la stimularea prelungită (33).

IL-4 și CD40 stimulează transcrierea lui CD23 murin Fc epsilon RII(CD23) în limfocitele B, care sunt necesare pentru expresia genei germinale epsilon și pentru producția de IgE. CD23 este implicat în reglarea IgE, iar IL-4 și CD40 reglează CD23 și genele epsilon. Se știe că CD23 are rol reglator prin feed-back negativ asupra răspunsului IgE.

Stimularea expresiei CD23 de către IL-4 inițiază procese fiziologice ce reglează producția de IgE și, de asemenea, prin participarea unor proteine nucleare activate de IL-4 numite NF-IL-4, IL-4 STAT sau STAT-6. Câteva elemente discrete ale genei CD23 din care unele au omologii cu locurile de cuplare ale factorilor de transcriere NF-IL-4 și NF-kB, sunt necesare pentru inducerea IL-4 (34).

CD40 are rol de mediator critic în colaborarea limfocitelor T/B. Elaborarea IgE este clar dependentă de semnalele costimulatorii ale interacțiunii CD40/CD40 ligand sau ale mitogenilor celulelor B. Activitatea independentă a IL-4 la șoarecii injectați cu CD40, este susținută de faptul că anticorpii anti-CD40 au permis inducerea IgE circulante, în condițiile în care șoarecii sunt injectați și cu IL-4 (35).

CD23 este un antigen ce activează limfocitele B, implicându-se în proliferarea acestora și în producția de IgE. CD23 (a) este o izoformă care se exprimă constitutiv în limfocitele B, iar CD23 (b) este indus specific de IL-4 sau de un stimul selectiv mitogenic. CD23 este produsul unei gene rapid activată de IL-4 în celulele B umane inactivate.

Factorul nuclear NF-IL-4/CD23 care cuplează elementul responsiv IL4RE al promotorului CD23 (b) aparținând celulelor B din tonsilele umane purificate, apare la 5 minute după tratamentul cu IL-4 (36).

Șoarecii supuși la alergeni chimici exprimă mRNA IL-4. Așa cum s-a observat, diferitele clase de alergeni chimici provoacă la șoareci răspuns imun distinct exprimat prin apariția secreției selective de citokine limfocitare în nodulii limfatici. Expunerea cronică la alergeni chimici a căilor respiratorii ale șoarecilor, conduce la producția înaltă de IL-4 de către celulele nodulilor limfatici, citokină necesară pentru dezvoltarea răspunsului prin anticorpi IgE.

Expunerea șoarecilor la alergeni de contact induce nivele joase de IL-4. Șoarecii expuși la concentrații de anhidridă trimelitică (TMA) care este un alergen al căilor respiratorii, sau la DNCB (2,4-dinitrochlorbenzen), alergen de contact, conduce la o suficientă producție de IL-4, producție reglată cel puțin la nivel transcripțional (37).

Acțiunea conalbuminei asupra tractului respirator de la șoarece declanșează răspunsul alergic via limfocitele Th2 și expresia IgE seric-specifică infiltrată în mucoasa căilor aeriene. Limfocitele Th2 stimulate de conalbumină și transferate, arată nivele înalte ale IL-4 și IL-5 în fluidul bronhiolar și concomitent, o eozinofilie mucoasă crescută (38).

Tratarea in vitro timp de 7 zile a PBMC pacienților alergici la polen cu extract de polen, urmată de restimularea acestora 24 de ore cu PHA și PMA pentru amplificarea producției de citokine, determină o secreție crescută de IL-4 și IL-5. S-a conchus că, creșterea temporară în IgE serică, poate fi o consecință a producției crescute de IL-4 datorată expunerii la alergeni (39). Rinitele induse de alergeni sunt asociate cu creșterea locală a mRNA IL-4, cu lanțul greu al IgE (Cepsilon) și a promotorului acestuia RNA(Ipsilon). Promotarea cu glicocorticoizi topicali inhibă creșterea în aceste transcripțe.

În timpul sezonului cu polen, biopsiile de pe cornetul inferior al alergicilor, arată o semnificativă expresie a RNA+ Cepsilon și Ipsilon, în celule. În ambele grupe de subiecți tratați și netratați cu steroizi topicali, numărul celulelor CD20+ este neschimbat. Clasa de IgE apare local în mucoasa nazală a celor cu rinite alergice sezoniere, răspuns care poate fi schimbat prin strategia contra producerii de IgE locală (40).

IL-4 și IL-5 produse de Th2 și Th0 dar nu de Th1, sunt citokine cu rol important în producția de IgE și eozinofile. Reacțiile citokinelor au fost constatate în același timp, în boli parazitare și alergice. În diferite alte stări patologice se constată că cele două citokine nu apar sincron (41).

Interleukina-4 are un rol important în infecțiile helmintice, determinând nivele serice ridicate de IgE și IgG4. Nivelele ridicate de IgE, generate de IL-4 în limfocitele B imature, mediază reacția de hipersensibilitate imediată prin cuplarea limfokinei la suprafața bazofilelor și mastocitelor. La șoareci, IL-4 exogen induce creșterea similară a IgE și IgG1 (comparabil cu IgG4 uman), atât in vivo cât și in vitro (42). Reacția alergică indusă de viermii paraziți, se caracterizează prin inducția de celule Th2, care secretă citokinele IL-4, IL-5 și IL-13 ce determină, la rândul lor, inducția de IgE și eozinofile.

Limfocitele T au un rol în expulzarea nematodelor gastrointestinale. Astfel, șoarecii IL-4(-/-) au capacitatea de a expulza nematodul *Nippostrongylus brasiliensis*, deși s-a crezut că IL-4 ar avea acest rol. Dacă IL-4 nu are un rol în medierea eliminării nematodului, s-a propus existența altui mecanism. S-a constatat că la șoarecii IL-13 (-/-) parazițați și tratați cu IL-13 exogenă, numărul viermilor era redus. La aceste animale se declanșează o hiperplazie a celulelor goblet, care în mod normal coincide cu eliminarea viermilor. Deci, IL-13 mediat de celulele Th2 este legat de producția de mucus intestinal care astfel are capacitatea de a elimina viermii, având astfel un rol unic în eliminarea paraziților (43).

Semnalizarea STAT-6 nu este reclamată pentru amplificarea producției IgG1 de către IL-4, și inhibă mastocitoza mucoasei indusă de IL-4. IL-13, IL-4R-alpha și STAT-6 care sunt reclamate pentru expulzarea nematodului *Nippostrongylus brasiliensis*, parazit gastrointestinal la șoareci. Paradoxul aparent al expulzării parazitului la șoarecii cu deficit de IL-4 se explică prin faptul că acționează IL-4R-alpha și STAT-6. Un antagonist specific pentru IL-13, alt activator al STAT-6 via IL-4R-alpha, previne expulzarea viermului. De aici ideea că, expulzarea viermului reclamă semnalizare via IL-4R-alpha și STAT-6, semnalizarea indusă de IL-13 fiind mai importantă decât cea indusă de IL-4 (44).

IL-4 produs in vivo de filarii (infecția cu larve și adulți) este esențială pentru inducția supresiei proliferării, dar nu reprezintă factorul supresiv direct al parazitului. Stadiul microfilarial al parazitului induce producția de IFN-gamma și nu generează o formă de supresie similară cu cea indusă de IL-4 (45,46).

Receptorul IL-4 (IL-4R)

Acțiunea IL-4 pe celulele țintă este mediată de IL-4R care, cel puțin în celulele limfoide, este format dintr-un lanț alpha și unul beta. Lanțul gamma răspunde de înalta afinitate a receptorului pentru IL-2 și IL-7. Linia de celule leucemice monocitare THP-1 și mono-mac-6 nu exprimă RNA lanț gamma, dar IL-2R lanț gamma este prezent în

mononuclearele primare umane. În timp ce mRNA IL-2R-alpha este înalt reglat (de 3 ori), acest efect pozitiv nu este prezent și la nivelul proteinei de la suprafața celulei. În contrast cu expresia lanțului gamma constitutiv, expresia lanțului IL-4R-gamma nu s-a detectat cu anticorp specific. Totuși, RT-PCR arată prezența mRNA IL-4 lanț gamma în linia celulară mono-mac-6 sugerându-se astfel că reactivitatea scăzută a celulelor la IL-4 se corelează cu expresia scăzută a lanțului gamma (47).

Componenta IL-4R de pe mononucleare, include lanțul alpha de 140kD și lanțul IL-2R-gamma c, care, în mod normal diminuează pentru semnalizarea delta R. Nivelele mRNA pentru lanțul gamma ca și abilitatea IL-4 de a regla producția TNF-alpha indusă de TNF sunt foarte scăzute în mononuclearele cultivate timp de 7 zile.

IL-4 reglează slab producția de IL-1-beta în aceste mononucleare care nu exprimă proteina gamma c de 64kD activă funcțional, ceea ce se corelează cu activitatea scăzută a STAT-6 indusă de către IL-4. Anticorpii anti-gamma c și mutantele IL-4 nu pot cupla lanțul gamma c, ceea ce arată că IL-4 poate supresa producția de IL-1 beta, dar nu de TNF-alpha în mononuclearele stimulate cu LPS în prezența lanțului gamma c slab sau deloc funcțional.

În celulele U937 care exprimă lanțul gamma c și activate cu LPS/PMA, producția de TNF-alpha și IL-1-beta este scăzută. Se concluzionează că diferitele răspunsuri funcționale ale IL-4 în mononuclearele și macrofagele umane sunt reglate de diferite configurații ale IL-4R (4).

IL-4R-alpha conține o secvență (488 PLVIAGNPAYRSFSD) numită motif I4R (Insulin IL-4R). Mutația Tyr 497 centrală în Phe, blochează tirozinfosforilarea IRS-1 și ca răspuns la IL-4 diminuează proliferarea. Motiful I4R prezintă locuri de cuplare pentru câteva proteine ce conțin domeniul cuplării proteintirozinei (PT-B), cum sunt IRS-1 și Shc și potențial, domeniul 2 Src omolog cu STAT-6.

Schimbarea reziduurilor conservate amonte și aval de Tyr central cu Ala din hIL-4R-alpha în scopul analizei funcției I4R în reglarea semnalizării IL-4, are abilitatea de a semnaliza tirozinfosforilarea IRS-2 și STAT-6, inducând activitatea de cuplare la DNA și activitatea CD23, ca răspuns la IL-4. Mutații în reziduuul aval de Tyr 497 precum sunt Arg 498 sau Phe 500, cu Ala, nu au efect pe nici unul din aceste răspunsuri sugerând că motiful I4R nu ar fi important pentru interacțiunea domeniului 2 omolog cu Src funcțional. Totuși, mutageneza lui Pro 488 cu Ala (488 A), scade oarecum tirozinfosforilarea lui IRS-2 și o suprimă pe a lui STAT-6, scade activitatea de cuplare la DNA și inducția CD23 ca răspuns la IL-4. Deci, motiful I4R are un rol important în reglarea IRS și prin acesta reglează activitatea STAT-6 (49).

IL-4 și IFN-alpha activează independent STAT-1 și STAT-6, ambele cuplând la IRF-1 (fragment promotorial al genei de 1,3pb). Afinitatea STAT-1 pentru IRF-1 este mai înaltă decât a lui STAT-6. Când nivelele de STAT-1 sunt scăzute, STAT-6 poate competiționa cu aceasta, pentru ocuparea SEB (Elemente de cuplare STAT pe promotorul genei IRF-1), astfel că în acest mod poate supresa transcrierea genei IRF-1 stimulată de IFN-gamma. Supresia poate fi atenuată, dar aceasta pe măsură ce cantitatea de STAT-1 față de STAT-6 crește în celulele tratate cu cantități mari de IFN-gamma care înlocuiesc STAT-6 (50).

Lanțul gamma din complexul receptorului de înaltă afinitate pentru IL-2, intră și în complexul receptorului pentru IL-4 și este prezent în celulele trofoblastului, ca și în

celulele liniei de coriocarcinom. Nici unul din receptorii acestei linii celulare nu dețin lanțurile alpha și beta IL-2R, dar dețin lanțurile alpha ale IL-4R și IL-7R. Lanțurile gamma și mRNA IL-4R și IL-7R sunt detectabile în trofoblastele placentare umane care hibridizează in situ. Se consideră că IL-4 și IL-7 sunt implicate în funcțiile trofoblastelor (51). Lanțul gamma c este un component critic al receptorilor pentru IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 și IL-15. Macrofagele de șoareci deficitare în acest lanț, nu arată diferențe în numărul absolut, comparativ cu animalele care au macrofage cu gamma c +. Se apreciază că semnalizarea prin lanțul gamma c nu este esențială pentru diferențierea macrofegelor de șoarece. La aceștia, răspunsurile IL-4 și IL-13 ar putea fi complet inhibitate cu antagoniști IL-4. Se sugerează că toate răspunsurile observate la IL-13 trec prin receptorul tip II, pe care îl fac receptor primar complex de semnalizare pentru IL-13 în macrofagele de șoarece (52).

Subunitatea IL-2R-gamma este un component comun al receptorilor pentru IL-4, IL-7, IL-9 și IL-15. Linia de mastocite MC/9 exprimă constitutiv lanțul gamma c și proliferază sub acțiunea IL-4 și IL-13, dar numai răspunsul la IL-4 este blocat de anticorpi monoclonali anti-gamma c.

După transfectarea celulelor plasmocitomului B9 gamma c negativ cu lungime deplină (m-gamma) sau a cDNA gamma c fără coadă citoplasmatică (m-gamma t), ce reacționează la IL-4 și IL-13, răspunsul proliferativ la IL-4 a fost afectat numai de expresia de suprafață a moleculelor gamma c.

Inabilitatea expresiei m-gamma sau m-gamma t de a afecta proliferarea indusă de IL-13 în celulele plasmocitomului B9, arată că lanțul gamma c nu contribuie la formarea IL-13R și nu funcționează ca o subunitate disputată a IL-4R și IL-13R. Se sugerează astfel că, există doi receptori IL-4 distincți, din care unul este independent de lanțul gamma c (53).

IL-4 și IL-13 activează pe cale comună tirozinkinazele Jak-2 și STAT-6 în celulele epitelului vascular în cultură, dar nu implică lanțul gamma c. Aceste două citokine acționează fiecare pe celulele epiteliale umane pentru a induce expresia moleculelor de adeziune celulară pe celulele hematopoietice. Răspunsul IL-4 poate fi mediat fie pe calea de semnalizare ce implică subunitatea gamma c- comună receptorilor IL-2; IL-4, IL-7, IL-9 și IL-15, fie pe calea independentă de lanțul gamma c, ce poate fi alternativ activată de IL-13. Ca și IL-4, IL-13 activează o proteintirozinkinază care fosforilează proteina ce cuplează IL-4R. Fiecare din cele două citokine, induce fosforilarea tirozinkinazei Jak-2 și poate cupla factorul de transcriere STAT-6 la o secvență nucleotid consens. Se concluzionează că în celulele epiteliale, IL-4 implică calea IL-13, care este independentă de gamma c și folosește semnalizarea Jak-2-STAT-6 (54).

Cum supraviețuiesc limfocitele T CD4+ de rezervă, a căror viață in vivo are un „half-life” de o săptămână, iar in vitro de 24 de ore? Supraviețuirea lor in vitro este promovată de citokinele IL-4 și IL-7, care pot asigura viața limfocitelor T CD4+ prin menținerea nivelurilor proteinelor ce promovează supraviețuirea, cum sunt Bcl-2 și Bcl-XI, și care scad rapid în urma izolării limfocitelor T de rezervă din organism, menținute în cultură de către IL-4.

IL-4R semnalizează prin Jak-1 și Jak-3/STAT-6, dar surprinzător, în cazul salvării de apoptoză a limfocitelor T via IL-4, aceasta se face într-o manieră independentă de STAT-6. Ar fi aceasta o cale nouă pentru facilitarea variabilității limfocitelor T (55).

Studiile cu șoarecii deficienți în STAT-6, au arătat că această proteină este necesară pentru proliferarea normală a limfocitelor ca răspuns la IL-4. Limfocitele deficiente în STAT-6, care trec după stimularea cu IL-4 din faza G1 în faza S, sunt mai puțin numeroase decât la animalele de control.

În limfocitele deficiente în STAT-6, p27kip-1 se exprimă la nivele semnificativ mai înalte după stimularea cu IL-4, ceea ce conduce la scăderea activării kinazei asociată cu cdk-2. Nivele înalte de p27kip-1 se constată și după stimularea cu IL-12 a limfocitelor deficiente în IL-4. Se concluzionează astfel că, proteinele STAT pot controla răspunsul proliferativ al limfocitelor T indus de citokine, prin inhibarea expresiei inhibitorilor ciclului celular, astfel încât complexe ciclina-ckd promovează trecerea din faza G1 în faza S a ciclului celular (56).

IL-4 și HIV

Replicarea preferențială a HIV în celulele Th1 sau Th2, alterează delicata balanță a reacției imunitare. La 3-14 zile postinfecție, HIV se replică la nivele similare în câteva clone de limfocite Th, proces măsurat prin eliberarea p24 HIV și prin numărul total de copii de gag RNA/RNA celular total. Când valorile s-au normalizat pentru celulele viabile din câte 3 clone din fiecare tip, în limfocitele Th1 se constată de două ori mai mult RNA-HIV decât în celulele Th2. De asemenea, câteva tulpini HIV-1 monocitotrope primare se replică la nivele similare celor din celulele Th1 și Th2. Este astfel subliniată importanța acestor două subseturi de celule Th în patogenza HIV-SIDA, cu diferențierea clonelor după abilitatea de a suporta replicarea HIV.

Clonele de limfocite T IFN-gamma+, IL-4 și IL-5 negative și de celule Th2 IFN-gamma negative, IL-4 și IL-5+ de la câțiva donori sănătoși, exprimă nivele similare de CD4 și câțiva cofactori ai receptorilor chemokinelor necesari penetrării virusului în celule. După activare, cele două clone relevă nivele similare de reverstranscriere și de intrare a virusului în celule (57).

Analiza citofotometrică a IL-4 din sângele pacienților cu SIDA care sunt practic lipsiți de celule CD4+, demonstrează că această citokină este secretată de celulele CD3-, CD4-, CD8-, CD56-, CD19- și CD14-, celule care au și rol de helper pentru sinteza Ig. De asemenea, ele pot fi o sursă importantă de IL-4 în cadrul unei varietăți de reacții imunologice (58).

Celulele dendritice pot proveni din mononuclearele CD14 ale sângelui periferic cultivate cu GM-CSF și IL-4. Infectate cu HIV-1 M-tropic, mononuclearele și celulele dendritice mature arată o blocare a revers-transcrierii, formându-se numai transcripte timpurii care pot fi amplificate cu primerii pentru regiunea R/U5. La 6 și 11 zile de cultură cu GM-CSF și IL-4, celulele dendritice mature fac reverstranscriptaza completă și, când sunt folosiți primerii LTR/gag, arată un puternic semnal.

Mononuclearele din sânge și celulele dendritice mature nu-s permissive pentru replicarea HIV-1, în timp ce celulele dendritice imature pot fi infectate productiv, dar numai cu HIV-1 tropic. Virusul replicat în celulele dendritice imature poate infecta limfocitele T activate. Pentru a se produce replicarea virală în cocultură de celule T și CD

este necesară exprimarea receptorilor pentru citokine funcționale. Se apreciază că, stadiile evoluției celulelor dendritice pot influența interacțiunea acestora cu HIV-1 căruia îi permite replicarea (59).

La femeile infectate cu HIV-1, biopsiile intracavitare din colul uterin arată că limfocitele T din tractusul genital conțin virusul, iar profilul mRNA de citokine tip Th2 care sunt imunoinhibitori pentru mucoasa colului este dominant. Aceasta subliniază potențialul citotoxic afectat limfocitelor T CD8+ care contribuie la susceptibilitatea femeilor HIV-1+ de a face infecții recurente și neoplazii ale tractusului genital (60).

Celulele sarcomului Kaposi frecvent la cei cu SIDA, exprimă nivele înalte de IL-4R în comparație cu celulele normale ale pielii, astfel că acest receptor reprezintă o țintă atractivă pentru terapia anticanceră. Se apreciază că o creștere cantitativă a receptorului se corelează și cu activarea ICAM-1 dependente de IL-4 (61).

În timpul infecției cu HIV-1, IL-4 și IL-13 restaurează in vitro producția de IL-12 de către mononuclearele pacienților infectați. Producția de citokine proinflamatorii (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-beta și PGE2) poate fi reglată de câțiva factori de deactivare a macrofagelor, ca și de reducerea producției acestor citokine. La cei infectați este afectată și producția medulară de PMBC, pretratarea acestora cu IL-4 și IL-13 permițând amplificarea producției de IL-12. Restaurarea producției de IL-12 de către citokinele tip Th2 este oarecum surprinzătoare, dat fiind rolul antagonist mutual al IL-12 și IL-4 în activarea reacției celulelor Th1 sau Th2 ca răspuns imun (62). După imunizările inițiale, răspunsul la antigenii HIV-1 este dominat de IFN-gamma, IL-4 apărând numai după numeroase runde de imunizare fiind corelat temporar cu producția de anticorpi concomitent cu producția de IL-4. De asemenea, cantitatea de IFN-alpha din supernatant declină, iar IL-10 este nedetectabil (63).

S-a analizat în macrofage, efectul citokinelor IL-4 și IL-13 asupra replicării HIV, în contextul maturării monocitelor infectate. În acest scop s-a folosit tulpina HIV-1 BaL și tulpini clinice pentru stabilirea într-un interval de 7 zile, a mecanismelor moleculare ale acestui efect, pe măsura materializării lor în macrofage. Cele două citokine reglează expresia mRNA HIV și a genomului celular, IL-4 amplificând transcrierea de 2-3 ori și stimulând translocarea factorului de cuplare nuclear kB, înaintea amplificării expresiei RNA -HIV, dar fără efecte semnificative asupra reverstranscrierii. IL-4 amplifică CD11b, inhibă expresia CD26 și întârzie pierderea lui CD13, iar IL-13 are efecte similare pe CD11b și CD13, dar nu pe CD26.

IL-4 și IL-13 inhibă semnificativ replicarea HIV la nivelul transcrierii în macrofagele provenite din mononucleare, în condițiile adăusului pre-sau post infecție. Asupra diferențierii mononuclearelor, cele două citokine au efecte ușor divergente, influențate probabil, de translocarea factorilor nucleari kB, ceea ce este important pentru replicarea HIV (64).

Vpr HIV-1 influențează replicarea virală și transcrierea în celula gazdă, modulând astfel apoptoza limfocitelor T. În absența activării mediate TCR, Vpr induce apoptoză, iar în prezența ei, întrerupe inducția acesteia. Reglarea apoptozei este legată de supresia indusă de Vpr a activității NF-kB via inducției Kappa B, care este un inhibitor al NF-kB. Vpr supresează citokinele IL-2, IL-10, IL-12, TNF-alpha și IL-4, toate dependente de NF-kB. Se poate astfel aprecia că, unele aspecte ale patogeniei virale sunt consecința alterării de către Vpr a funcțiilor celulare (65).

IL-4 și cancerul

Considerând proprietățile citokinei IL-4 în ansamblul relațiilor imunitare complexe, cu abilitatea de a promova dezvoltarea limfocitelor T citotoxice (CTL) care stopează sau reiectează celulele tumorale, s-au inițiat experimente în vederea preparării unor vaccinuri utilizabile în terapia cancerului. Se știe că citokinele au un rol important în sistemul imunitar, pentru distrugerea celulelor tumorale. Astfel, interleukina-4 umană recombinată (rhIL-4) in vitro are efecte antiproliferative directe asupra celulelor canceroase pulmonare umane CCI 185, acțiune ce poate fi stopată cu anticorpi neutralizanti anti-rhIL-4. Multe din funcțiile directe ale IL-4 sunt tumorocidale direct dar mai ales indirect.

IL-4 activează limfocitele B inactive și amplifică producția de IgE a acestora. În plus, crește expresia IgE R (CD23) de slabă afinitate. Este și factor de creștere pentru limfocitele T și activator al celulelor citotoxice. IL-4R se exprimă și pe alte tipuri celulare cum sunt celulele endoteliale și cele din tumorile de colon și plămân, receptori ce coexistă cu EGF-R în adenocarcinomul și carcinomul pulmonar cu celule scvamoză. rhIL-4 are efecte antiproliferative directe pe unele linii celulare de carcinom pulmonar atât in vitro cât și in vivo, efecte corelate cu expresia IL-4R (66).

Cancerul pulmonar este liderul deceselor în SUA cu 157 cazuri anual din care 80% sunt carcinoame ale celulelor mari (non small cell lung carcinoma-NSCLC), iar rata supraviețuirii este de numai 5%. În momentul precizării diagnosticului, 70% din pacienți au metastaze inclusiv cei cu tumori rezecabile care, cu mare probabilitate, pot evolua incurabil.

Imunoterapia se sprijină pe ipoteza că celulele tumorale poartă antigeni asociați tumorii care răspund imunologic specific, ceea ce ar permite elaborarea unor vaccinuri, anticanceroase. În modelele murine, aceste vaccinuri se obțin din antigenii asociați tumorii cu expunerea la citokine. Astfel, s-a optat pentru IL-4 care exercită efecte pleiomorfe pe celulele sistemului imunitar și endoteliul nescens și poate mări în limfocitele B antigenii de suprafață ai CMH cl. II. De asemenea, poate stimula creșterea limfocitelor Th și a celor citotoxice, infiltra tumorile cu limfocite și induce activarea NK prin LAK.

IL-4 stimulează citotoxicitatea specifică a macrofagelor având efect inhibitor direct asupra celulelor NSCLC izolate. Un vaccin antitumoral obținut din IL-4 determină regresia unui cancer metastazant. Introducerea genei IL-4 în celule derivate din țesut tumoral uman oferă un mijloc de generare a unei căi de dezagregare a tumorilor prin adaus de celule stromale în care s-au transdus vectori cu gena IL-4.

Celulele secretoare de IL-4 stimulează de 7,5 ori proliferarea limfocitelor autologe din sângele periferic, comparativ cu controlul (67). S-a urmărit efectul IL-4 asupra expansiunii fenotipului antitumoral TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes) provenit din carcinomul renal uman RCC (Renal Cell Carcinoma). Deși s-a dovedit că IL-2 este esențial pentru diferențierea și proliferarea a la long a CTL, s-a stabilit că și IL-4 este un potent modulator al funcțiilor limfocitelor T, deoarece promovează atât dezvoltarea TCL în reacția limfocitelor mixtate alogenic cât și creșterea timocitelor independent de IL-2. Adausul de IL-4 induce creșterea celulelor TIL și cu aceasta, activitate antitumorală autologă mai eficientă. În funcție de doză, IL-4 induce creșterea semnificativă a

proliferării și expansiunii limfocitelor. Combinarea dozelor mici de IL-2 și IL-4 promovează semnificativ creșterea numărului limfocitelor, în comparație cu acțiunea singulară a IL-2 și este benefică la pacienții cu RCC, deoarece crește numărul celulelor TIL activate (68). Se pare că momentul sintezei IL-4 ar coincide cu citotoxicitatea celulelor T CD8+.

S-a constatat că LAK și TIL sunt sușe importante pentru terapia adaptivă, dar discrepanța dintre proliferare și citotoxicitate, în funcție de concentrația de IL-4, sugerează existența diverselor căi de generare a celulelor LAK. IL-4 afectează diferențierea celulelor îndeosebi B și T și crește și menține TIL fără a altera acțiunea contra celulelor tumorale autologe. Interleukina crește activitatea citotoxică a celulelor LAK și TIL de la om, contra celulelor autologe din melanom și alte tumori (69).

În terapia asociată cu IL-4 există pericolul intoxicării cardiace. Stimulând producția de IgE, IL-4 amplifică proliferarea mastocitelor și crește adeziunea limfocitelor la celulele endoteliale. Toxicitatea din faza clinică I induce edem periferic și periorbital, ca și toxicitate cardiacă (70).

În ciuda absenței aproape complete a eozinofililor, care de altfel nu au activitate tumorocidală și infiltrează tumorile, cele care exprimă IL-4 sunt cel puțin la fel de eficiente în rejectarea acestora la șoareci IL-5(-/-), ca și la cei de tip sălbatic. Totuși, neutrofilele sunt prezente în cantități nediminuate și depleția lor parțială restrictează creșterea tumorilor fiind astfel responsabile de supresia acestora, cel puțin parțial. Creșterea tumorilor care secretă IL-5 nu este afectată la șoarecii tip sălbatic sau la cei IL-5(-/-), chiar în cazul în care induc eozinofilia în ambele tulpini (71).

IL-4 și IL-13 pot regla în cultură, expresia unor proteine, ca și activitatea enzimatică a celulelor carcinomului renal și epiteliului tubular. Citokinele elaborate de limfocitele T ar putea afecta ectopeptidazele de suprafață implicate în procesul adeziunii celulelor tumorale. Inhibarea aminopeptidazelor și dipeptidil-peptidei IV/CD26 ar putea reprezenta o nouă ipoteză de supresare a diseminării cancerului (72).

Leucemia cronică a limfocitelor T (LLC-T) este definită ca leucemie posttimpică a celulelor T. Fenotipul dublu +(DP) CD4+ CD8+ este rar și apare în timocite și în limfocitele T periferice. Unele linii DP exprimă mRNA IL-4 și produc nivele înalte de IL-4, sugerând că derivă din limfocitele T CD4+ periferice (73).

Cultivarea PBMC de la pacienți cu mielom, tratați cu IL-4 și TNF alpha duce la apariția unor plasmocite clonale, sugerând prezența precursorilor circulanți în sângele periferic. În aproape toate cazurile, se constată diferențierea parțială a limfocitelor B, prin detectarea lanțurilor ușoare kappa și lambda. Se sugerează că IL-4 și TNF-alpha determină această diferențiere a celulelor B policlonale normale reziduale, mai curând decât precursorii circulanți ai celulelor melanomului din sângele pacienților cu melanom (74).

Comparativ cu insulina sau IL-4, în celulele tumorilor mamare primare IRS-1 (nu IRS-2) există o moleculă de semnalizare predominantă activată de IGF-1, asociată cu activarea mai susținută a căilor de semnalizare, ceea ce conduce la amplificarea creșterii celulelor. Pe celulele liniei de carcinom mamar T47-D, IGF-1 stimulează mai puțin tirozinfosforilarea IRS-1, decât o face insulina sau IL-4 (75).

Celulele maligne din țesuturile tumorale produc citokine/factori de creștere care influențează creșterea tumorilor, imunogenicitatea acestora și răspunsul imun al gazdei.

Limfocitele T neoplazice CD4+ și CD8+ PTLL (Peripheral T-cell Lymphoma) purificate din nodulii limfatici secretă cantități mari de IL-4 comparativ cu cele nemaligne. IL-4 este cea mai potentă citokină care induce proliferarea in vitro și creșterea celulelor T maligne. Deoarece este o citokină activată local, cu un larg spectru de proprietăți imunologice, reglarea producției ei de către IFN-gamma și IL-2 în limfocitele T maligne, poate constitui un important parametru pentru imunoterapia specifică anticanceroasă. Celulele T maligne produc IL-4, citokină tip Th2 ce acționează ca factor de creștere și poate juca un rol critic în mecanismele bolii PTCL (76).

1. Moser M. Flamand V. Abramowicz D. Goldman M. Urbain J. Leo O. Induction of murine IL-4 synthesis by freshly isolated T cells stimulated by anti-CD3 antibodies. *J.Cell Biochem.*, 1989, suppl. 13A, 238.
2. de Waal Malefyt Parlard R. de Vries JE. IL-4 can mediate CD8+ induction mature human CD4 cells. *J.Cell Biochem.*, 1989, suppl. 13A, 315.
3. Ueno Y. Boone T. Uittenbogaart GH. Selective stimulations by recombinant IL-4 and IL-3. *Cell Immunol.*, 1989, 2, 388-392.
4. Sad S. Mosmann TR. Interleukin (IL-4), in the Absence of Antigen Stimulation, Induces an Anergy-like State in Differentiated CD8+TC1 Cells: Loss of IL-2 Synthesis and Autonomous Proliferation but Retention of peritoneal macrophage immune competence. *European Journal of Immunology*, 1998, 28 (2), 610-5.
5. Horsfall AG. Butler DM. Marinova L. Warden PJ. Williams RD, Maini RN. Feldmann M. Suppression of collagen-induced arthritis by continuous administration of IL-4. *Journal of Immunology*, 1997, 159 (11), 5687-96.
6. Li-Weber M. Laur O. Davydov I. Hu C. Salgame P. Krammer PH. What controls tissue-specific expression of the IL-4 gene? *Immunobiology, Cytotoxicity and Synthesis of Other Cytokines. J.Exp.Med.*, 1995, 182, 1505-1515.
7. Weiss G. Bogdan C. Hentze MW. Pathways for the Regulation of Macrophage Iron Metabolism by the Anti-Inflammatory Cytokines IL-4 and IL-13. *The Journal of Immunology*, 1997, 158, 420-425.
8. Baunhofer JM. Beinbauer BG. Wang JE. Brandmeier H. Geissler K. Losert U. Philip R. Aversa G. Rogy HA. Gene transfer with IL-4 and IL-13 improves survival in lethal endotoxemia in the mouse and ameliorates 1997. 198 /1-3), 170-8.
9. Ferrick DA. Schrenzel MD. Mulvania T. Hsieh B. Ferlin WG. Lepper H. to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vitro. *Nature*, 1995, 373 (6511), 265-7. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response
10. Maggi E. The Th1/Th2 paradigm in allergy. *Immunotechnology*, 1998, 3 (4), 233-44.
11. DiMolfetto L. Neal HA. Uua A. Reilly C. Lo D. The density of the class II MHC T cell-receptor ligand influences. *Cellular Immunology*, 1998, 183 (1), 70-9.
12. Jourdan P. Abbal C. Nora N. Hori T. Uchiyama T. Vendrell JP. Bousquet J. Taylor N. Pene J. Yssel H. IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells. *Journal of Immunology*, 1998, 160 (9), 4153-7.
13. Stack PM. Thompson CB. Fitch FW IL-4 enhances long-term survival of CD28 deficient T cells.. *Journal of Immunology*, 1998, 160 (5), 2255-62.
14. Prussin C. Foster B. TCR V alpha 24 and V beta 11 coexpression defines a human NK1T cell analog containing a unique Th0 subpopulation. *Journal of Immunology*, 1997, 159 (12), 5862-70.
15. Comoy EE. Pestel J. Duez C. Stewart GA. Vendeville C. Fournier C. Finkelman F. Capron A. Thyphronitis G. The house dust mite allergen, *Dermatophagoides pteronyssinus* promotes type 2 responses by modulating the balance between IL-4 and IFN-gamma. *Journal of Immunology*, 1998, 160 (5), 2456-62.

16. Laan MP, Tibbe GJ, Oranje AP, Bosmans EP, Neijens HJ, Savelkoul HF. CD4+ cells proliferate after peanut-extracts specific and CD8+ cells proliferate after polyclonal stimulation of PBMC of children with atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 1998, 28 (11), 35-44.
17. Barata LT, Ying S, Meng Q, Barkans J, Rajakulasingam K, Durham SR, Kay AB. IL-4 and IL-5 positive T lymphocytes, eosinophils, and mast cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1998, 101 (2 Pt.1), 222-30.
18. Bjerke T, Gaustadnes M, Nielsen S, Nielsen LP, Schiøtz PO, Rudiger N, Reimert CM, Dahl R, Christensen I, Peulsen LK. Human blood eosinophils produce and secrete interleukin-4. *Respiratory Medicine*, 1996, 90 (5), 271-7.
19. Sewell WA, Scurr LL, Orphanides H, Kinder S, Ludwyczyk RI. Induction of interleukin-4 and interleukin-5 expression in mast cells is inhibited by glucocorticoids. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1998, 5 (1), 18-23.
20. Tanaka H, Nagai H, Maeda Y. Effect of anti-IL-4 and anti-IL-5 antibodies on allergic airway hyperresponsiveness in mice. *Life Sciences*, 1998, 62 (13), 169-74.
21. Viola JP, Kiani A, Bozza PT, Rao A. Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood*, 91 (7), 2223-30.
22. Coffey PJ, Schweizer RC, Dubois GR, Maikoc T, Lammers JW, Koenderman L. Analysis of signal transduction pathways in human eosinophils activated by chemoattractants and T-helper 2-derived cytokines interleukin-4 and interleukin-5. *Blood*, 1998, 91 (7), 2547-57.
23. Kato M, Liu W, Hattori T, Nakashima I. Evidence of potential regulation by interleukin-4 of the soluble intercellular adhesion molecule 1 level in patients with seasonal allergic rhinitis under provocation by a small amount of natural allergen. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*, 1998, 107 (3), 232-5.
24. Rakasz E, Blum AM, Metwali A, Elliot DE, Li J, Ballas ZK, Qadir K, Lynch R, Weinstock JV. Localization and regulation of IFN-gamma production within the granulomas of murine Schistosomiasis in IL-4 deficient and control mice. *Journal of Immunology*, 1998, 160(10), 4994-9.
25. Dickensheets HL, Donnelly RP. IFN-gamma and IL-10 inhibit induction of IL-1-receptor type I and type II gene expression by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *Journal of Immunology*, 1997, 159 (12), 6226-33.
26. Leveaque MC, Haynes BF. Cytokine induction of the ability of human monocyte CD44 to bind hyaluronan is mediated primarily by TNF-alpha and is inhibited by IL-4 and IL-13. *Journal of Immunology*, 1997, 159 (12), 6184-94.
27. Trautmann A, Krohne G, Brocker EB, Klein CE. Human mast cells augment fibroblast proliferation by heterotypic cell-cell adhesion and action of IL-4. *Journal of Immunology*, 1998, 160 (10), 5053-7.
28. Toru H, Kinashi T, Ra C, Nonoyama S, Yata J, Nakahata T. Interleukin-4 induces homotypic aggregation of human mast cells by promoting LFA-1/ICAM-1 adhesion molecules. *Blood*, 1997, 89 (9), 3296-302.
29. Frabdjji P, Mourand W, Tkaczyk C, Singer M, David B, Colle JH, Mecheri S. IL-4 mRNA transcription is induced in mouse bone marrow-derived mast cells through an iHC class II-dependent signaling pathway. *European Journal of Immunology*, 1998, 28 (3), 844-54.
30. Brodie C, Goldreich N, Haiman T, Kazimirsky G. Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion. *Journal of Neuroimmunology*, 1998, 81 (1-2), 20-30.
31. Tretter T, Aman MJ, Bug G, Huber C, Peschel C. Hematopoietic growth factors are differentially regulated in monocytes and CD4+ T lymphocytes influence of IFN-alpha and interleukin-4. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 1998, 18 (2), 95-102.
32. Haruna K, Hikida M, Ohmori H. Antigen-Specific But Not Polyclonal IgE Response in Murine B Cells Cocultured with Th2 Clone is Refractory to Suppression by IL-4-Depletion, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1993, 102, 152-159.
33. Hasbold J, Lyons AB, Kehry MR, Hodgkin PD. Cell division numbers regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *European Journal of Immunology*, 1998, 28 (3), 1040-51.

34. Mark I.R. Katz DH. Analysis of the Promoter Elements Necessary for IL-4 and Anti-CD40 Antibody Induction of Murine ϵ epsilonRII (CD23). Comparison with the Germinline epsilon Promoter. *The Journal of Immunology*, 1997, 158, 263-272.
35. Ferlin WG. Severinson Eva. Strom Lena. Heath AW. Coffman RL. Ferrick DA. Howard LC. CD40 signaling induces interleukin-4-independent IgE switching in vivo. *Eur.J.Immunol.*, 1996, 26, 2911-2915.
36. Park HJ. Choi YS. Lee CE. Identification and activation mechanism of the interleukin-4-induced nuclear factor binding to the CD23 (b) promoter in human B lymphocytes. *Molecules and Cells*, 1997, 7 (6), 755-61.
37. Ryan CA. Dearman RJ. Kimber I. Gerberick F. Inducible interleukin-4 (IL-4) production and mRNA expression following exposure of mice to chemical allergens. *Toxicology Letters*, 1998, 94 (1), 1-11.
38. Li XM. Schaffield BH. Wang QF. Kim KH. Huang SK. Induction of pulmonary allergic responses by antigen-specific Th2 cells. *Journal of Immunology*, 1998, 160 (3), 1378-84.
39. Moverare R. Rak S. Elzman L. Allergen-specific increase in interleukin (IL)-4 and IL-5 secretion from peripheral blood mononuclear cells during birch-pollen immunotherapy. *Allergy*, 1998, 53 (3), 275-81.
40. Cameron LA. Durham SR. Jacobson MR. Masuyama K. Julinsson S. Gould HJ. Lowhagen O. Minshall EM. Hamid QA. Expression of IL-4, Cepsilon RNA, and Iepsilon RNA in the nasal mucosa of patients with seasonal rhinitis: effect of topical corticosteroids. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1998, 101 (3), 330-6.
41. Sewell WA. Hu HH. Dissociation of production of interleukin-4 and interleukin-5. *Immunology and Cell Biology*, 1996, 74 (3), 274-277.
42. King CL. Nutman TB. IgE and IgG Subclass Regulation by IL-4 and IFN-gamma in Human Helminth Infections. Assessment by B Cell Precursor Frequencies. *Journal of Immunology*, 1993, 151, 1, 458-465.
43. McKenzie GJ. Bancroft A. Grencis RK. McKenzie AN. A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated-immune responses. *Current Biology*, 1998, 8 (6), 339-42.
44. Urban JF.Jr. Noben-Tranth N. Donaldson DD. Madden KB. Morris SC. Collins M. Finkelman FD. IL-13, IL-4R-alpha, and Stat 6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity*, 1998, 8 (2), 255-64.
45. MacDonald AS. Maizels RM. Lawrence RA. Dransfield I. Allen JE. Requirement for in vitro production of IL-4, but not IL-10, in the induction of proliferation suppression by filarial parasites. *Journal of Immunology*, 1998, 160 (3), 1304-12.
46. Maizels RM. MacDonald AS. Lawrence RA. Dransfield I. Allen JE. Requirement for in vivo production of IL-4, but not IL-10. *J.of Immunol.* 1998, 160 (8), 4124-32.
47. Quentmeier H. et al. IL-4R and gamma chain expression in CPS and IL-4 stimulated MONO-MAC-6 cells. *Leukemia*, 1995, 9, 336-340.
48. Bonder CS. Dickensheets HL. Finaly-Jones JJ. Donnelly RP. Hart PH. Involvement of the IL-2 receptor gamma-chain in the control by IL-4 human monocyte and macrophage proinflammatory mediator production. *Journal of Immunology*, 1998, 150 (8), 4048-56.
49. Wang HY. Zamorano J. Keegan AD. A role for the insulin-interleukin (IL)-4 receptor motifs of the IL-4 receptor alpha-chain in regulating activation of the insulin-receptor substrate 2 and signal transducer and activator of transcription 6 pathways. Analysis by mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 (16), 9898-905.
50. Ohmori Y. Hamilton TA. IL-4-induced STAT suppresses IFN-gamma-stimulated STAT 1-dependent transcription in mouse macrophages. *Journal of Immunology*, 1997, 159 (11), 5474-82.
51. Saito S. Harada N. Ishii N. Morii T. Sakakura S. Enomoto M. Umekage H. Nishikawa K. Narita N. Nakamura M. Sugumara K. Morikawa H. Functional expression on human trophoblasts of IL-4 and IL-7 receptor complexes with a common gamma chain. *Biochem. And Biophys. Research. Communicat.*, 1997, 231 (2), 429-34.
52. Andersson A. Grunewald SM. Duschl A. Fischer A. DiSanto JP. Mouse macrophage development in the absence of the common gamma chain: defining receptor complexes responsible for IL-4 and IL-13 signaling. *European Journal of Immunology*, 1997, 27 (7), 1762-68.

53. He YW, Malek TA. The IL-2 receptor gamma c chain does not function as a subunit shared by the IL-4 and IL-13 receptors. Implication for the structure of IL-4 receptor. *Journal of Immunology*, 1995, 155 (1), 9-12.
54. Palmer-Crocker AL, Hughes CC, Pober JS. IL-4 and IL-13 activate the JAK2 tyrosine kinase and Stat 6 in cultured human vascular endothelial cells through a common pathway does not involve the gamma c chain. *Journal of Clinical Investigation*, 1996, 98 (3), 604-9.
55. Vella A, Teague TK, Ihle J, Koppler J, Murrack P. Interleukin-4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: Stat 6 is probably not required for the effect of IL-4. *J. of Experimental Medicine*, 1997, 186 (2), 325-30.
56. Kaplan MH, Daniel C, Schindler U, Grusby MJ. Stat proteins control lymphocyte proliferation by regulating p27Kip1 expression. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, 18 (4), 1996-2003.
57. Micovits JA, Taub DD, Turcovski-Corrales SM, Ruscetti FW. Similar levels of human immunodeficiency virus type 1 replication in human TH1 and TH2 clones. *Journal of Virology*, 1998, 72 (6), 5231-8.
58. Honda J, Okubo Y, Tanaka K, Kusaba H, Kumagai M, Saruwatari N, Oizumi K. CD3-CD4-CD8-CD56-CD19-CD14-cells and CD3+CD8+dull-positive cells produce IL-4 in AIDS patients. *British Journal of Haematology*, 1998, 101 (1), 74-7.
59. Grnelli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, Paxton W, Steinman RM. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type1, while mature cells efficiently transmit both M-and T-tropic virus to T cells. *Journal of Virology*, 1998, 72 (4), 2733-7.
60. Olaitan A, Johnston MA, Reid WH, Poulter LW. Changes to the cytokine microenvironment in the genital tract mucosa of HIV+ women. *Clinical and Experimental Immunology*, 1998, 112 (1), 100-4.
61. Varriechio F, Husain SR, Leland P, Gill P, Puri RK. Interleukin-4 receptor expression in vivo on human AIDS-related Kaposi's . *Oncology Research*, 1997, 9 (9), 495-503.
62. Marshall JD, Robertson SE, Trinchieri G, Chehimi J. Priming with IL-4 and IL-13 during HIV-1 infection restores in vitro IL-12 production by mononuclear cells of HIV-infected patients. *Journal of Immunology*, 1997, 159 (11), 5705-14.
63. Evans TG, Fitzgerald T, Gibbons DC, Keefer MC, Soucier H. Th1/Th2 cytokine responses following HIV-1 immunization in seronegative volunteers. The AIDS Vaccine Evaluation Group. *Clinical and Experimental immunology*, 1998, 111 (2), 243-50.
64. Naif HM, Li S, Ho-Shon M, Mathijs JM, Williamson P, Cunningham AL. The State of Maturation of Monocytes into Macrophages Determines the Effects of IL-4 and IL-13 on HIV Replication. *The Journal of Immunology*, 1997, 158, 501-511.
65. Ayyavoo V, Mahboubi A, Mahalingam S, Ramalingam R, Kudchodkar S, Williams Wv, Green DR, Weiner DB. HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa B. *Nature Medicine*, 1997, 3 (10), 117-23.
66. Toop MS, Koenigsmann M, Mire-Sluis A, Oberberg D, Eitelbach F, von Marschall Z, Notter M, Reuff B, Stein H, Thiel E, Berdel WE. Recombinant Human Interleukin-4 Inhibits Growth of Some Human Lung Tumor Cell Lines In Vitro and In Vivo. *Blood*, 1993, 82, 9, 2837-2844.
67. Hunt JD, Pippin BA, Landreneau RJ, Jacob WF, Lotze MT, Siegfried JM. Transfer and Expression of the Human Interleukin-4 Gene in Carcinoma and Stromal Cell Lines Derived from Lung Cancer Patients. *Journal of immunology*, 1993, 151, 314-321.
68. Peyret C, Bochner BH, Lee TY, Koo AS, DeKernion JB, Belldegrun A. Regulatory Effect of Interleukin-4 on Tumor-Infiltrating Lymphocytes Derived from Human Renal Cell Carcinoma. *Journal of Surgical Research*, 1992, 53, 602-609 .
69. Tsunoda T, Tanimura H, Yamaue H, Iwahashi M, Tani M, Tamai M, Noguchi K, Mizobata S, Arai K. Interleukin 4 inhibits LAK and initial phase TIL activity via interleukin 2 receptor. *International Journal of Oncology*, 1995, 7, 1117-1121.
70. Trehu EG, Isner JM, Mier JW, Karp DD, Atkins MB. Possible Myocardial Toxicity Associated with Interleukin-4 Therapy. *Journal of Immunotherapy*, 1993, 14, 348-351.
71. Noffz G, Qin Z, Kopf M, Blankenstein T. Neutrophils but not eosinophils are involved in growth suppression of IL-4-secreting tumors. *Journal of Immunology*, 1998, 160 (1), 345-50.

72. Riemann D. et al. Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. *Clinical and Experimental Immunology*, 1995, 100 (2), 277-283.
73. Mizuki M. Tagawa S. Machii T. Shibano M. Tatsumi E. Tsubaki K. Tako H. Yokohama A. Satou S. Nojima J. Hirota T. Kitani T. Phenotypical heterogeneity of CD4+CD8+ double-positive chronic T lymphoid leukemia. *Leukemia*, 1998, 12 (4), 499-504.
74. Murphy PT. Hutchinson RM. Interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha produce non isotype specific partial differentiation of peripheral blood B-cells in myeloma. *Leukemia and Lymphoma*, 1998, 28 (3-4), 377-82.
75. Jackson JG. While MF. Yee D. Insulin receptor substrate-1 is the predominant signaling molecule activated by insulin-like growth factor-I, insulin, and interleukin-4 in estrogen receptor-positive human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 (16), 9994-10003.
76. Razinddin S. Sheikha A. Abu-Eshy S. Al-Janadi M. Regulation of interleukin-4 production and cytokine-induced growth potential in peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphomas. *British Journal of Haematology*, 1998, 100 (2), 310-6.

INTERLEUKINA-7 (IL-7)

Interleukina- 7, o limfoproteină-1 (LP-1) a fost descoperită în 1988 în linia celulară stromală din măduva osoasă de șoareci, IXN/A6, transformată de SV-40. Această linie a fost studiată în scopul analizei genei IL-7, stabilindu-se că, clona 1046 codifică această citokină de 25kD. Celulele neadezive pro-B 220- și B 220+ separate din culturi prelungite de măduvă osoasă de șoarece, proliferază sub influența IL-7. IL-7 induce proliferarea celulelor precursorare B și le menține în cultură (1).

La om, gena IL-7 este formată din 6 exoni dispersați într-un locus de peste 33kb lungime. Exonul 5 care codifică 18 aminoacizi este absent însă, din gena IL-7 de șoarece. La nivelul părții codificante a genei IL-7 există o omologie de 81% între cDNA uman și murin, de 73% în regiunea 5' necodificanță și de 63% în regiunea 3' necodificanță. Compararea secvențelor aminoacid dintre IL-7 uman și murin relevă omologii de 60%.

IL-7 uman recombinat (rhIL-7) are activitate proliferativă în măduva osoasă umană și murină, în timp ce IL-7 murin recombinat (rmIL-7) relevă această activitate numai la murine.

cDNA IL-7 uman s-a izolat din linia celulară de hepatom SK-HEP-1. În celulele COS, cDNA uman direcționează sinteza unui factor cu capacitatea de a determina creșterea celulelor pre-B. Clona umană IL-7 conține o regiune codificantă de 534 pb, care produce un polipeptid de 177 aminoacizi ce include un peptid de semnalizare de 25 aminoacizi. Reziduurile 70, 91 și 116 sunt locuri potențiale de N- glicozilare.

mIL-7 are 14,9 kD greutate moleculară, iar după glicozilare atinge 25 kD. Este format din 124 reziduuri aminoacizi precedate de un peptid semnal de 25 aminoacizi. Locurile potențiale de glicozilare sunt la nivelul aminoacizilor 69 și 90. Reziduurile 2, 33, 46, 91, 108 și 120 sunt reziduuri de cisteină necesare exprimării activității biologice a IL-7 murin. Transcriptele mRNA IL7 murin preparate din splină, timus, rinichi și ficat sunt de 2,9; 2,6; 1,7 și respectiv 1,5 kD fiind exprimate la variate nivele în funcție de țesutul analizat dar, de asemenea, pot depinde și de procesarea diferențiată.

Interleukina -7 și limfocitele T

IL-7 poate fi importantă în activarea primară a celulelor CD4+ umane naive separate din sângele cordonului ombilical, celule care exprimă IL-7R și răspund marcat la IL-7 în timpul stimulării primare. IL-7 induce dezvoltarea populațiilor de limfocite T care produc cantități mari de IL-4. De asemenea, creșterea IL-7 mărește producția de

IFN-gamma și de IL-10 indusă de IL-2. Producția de IL-4 indusă de IL-7 nu este inhibată de anticorpi neutralizanți anti-IL-4R, de unde aprecierea că IL-7 acționează direct pentru inducerea dezvoltării subsetului de limfocite Th2 și nu ulterior reglării producției de IL-4.

IL-7 potențează CD28 în costimularea proliferării celulelor CD4+ naive și ulterior în producția de IL-4. Costimularea CD28-IL-7 activează primar CD4+, inducând exprimarea inițială a producției de IL-4 care, la rândul lui acționează pentru extinderea celulelor care produc citokine tip Th2 (2).

Experimente pe șoareci cu gena IL-7 deletată, oferă posibilitatea stabilirii rolului citokinei IL-7. Astfel, șoareci lipsiți de gena IL-7 au un număr total redus de limfocite T, dar raportul CD4/CD8 se păstrează în favoarea limfocitelor T alpha/beta, față de limfocitele T gamma/delta. IL-7 poate de asemenea, induce expresia receptorilor de citokine și poate fi implicat în diferențierea limfocitelor T alpha/beta sau delta/gamma. Se pare că, este un factor de creștere și diferențiere pentru celulele T delta/gamma. Se concludă că, IL-7 nu este numai un factor de întreținere ci și unul de creștere a limfocitelor T delta/gamma (3).

Exprimarea receptorului citoplasmatic CD23 de joasă afinitate pentru Ig E este semnificativ crescută prin costimularea cu PMA, Ca^{2+} și IL-7 (1000U/ml). În prezența IL-7, la 48 ore se observă o acumulare a CD23 intracelular, ceea ce reprezintă un profil diferit al expresiei de suprafață a acestuia, expresie de vârf la 72 de ore de cultură. Eliberarea crescută și producția bifazică de CD23 pot duce la degradarea accelerată a receptorului datorită acumulării excesive a acestuia.

Restimularea limfocitelor T CD4+ cu PMA și Ca^{2+} în absența lui IL-7 schimbă profilul producției de CD23 cu apariția unui vârf secund la 144 ore de cultură. Inducția producției de CD23 de către IL-7 este independentă de IL-2, IL-4, IL-9 și IL-15. Efectul IL-7 nu poate fi anulat de nici unul din anticorpii anti-citokine menționate. Adăugarea IL-7 la subsetul specific CD4+ CD23+, poate amplifica adezivitatea celulelor T la monostratul de celule parenchimale.

Moleculile de adeziune LFA-1 și VLA-4 răspund de creșterea adezivității limfocitelor T activate CD4+ CD23+ cultivate în prezența IL-7.

Adezivitatea subseturilor limfocitare CD4+ CD23+ este anulată cu anticorpi anti-LFA-1, VLA-4-alpha sau ICAM-1. Adăugarea în cultură de anticorpi monoclonali anti-IL-7 sau anti-IL-7R blochează adezivitatea la monostrat a celulelor CD4+ CD23+, indusă de IL-7. Se subliniază astfel că, IL-7 ar avea un rol și în reglarea nivelului de exprimare a moleculelor de adeziune cu importanță în cooperarea celulară.

Linfocitele T din sângele periferic (PBM) preactivate cu PMA și Ca^{2+} și activate de IL-7 prezintă o expresie crescută a CD23.

Investigarea exprimării lui CD23 pe celulele PBT umane, activate de PHA de la donorii sănătoși demonstrează că aceasta se exprimă numai pe CD4+ activate. Citometria în flux relevă că CD4+ neactivate nu exprimă CD23 detectabil. Adăugarea de IL-7 (1000U/ml) la celulele CD4+ activate determină o creștere marcată (29%) a expresiei CD23. Se sugerează că independent de IL-2, IL-7 are un efect reglator specific asupra exprimării CD23, independent de IL-2. Are abilitatea de a regla la 48 și respectiv 73 ore de cultură, expresia DR-HLA și CD23 pe limfocitele T CD4+ activate. Celulele activate cu PHA cultivate în prezența lui IL-7 produc citokine de tipul Th2 (4,5,6).

Celulele T-CD4+CD45Ra+ din sângele cordonului ombilical uman exprimă CDw 127 (IL-7R) la nivele înalte, comparativ cu TCD4+CD45Ra+ adulte și produc atât IL-2 cât și o mică cantitate de IFN-gamma când sunt stimulate cu PHA.

IL-7 induce producția de IL-2 în ambele tipuri de limfocite Thelper (Th1 și Th2) în culturile de limfocite T CD4+CD45Ra+ din sângele cordonului ombilical fără stimularea TCR.

Printr-un mecanism de activare independent de antigen, IL-2 induce menținerea unei clone de celule T native cu potențial de diferențiere în celule Th1 sau Th2 (7).

La șoarecii deficienți în IL-7, expansiunea celulelor limfoide este redusă, proces ce nu se produce la nivelul măduvei osoase, splinei și timusului. Puținele timocite prezente exprimă markeri CD4 și/sau CD8 asociați cu maturarea celulelor T. De asemenea, în măduva osoasă s-a detectat un număr limitat de celule B, populații reduse sau distincte de celule T și B s-au găsit și în splina șoarecilor deficienți în IL-7. S-a demonstrat deci, că expansiunea celulelor limfoide în organism este reglată și de expunerea lor la IL-7 (8).

IL-7 joacă un rol important în creșterea și diferențierea limfocitelor T. Așa cum s-a arătat anterior, IL-7 induce expansiunea preferențială de timocite alpha beta+ CD4-CD8-TCR selectate de MHC clasa I, care exprimă repertoire V beta, sunt producătoare potențiale de IL-7 și distrug țintele dependente de aceasta (9).

IL-7 induce creșterea timocitelor de la șoarecii la care lipsește subpopulația CD44-, CD25-, creșterea aceasta este complet inhibată prin adausul de IFN alpha sau beta. De asemenea, în culturile de timus fetal, adausul de IL-7 crește intens expansiunea populației de timocite CD4-, CD8- CD44+, CD25+, iar IFN-alpha sau beta o inhibă. Se concluează că, interferonii tip I inhibă proliferarea timocitelor normale indusă de IL-7, dar nu blochează procesul normal de diferențiere (10).

Șoarecii deficienți în IL-7 arată un defect timpuriu în limfopoieză. Moartea celulelor T este însoțită de pierderea puternică a proteinei Bcl-2 și de creșterea proporției relative de celule în stadiul G0/G1 al ciclului celular.

Culturile de timocite imature tratate cu IL-7 determină suprareglarea proteinei Bcl-2 și supraviețuirea celulelor. Înainte de rearanjarea receptorului antigen TCR transducția semnalului indus de IL-7 este legată de un mecanism anti-apoptoză și de ciclul celular (11).

În culturile de timus fetal de șobolan, IL-7 schimbă calea diferențierii timocitelor TCR alpha/beta: întâi proliferază celulele CD8+ imature și ulterior celulele CD4+CD8+.

Migrarea timocitelor în afara lobulilor timici este accelerată și numărul zilnic de emigranți phi, beta, alpha - TCR maturi, crește în prezența IL-7. După administrarea IL-7, populația de celule TCR alpha, beta, phi nu se divide, sugerându-se astfel că IL-7 induce diferențierea timocitelor. Preferențial, au fost generate timocite CD4-CD8+ mature.

Adiția IL-7 nu modifică maturarea TCR gamma/delta în timpul primelor zile de cultură, dar numărul lor crește brusc la 6 zile de cultură. Distribuția timocitelor cu segmentele TCR-V alpha și TCR- V beta apare modificată în lobulii timici.

Se concluează astfel că, celulele TCR-delta-gamma apar târziu în ontogenie, iar IL-7 joacă un rol cheie pentru maturarea timocitelor TCR-alpha, beta și pentru expansiunea celulelor TCR gamma/delta (12) astfel că, IL-7 este un factor activ al creșterii celulelor T.

Factorul celulelor stem sincergizează cu IL-7 în stimularea proliferații progenitorilor T. IL-7 acționează ca un costimulator cu concavalina-A pentru a induce proliferarea celulelor T murine purificate.

IL-7 este costimulator cu forbol miristat acetat (PMA) în procesul de proliferare a limfocitelor T din sângele periferic. Crește citotoxicitatea celulelor TCD8+ umane, diferențiind CTL. La șoareci acționează pe celulele TCD8+ pentru a induce CTL, dar dependent de IL-2 și IL-6. Este necesar pentru proliferarea timocitelor murine indusă de IL-1. Induce LAK (Lymphokine Activated Killer) din celulele CD8+ izolate din țesuturile limfoide periferice murine. Crește expresia moleculelor ICAM-1 pe melanocite normale și pe cele maligne.

Interleukina-7 și limfocitele B

IL-7 este un factor de creștere al limfocitelor B, produs de celulele stromale ale măduvei osoase, și de celulele din foliculii limfoizi primari și centrii germinali.

Celulele stromale ale măduvei osoase de șoarece condiționează mediul de cultură limfoidă de lungă durată, cu principalul factor de creștere al celulelor pre-pro-B. IL7 este una din citokinele ferm asociată cu dezvoltarea timpurie a celulelor B. În sistemul de cultură dat, creșterea celulelor pre-pro-B se datorează complexului de asociere IL-7 cu cofactorul derivat din celulele stromale medulare (13).

În culturi de tip pro-B, IL-7 pare să fie aproape în întregime heterodimer, pe când în culturile pre-B este un monomer. Molecula cofactor de aproximativ 30kD, care migrează poate să mențină viabilitatea, dar nu proliferarea celulelor pre-pro-B, dar nu s-a identificat încă celula de origine a acesteia (14).

IL-7 singur nu afectează producția de IgG4 și IgE ce poate induce secreția de IL-4 din PBMC, iar producția de IgG3 este ușor stimulată. Asemenea lui IL-7, IL-9 prin lanțul comun gamma potențează și stimulează în special producția de către PBMC a IgG4 și IgE. IL-4 și IL-15 sunt total ineficiente.

Potențarea producției de IgG4 și IgE necesită prezența limfocitelor T, care determină creșterea expresiei a două molecule solubile CD23 și IL-9 ce favorizează sinteza IgE și IgG4, CD23 și IL-9. Inhibarea cu anticorpi a acestor molecule inhibă parțial sinteza IgE indusă de IL-7 (15).

În ovariectomia practică la șoareci, datorită deficienței în estrogeni se produce o pierdere marcată a rezistenței, datorită stimulării osteoclastelor. În aceste condiții, limfopoieza B este stimulată, producându-se în măduva osoasă o marcată acumulare de celule pre-B B220.

Femelele de șoarece de 8 săptămâni, cu funcții ovariene intacte, tratate cu IL-7 relevă stimularea limfopoiezei în măduva osoasă, însoțită de o marcată pierdere de substanță osoasă prin stimularea resorbției osoase osteoclastice.

La femelele și masculii de șoareci cărora le lipsește IL-7R se arată din contră o creștere puternică a trabeculelor osoase ale femurului. Se demonstrează astfel că, perturbarea limfopoiezei B în măduva osoasă este strâns legată de modificarea masei osoase. Se presupune că amplificarea limfopoiezei B s-ar datora deficienței estrogenilor implicați în mecanismul stimulării resorbției osoase (16).

Limfopoieza B se modifică cu vârsta, constatându-se o scădere severă a numărului celulelor pre-B la șoarecii bătrâni. Celulele pro-B proaspăt izolate declină cu vârsta capacitatea de a prolifera pe celulele stromale.

Pierderile funcționale ale acestor celule în măduva osoasă sau în cultură nu pot fi justificate prin modificări structurale ale acestora. Diminuarea proliferării se datorează modificărilor survenite de a putea reacționa la citokinele derivate din stromă. Proliferarea indusă de IL-7 este sever afectată la vârsta de 2 ani, indiferent de concentrația IL-7 sau de durata timpului de cultură.

Tot mai frecvent după stimularea cu IL-7, celulele bătrâne rămân în faza G0/G1. Ele nu răspund nici la factorul celular stem (SCF), nici la factorul IGF-1. Se precizează că IL-7R rămâne integru prin păstrarea nealterată a lanțului alpha și a lanțului comun gamma. Totuși, se presupune că activitatea IL-7 este afectată, probabil, tot prin disfuncția complexului receptor de semnalizare IL-7. Deci, celulele stromale purificate de la șoarecii bătrâni sunt deficiente în abilitatea de a susține proliferarea liniilor limfoide-B specifice IL-7.

Producția de IL-7 este aceeași la animalele tinere și bătrâne. Totuși, se presupune că celulele stromale reglează limfopoieza B prin limitarea cantității de IL-7 necesară pentru precursori, în cazul animalelor bătrâne (17,18).

Inițial, IL-7 a fost descris ca un factor ce controlează supraviețuirea progenitorilor B. Șoarecii fără gena IL-7, sau fără lanțul gamma al receptorului ca element de semnalizare, arată defecte profunde în diferențierea limfocitelor. Șoarecii transgenici ce superexprimă gena IL-7 arată, de asemenea, marcate modificări în evoluția limfocitelor, iar în unele cazuri pot dezvolta tumor limfoide. Superexprimarea IL-7 la șoarecii transgenici arată că gena IL-7 este controlată de promotorul MHC clasa IIa al acestora (19).

In vivo la șoarecii, IL-7 crește numărul neutrofilelor imature. Pe baza studiilor liniilor celulare de șoarecii, nu se poate aprecia dacă neutrofilele umane sunt ținte pentru IL-7. Neutrofilele umane exprimă însă constitutiv lanțul gamma c, care este component atât al IL-7R cât și al IL-2R, IL-4R, IL-9R și IL-15R. Expresia lanțului gamma c singur, în neutrofilele umane este suficientă pentru a modula răspunsul neutrofilelor (20).

Receptorul IL-7 (IL-7R)

Citokinele IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 și IL-15 sunt reunite în familia citokinelor IL-2, datorită lanțului gamma prezent în receptorul fiecăreia din acestea, fiind astfel lanțul comun gamma c, subunitate care conferă acestor citokine unele proprietăți funcționale apropiate. Mutațiile în gena lanțului gamma c, determină la om un sindrom sever de imunodeficiență combinată ceea ce demonstrează că acest lanț este esențial pentru dezvoltarea funcțională și normală a sistemului imunitar.

Celulele hematopoietice umane dețin două transcripțe gamma c, care diferă în regiunea de codificare carboxil terminală. Așa cum s-a arătat în cazul citokinei IL-2, primul transcript raportat este numit gamma c-lung, iar cel de-al doilea, care are o deleție de 72 nucleotide la capătul 3 este numit gamma c-scurt. Această modificare conduce la pierderea a 24 aminoacizi, incluzând reziduu tirozină conservat, care este utilizat de mai

mulți membrii ai familiei receptorului citokinelor. Gena gamma c este unică. Pierderea situsului cu SII2 în transcriptul gamma c-scurt sugerează că, atât transcriptul gamma c-lung, cât și cel gamma c-scurt, leagă diferit în procesul de semnalizare IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 și IL-15 (21).

Lanțul gamma c este critic pentru dezvoltarea limfocitelor cu IL-7/IL-7R. Dezvoltarea celulelor T intratimice este controlată de lanțul gamma c al acestui receptor comun. La șoarecii deficienți în IL-7R-alpha și tratați cu anticorpi anti-gamma c, fiecare din cele 4 stadii distincte fenotipice ale timocitelor CD4- CD8- n-au condus la dezvoltarea limfocitelor T; se sugerează necesitatea prezenței lanțului gamma c pentru creșterea și diferențierea acestor celule.

Șoarecii deficienți în lanțul gamma c manifestă un model fenotipic distinct al dezvoltării celulelor pro-T. S-a conchus că datorită faptului că, mai multe citokine folosesc acest lanț, acestea pot acționa pe calea lui modificată inițiind dezvoltarea limfocitelor T (22).

Asocierea lanțului gamma c cu receptorul uman IL-7 este modulată de activarea celulelor T. IL-7 reacționează atât pe limfocitele T inactive, dorminde, cât și pe cele activate. IL-7R funcțional deține două subunități. Complexul IL-7R-gamma c este detectat numai în limfocitele T activate (23). IL-7 induce rearanjarea completă a locusului TCR-gamma.

Celulele măduvei osoase cultivate cu IL-7 se pot diferenția in vivo în toate subpopulațiile fenotipice de limfocite T, fără o preferință aparentă către originea delta/gamma. Se sugerează că rearanjarea genei TCR-gamma în celulele pre-T adulte este reglată de IL-7, dar locusul TCR-beta necesită semnale adiționale sau alternative pentru inducerea rearanjării complete (24).

La șoarecii deficienți în IL-7R-alpha, genele TCR-gamma sunt rearanjate, dar nu transcrise. IL-7 este o citokină factor de creștere pentru limfocitele T și B în etapa de dezvoltare foarte timpurie a acestora. IL-7R este un heterodimer al unui lanț alpha care cuplează specific IL-7 și lanțul gamma c.

IL-7 ar avea rol și în diferențierea limfocitelor T delta/gamma, fapt susținut de datele recente privind șoarecii deficienți în lanțul alpha al IL-7R/- sau IL-7/-, cărora le lipsește complet limfocitele T gamma/delta, dar nu alpha beta. Se arată că genele TCR V-gamma 4 și 5 și V-gamma 6 sunt rearanjate, iar transcriptele lor sterile sunt exprimate în timocitele IL-7R alpha -/-. TCR gamma și V-gamma 5, dar nu sunt transcrise în timocitele șoarecilor IL-7R alpha -/-.

Genele RAG-1 și RAG-2 recombinante, sunt transcripțional active în timocitele IL-7R-alpha -/- adulte. Factorul de transcriere indus de IL-7, -STAT-5, nu este activ în celulele șoarecilor IL-7R-alpha -/- din timusul fetal în comparație cu șoarecii IL-7R-alpha +/+. IL-7/IL-7R au rol specific în semnalizare, posibil mediat de STAT-5 pentru rearanjarea complexului TCR gamma în timpul dezvoltării celulelor T gamma/delta și în rearanjarea genelor V-gamma 4 și V-gamma 6 versus V-gamma 5 (25). Înainte de a se exprima, genele TCR sunt rearanjate prin recombinaza VDJ-specifică, proces inițiat timpuriu în timocitele CD44+ 25+.

Șoarecii IL-7R(- -) au marcate deficiențe în celule B și T-beta, alpha și le lipsesc total, limfocitele T gamma-delta. Dezvoltarea timocitelor este stopată într-un stadiu foarte timpuriu (DN CD44- CD25-), precedând blocarea rearanjării genelor VDJ.

Examinarea statutului rearanjării genelor TCR în timocitele șoarecilor IL-7R(-/-) și a prezenței celulelor T alpha/beta, a relevat că locusul TCR-beta este aproape normal în rearanjarea VDJ.

Rearanjarea locusului TCR-gamma a fost sever redusă sau chiar absentă în cazul tuturor genelor V-gamma analizate (V-gamma 3, V-gamma 4, V-gamma 1,1, V-gamma 1,2 și V-gamma 2. Defectul în rearanjarea lanțului gamma din timocitele IL-7R (-/-) și la șoarecii TCR delta(-/-) nu este determinat de absența limfocitelor T mature delta/gamma.

IL-7R, IL-7 și limfopoietina stromală timică servesc drept semnal pentru rearanjarea specifică a locusului TCR-gamma (26). Semnalizarea IL-7 joacă un rol major în facilitarea dezvoltării TCR-gamma/delta și în inducerea rearanjamentelor VJ (asamblare variabilă) la locusul TCR-gamma. Celulele purtătoare de TCR-gamma/delta lipsesc din timusul, splina și tegumentul șoarecilor adulți deficienți în lanțul gamma c, dar la feteși timocitele mici exprimă nivele scăzute de TCR gamma/delta. Nu s-au observat defecte totale în rearanjările TCR-delta sau TCR-gamma la șoarecii gamma c de orice vârstă.

Introducerea productivă de transgene rearanjate TCR V-gamma 1 sau TCR V-gamma 1/V-delta 6 la șoarecii purtători de mutații în lanțul gamma c, nu refacă dezvoltarea TCR-gamma/delta la nivele normale, sugerând astfel ideea că, pentru aceasta se produc semnale adiționale dependente de lanțul gamma c, altele decât cele reclamate pentru procesul recombinării.

Nivelele Bcl-2 din timocitele transgenice ale șoarecilor gamma c- sunt dramatic reduse comparativ cu ale șoarecilor transgenici gamma c+. Receptorii dependenți de lanțul gamma c sunt necesari pentru menținerea celulelor TCR-gamma/delta și contribuie la completarea rearanjărilor TCR gamma primar (27). Și în cazul IL-7R la cuplarea IL-7, lanțul gamma c este critic pentru funcționare. Pentru transducția semnalului IL-7R este necesară o porțiune limitată a domeniului citoplasmatic al lanțului gamma. În timp ce lanțul gamma al IL-7R servește la transducția semnalului, lanțul alpha determină evenimentele semnalizării specifice, direct asociate cu moleculele de semnalizare citoplasmatică.

Se presupune că la om, patogeneza moleculară a SCID-X (imunodeficiență combinată severă) este datorată principalmente defectelor în complexul IL-7/IL-7R, defecte mediate de lanțul gamma c. La șoareci, defectele genelor IL-7 și IL-7R-alpha induc alterări imunologice similare cu SCID-X uman (28). IL-7 nu transduce semnale prin defectul molecular al lanțului gamma c, dovedindu-se astfel indispensabil pentru dezvoltarea limfocitelor T.

Blocarea cu anticorpii monoclonali M21 anti-lanțul alpha al IL-7R uman, determină limitarea maturării din stadiul de precursori CD34+ în cel de progenitori CD4+ CD3- CD1+, și ulterior, în timocite CD4+ CD8+. Se conchide astfel că, IL-7 are un rol critic în timpul dezvoltării timocitelor umane, fiind un factor de creștere și dezvoltare timpurie a limfocitelor T (29).

Modul de constituire a plăcilor Peyer a fost folosit pentru a demonstra rolul IL-7R-alpha și momentul în care el devine necesar. Apariția spoturilor de VCAM-1 în intestin, reprezintă stadiul inițial în formarea plăcilor Peyer; ulterior are loc acumularea de celule purtătoare de IL-7R-alpha CD4 și eventual, intrarea limfocitelor mature care exprimă CD3 sau B220, procese prezente în perioada prenatală.

Se pune întrebarea, care din aceste evenimente sunt defective la șoarecii cu SCID. La embrioni și nou-născuți de șoareci, IL-7R-alpha(-/-) nu s-au detectat spoturi de VCAM-1, sugerându-se că semnalul IL-7R-alpha este implicat în faza timpurie a formării plăcilor Peyer. Aceeași defecțiune se constată și la șoarecii lipsiți de Jak-3(-/-), și astfel, în procesul de formare a plăcilor, etapele imediat următoare lipsesc (30). Șoarecii cu deficiență în lanțul alpha al IL-7R (-/-), lanț care suportă deleții, dețin populații de limfocite și timocite oprite în dezvoltare.

Exprimarea genelor ce activează recombinazele RAG-1 și RAG-2 este puternic redusă în TCR IL-7R-alpha(-/-) și în timocitele dublu negative ale acestor șoareci transgenici. Deci, lanțul IL-7R-alpha controlează expresia RAG și inițierea rearanjării VDJ a TCR-beta, în celulele dublu negative (31).

IL-7R-alpha este esențial pentru dezvoltarea celulelor T gamma/delta, dar nu pentru dezvoltarea celulelor NK. Șoarecii lipsiți de subunitatea gamma c din receptorul pentru IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 și IL-15 au defecte marcate în linia limfoidă. Complexul IL-7/IL-7R, reprezintă, așa cum s-a menționat, o structură critică pentru dezvoltarea limfocitelor T și B. Șoarecii cu deficiențe în IL-7-alpha nu dezvoltă limfocite T gamma/delta, dar NK sunt normale (32).

IL-7 și calea de semnalizare Jak-STAT

Familia tirozinkinazelor (TK) Jak-3 este implicată în semnalizarea emisă de receptorii care utilizează lanțul gamma c al citokinelor IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 și IL-15. La adult, Jak-3 se exprimă în numeroase tipuri tisulare hematopoietice, dar și nehematopoietice cum sunt placenta, plămâni, ficatul, rinichii, splina, creierul și intestinul subțire. Jak-3 se exprimă, de asemenea, și într-o varietate de fenotipuri leucemice derivate din linii celulare mieloidă și/sau limfoide ca și în măduva osoasă normală bogată în celule stem și progenitori CD34+.

Prin splicing-ul Jak-3 cu exonul II al hormonului Leydig insulin-like (LEY i-1) s-a obținut o varietate de „splice” a Jak-3, numită I-Jak-3 și care este prezentă în mod normal în aproape toate țesuturile hematopoietice și/sau nehematopoietice care exprimă această TK. Jak-3 se cartează pe cromosomul 19 (19p12-13,1), regiune în care se cartează și gena pentru hormonul Leydig insulin-like (33).

IL-7, ca principală citokină pentru dezvoltarea celulelor T, se exprimă prin intercalarea kinazelor Jak-1 și Jak-3 în transducția semnalelor de activare a timocitelor. Ea stimulează timocitele umane prin fosforilarea rapidă a tirozinei proteinelor IRS-1 și IRS-2 (Insulin Receptor Substrat). Cele două kinaze Jak sunt asociate în timocite cu cele două IRS, deși în urma activării de către IL-7 kinaza Jak-3 se asociază preferențial cu IRS-1. Proteinele IRS de 160kD și 185kD asociate cu subunitatea reglatoare p85 fosfatidilinozitol 3 (PI 3) kinaza, sunt dependente de IL-7. IL-7 induce creșterea accentuată a fosforilării în activitatea asociată cu IRS-2 și nu cu IRS-1. Se sugerează că semnalizarea IL-7R este diferită la nivelul proteinelor IRS-1 și IRS-2, posibil prin două căi ale reglării via Jak-1 și Jak-3 (34). Șoareci și subiecți umani cu deficiențe în Jak-3

relează o reglare improprie în maturarea limfocitelor T și B, kinaza având astfel un rol critic. Șoarecii cu limfocite T deficiente în Jak-3 dețin un timus redus ca dimensiuni, celule T CD8 periferice foarte puține, slabă secreție de citokine în urma stimulării cu mitogeni și o severă reducere a proliferării.

Expresia Jak-3 în timus, restaurează dezvoltarea pozitivă a CD8+, gamma/delta și NK. În limfocitele T periferice proteina Jak-3 conduce la fenotipul Jak-3(-/-), absența ei nementinând funcțiile acestor celule (35).

Izoformele STAT-5A și STAT-5B din limfoblastele T din sângele periferic au abilitatea de a se lega la Secvența de Activare a interferonului Gamma (GAS), complex care se translocă rapid în celulele tratate cu IL-7 și IL-2. Aceste două citokine sunt similare privind abilitatea de a induce fosforilarea tirozinei STAT-5A și STAT-5B și de a le lega la un element GAS imobilizat. Ele pot, de asemenea, induce substanțiale cantități a celor două izoforme STAT heterodimerizate.

Pe de altă parte, se constată asocierea esențială a STAT-3 cu fiecare izoformă STAT 5, sugerându-se că citokinele IL-2 și IL-7 induc asamblarea acestor heterodimeri, într-o manieră similară conform căreia răspunsurile celulare ulterioare pot fi conduse prin inducția seturilor de gene similare (36).

IL-7 și epiteliul intestinal

Linfocitele intestinale umane, în special cele intracelulare, proliferază slab sub acțiunea mitogenilor și a stimulilor căii CD23. Totuși, atât limfocitele intracelulare cât și ale laminei proprii proliferază mai intens sub acțiunea IL-7 decât a IL-9 sau IL-12, care amplifică și stimularea pe calca CD23. Răspunsul proliferativ al limfocitelor intestinale la IL-7 nu necesită preactivarea și poate amplifica creșterea in vivo (37).

Calea de semnalizare IL-7/IL-7R joacă un rol important în sistemul imunitar al mucoaselor. Astfel, celulele epiteliale ale colonului s-au infectat cu *Salmonella typhimurium* sau cu *E.coli* enteropatogen, invazia bacteriană acționând limfocitele T CD8+ prin expresia IL-7. Inhibiția invaziei bacteriene s-a făcut cu citochalasin D, un inhibitor specific al polimerizării actinei, care conduce la reducerea expresiei IL-7R. De aici concluzia că, invazia bacteriană determină celulele epiteliale intestinale să elaboreze IL-7.

Legătura dintre limfocitele mucoasei intestinale și epitelii este mediată de IL-7 și IL-7R, sistem ce poate fi implicat în modularea inflamației mucoasei în infecția bacteriană (38). Pierderea genei specifice IL-7 determină o totală deficiență în inițierea limfocitelor T delta/gamma cu implicata absență a mesajelor specifice genelor V7-gamma și V4-gamma din epiteliul tractusului gastrointestinal. Cu toate acestea, mRNA ambelor gene este detectat în subșetul limfocitelor intracelulare intestinale gamma/delta ale șoarecilor IL-7(-/-). Diferențele dintre șoarecii IL-7(-/-) și IL-7R(-/-) sugerează că, deși IL-7 controlează dominant dezvoltarea și/sau extinderea limfocitelor gamma/delta din epiteliul intestinal, alți liganzi pot juca un rol similar.

Linfocitele alpha/beta se dezvoltă mai lent la șoarecii ce dețin IL-7R. Compararea șoarecilor IL-7(-/-) și IL-7R(-/-) susține ipoteza că aceste două proteine leagă molecule

ce pot influența limfocitele T delta/gamma din epiteliiul intestinal (39). S-a demonstrat că celulele epiteliiului intestinal produc IL-7 care servește ca un factor reglator pentru proliferarea limfocitelor mucoasei intestinale, pentru care dețin receptori .

Șoarecii transgenici care exprimă cDNA mL-7 condus prin promotorul SR-alpha dezvoltă colite cronice ale mucoasei colonului, ei relevând creșterea expresiei IL-7R în limfocitele acesteia, sugerându-se că inflamația cronică a mucoasei poate fi mediată prin dereglarea IL-7 determinată de celulele epiteliale ale colonului. Acest model poate servi la elucidarea patogenzei bolii intestinale inflamatorii umane (40).

Interleukina-7 și virusurile

În anumite etape ale activității sistemului imunitar, IL-7 intervine determinant, în unele cazuri deficiența ei depășind-o pe a IL-2. La șoarecii infectați cu virusul herpes simplex-1 (HSV-1), rhIL-7 modifică activitatea CTL in vivo. Injectarea a 200 IU de IL-7 și limfocite T imune la HSV-1 reduce de 20 ori cantitatea de virus, comparativ cu terapia numai cu celule T imune la HSV-1. Combinația limfocite T+IL-2 determină o reducere a cantității de virus, de 7 ori față de terapia numai cu celule T imunizate. IL-7 modifică efectele anti-HSV-1 ale limfocitelor T prin inducerea creșterii celulelor CD8+ CTL, ceea ce se constată și în cazul interleukinei-2 (41).

Un vector din virusul Vaccinia recombinat cu mL-7, introdus la șoarecii infectați elaborează IL-7 care induce creșterea dramatică a celulelor splenice, sporind activitatea proliferativă a limfocitelor T și capacitatea acestora de a secreta IL-2 și IL-6, dar nu IFN-gamma, TNF-alpha sau IL-4. IL-7 poate modula, de asemenea, procesele imunologice prin amplificarea răspunsului celulelor citotoxice antivirale splenice NK și LAK(celule killer activate de limfokine), reacții semnificativ mărite în comparație cu ale animalelor infectate exclusiv cu virus. Creșterea activității imunitare antivirale mediată de de IL-7 este dependentă de IL-2 produsă de celula gazdă (42).

La subiecții infectați cu HIV-1, IL-7 și CD23 sinergizează în inducerea activării limfocitelor T care proliferază în sistemele stimulate de mitogeni și antigeni, generând CTL specifice anti-virus. IL-7 și CD23 pot acționa direct pe celulele CD8+ cărora le crește citotoxicitatea independent de IL-2 și de interleukina-12. Stimulând limfocitele T CD8+ exclusiv cu IL-7, se constată că aceasta nu induce nivele detectabile de IFN-gamma, dar combinată cu CD23 amplifică producția acestuia. Se concludde astfel că, IL-7 și CD23 pot exercita efecte reglatoare majore pentru dezvoltarea CTL umane inducând atât proliferarea cât și diferențierea celulară.

Adiția IL-7 și CD23 solubil la celulele CD4+ ale pacienților infectați cu HIV-1 duce la creșterea celulelor TCR-alpha, dar adăugate separat nu determină creșterea expresiei limfocitelor TCR alpha/beta. În concluzie, combinația IL-7+CD23 solubil induce proliferarea limfocitelor T CD4+ activate, la subiecții infectați cu HIV-1 (43,44).

Vaccinarea cu rgp160 sau rgp120 reversează restricția in vitro cu recunoașterea în proporție de 81% a genei env. PBMC de la subiecți infectați cu HIV-1 și vaccinați, de la recipienti placebo și de la voluntari seronegativi, s-au cultivat cu IL-7 sau IL-12 laolaltă cu toxoidul tetanos(TT) sau cu gp160. S-a constatat că IL-7 crește semnificativ răspunsul

proliferativ al TT și gp160, în timp ce IL-12 afectează numai proliferarea indusă de gp160. De asemenea, IL-12 are efect semnificativ asupra răspunsului specific rgp160, la subiecții seronegativi.

În apariția imunității celulare restrictată la env, IL-7 și IL-12 relevă activitate diferențiată; efectul IL-7 este predominant la cei expuși primar antigenului. Modificările în răspunsul proliferativ in vitro, restrictat la env prin vaccinare sau citokine, sugerează că strategiile care utilizează IL-7 sau IL-12 ca adjuvanți, pot susține selectiv reactivarea celulelor la virus (45).

IL-7 și cancerul

Tumorile colorectale secretă in vitro IL-7, detectat prin ELISA. Detectarea expresiei mRNA IL-7 în aceste tumori, în mucoasa normală adiacentă tumorii, și pe de altă parte, abilitatea țesutului canceros de a secreta IL-7 ridică întrebări despre interacțiunile acestui tip de celule canceroase (46).

Linii de celule tumorale din cancerele: mamar, pancreatic sau pulmonar, ca și câteva linii celulare de cancere hematopoietice sunt negative atât pentru mRNA IL-7 cât și pentru proteina IL-7.

În terapia imunologică a melanomului malign s-a folosit transfecția genei care codifică hIL-7, obținându-se producerea a 850pg/ml de IL-7 biologic activ per 10^6 celule în 24 ore. Expresia HLA cl. I și II, a ICAM-1 și a antigenului asociat melanomului, rămâne nealterată. Transfecția cu IL-7 nu are efect semnificativ asupra proliferării celulelor melanomului, celulele transfectate din cultura de tumoră primară fiind înalt sensibile la efectorii imunologici, comparativ cu celulele netransfectate. Acest aspect este valabil atât pentru celulele alogene cât și autologe ale melanomului. Reiese astfel că, transferul genei care codifică hIL-7 în celulele melanomului primar uman diferă de transducția retrovirală. Celulele transfectate IL-7 ar putea avea valoare în protocolul de vaccinare a pacienților cu melanom (47).

Linfocitele T periferice au fost stimulate cu mitogen și IL-2 și subcultivate 7 zile cu IL-7 și/sau CD23 solubil ; această combinație sinergică amplifică proliferarea limfocitelor T CD4+ și CD8+. Limfocitele T CD8+ sunt mai sensibile și răspund mai susținut decât limfocitele T CD4+. IL-7 amplifică sinergic activitatea CTL a celulelor T CD8+ în limfocitele T activate de mitogen și antigen și pentru că le induce nivele detectabile de IFN-gamma se apreciază că activitatea de stimulare sinergică a IL-7 și CD23 solubil, poate fi semnificativă în dezvoltarea CTL umane oferind o cale pentru eficientizarea imunoterapiei (48).

1. Namen AE. Lupton S. Hierrild K. Wignall J. Macchiyuki D. Schmierer A. Mosley B. March CJ. Urdal D. Gillis S. Cosman D. Goodwin RG. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature*, 1998, 323, 6173571-573.
2. Webb LM. Foxwell BM. Feldman GR. Interleukin-7 activates human naive CD4+ cells and primes for interleukin-4 production. *European Journal of Immunology*, 1997, 27 (3), 633-40.
3. Macurer MJ. Lotze MT. Interleukin-7 (IL-7) knockout mice. Implications for lymphopoiesis and organ-specific immunity. *International Review of Immunology*, 1998, 16 (3-4), 309-22.

4. Fratazzi C. Carini C. Interleukin-7 modulates intracytoplasmatic CD23 production and induces adhesion molecule expression and adhesiveness in activated CD4+ CD23+ T cell subsets. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1996, 81 (3), 261-70.
5. Fratazzi C. Carini C. A new role for interleukin-7 in the induction of LFA-1 and VLA-4 adhesion molecules in Phorbol-12-myristate-13 acetate activated CD4+ CD23+ T cell subset. *Clinical and Experimental Allergy*. 1997, 27 (11), 1335-43.
6. Fratazzi C. Carini C. Interleukin-7 modulates CD23 on PHA-DR expression on CD4+ T cells and promotes a Th-2 type cytokine profile. *Allergologia et Immunopathologia*, 1997, 25 (4), 189-98.
7. Fukui T. Katamura K. Abe N. Kiyomasu T. Iio S. Veno H. Mayumi M. Furusho K. IL-7 induces proliferation, variable cytokine-producing ability and IL-2 responsiveness in naïve CD4+ T-cells from human cord blood. *Immunology Letters*, 1997, 59 (1), 21-8.
8. Rich BE. Autocrine expression of interleukin-7 rescues lymphoid expansion in interleukin-7 deficient mice. *Immunology*, 1997, 92 (3), 374-80.
9. Leite-de-Moraes MC. Herbelin A. Gombert JM. Vicari A. Papiernik M. Dy M. Requirement of IL-7 for IL-4 producing of MHC class I-selected CD4- CD8-TCR alpha/beta thymocytes. *International Immunology*, 1997,9.(1),73-9..
10. Su DM. Wang J. Lin Q. Cooper MD. Watanabe T. Interferons alpha/beta inhibit IL-inhibit IL-7-induced proliferation of CD4-, CD8-, CD3-, CD44+, CD23+ thymocytes, but do not inhibit that of CD4-, CD8-, CD3-, CD44-, CD25 - thymocytes. *Immunology*, 1997, 90(4), 543-9.
11. von Freesen-Jeffrey U. Solvason N. Howard M. Murray R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity*, 1997, 7(1), 147-54.
12. Varas A. Vicente A. Jimenez E. Alonso L. Moseno J. Munoz JJ. Zapata AG. Interleukin-7 treatment promotes the differentiation pathway of T-cell-receptor-alpha beta cells selectively to the CD8+ cell lineage. *Immunology*, 1997, 92(4), 457-64.
13. McKenna SD. Chen F. Lai L. Goldschneider I. Identification of an IL-7 associated pre-pro-B cell growth-stimulating factor (PPBSF). I. Production of the non-IL-7 component by bone marrow stromal cells from IL-7 gene-deleted mice. *J.of Immunology*, 1998, 160(5), 2272-9.
14. Lai L. Chen F. McKenna S. Goldschneider I. Identification of an IL-7 associated pre-pro-B cell growth-stimulating factor (PPBSF). II. PPBSF is covalently linked heterodimer of IL-7 and a Mr30,000 cofactor. *J.of Immunology*, 1998, 160(5).2280-6.
15. Jeannin P. Delnester Y. Lecoanet-Henchoz S. Gretner D. Bonnefoy JY. Interleukin-7 (IL-7) enhances class switching to Ig E and IgG4 in the presence of T cells via IL-9 and sCD23. *Blood*, 1998, 91(1), 1355-61.
16. Miyaura C. Onoe Y. Inada M. Maki K. Ikuta K. Ito M. Suda T. Increased B-lymphopoiesis by interleukin-7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(17), 9360-5.
17. Stephan RP. Lill-Elghanian DA. Witte PL. Development of B cells in aged mice: decline in the ability of pro-B cells to respond to IL-7 but not to other growth factors. *J.of Immunology*, 1997, 158(4), 1598-609.
18. Stephan RP. Reilly PR. Witte PL. Impaired ability of bone marrow stromal cells to support B-lymphopoiesis with age. *Blood*, 1998, 91(1), 75-88.
19. Mertsching E. Meyer V. Linares J. Lombard Platat S. Ceredig R. Interleukin-7, a non-redundant potent cytokine whose over expression massively perturbs B-lymphocytes. *International Review of Immunology*, 1998, 16(3-4), 285-308.
20. Girard D. Beaulieu AD. Absence of the IL-7 receptor component CDw127 indicates that gamma c expression alone is insufficient for IL-7 to modulate human neutrophil responses. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1997, 83(3), 264-71.
21. Shi YF. Hill M. Novak A. Chen ZQ. Wang RX. Liew CC. Mills GB. Human hematopoietic cell express two forms of the cytokine receptor common -chain (gamma c). *Cell Research*, 1997, 7(2),
22. He YW. Nakajima H. Leonard WJ. Adkins B. Malek TR. The common gamma-chain of cytokine receptors regulates intrathymic T cell development at multiple stages. *J.of Immunology*, 1997, 158(6), 2592-9.

23. Page TH. Lali FV. Groome N. Foxwell EM. Association of the common gamma-chain with the human IL-7 receptor is modulated by T cell activation. *Journal of Immunology*, 1997, 158(12), 5227.
24. Scloff RS. Wang TG. Dempsey D. Jennings SR. Wolcott RM. Chervenec R. Interleukin-7 induces TCR gamma rearrangement in adult marrow-resident murine precursor T cells. *Molecular Immunology*, 1997, 34(6), 453-62.
25. Perumal NB. Kenniston TWJr. Tweardy DJ. Dyer KF. Hoffman R. Peschon J. Appassamy PM. TCR-gamma genes are rearranged but not transcribed in IL-7R alpha-deficient mice. *Journal of Immunology*, 1997, 5744-50.
26. Candeias S. Peschon J. Muege K. Durum SK. Defective T-cell receptor gamma gene rearrangement in interleukin-7 receptor knockout mice. *Immunology Letters* 1997, 57(1-3), 9-15.
27. Malissen M. Pereira P. Guber DJ. Malissen B. DiSanto JP. The common cytokine receptor gamma chain controls survival of gamma/delta T cells. *J.of Experimental Medicine*, 1997, 186(8), 1277-85.
28. Lai SY. Molden J. Goldsmith MA. Shares gamma (c) subunit within the human interleukin-7 receptor complex. A molecular basis for the pathogenesis of X-linked severe combined immunodeficiency. *J. of Clinical Investigation*, 99 (2), 169- 177.
29. Plum J. De Smedt H. Leclarcq G. Verhasselt B. Vandekerckhove Interleukin-7 is a critical growth factor in early human T-cell development. *Blood*, 1996, 4239-45.
30. Adachi S. Yoshida H. Honda K. Maki K. Saijo K. Kuta K. Saito T. Nishikawa SI. Essential role of IL-7 receptor alpha in the formation of Peyer's patch anlage. *International Immunology*, 1998, 10(1), 1- 6.
31. Crompton T. Outram SV. Buckland J. Owen Mj. A transgenic T cell receptor restores thymocyte differentiation in interleukin-7 receptor alpha-chain- deficient mice. *European Journal of Immunology*, 1997, 27(1), 100-4.
32. He YW. Halek TR. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta+ T cells, but not natural killer cells. *Journal of experimental Medicine*, 1996, 184(1), 289-93.
33. Safford MG. Levenstein M. Tsifrina E. Amin S. Hawkins AL. Griffin CA. Civin CI. Small D. JAK3; expression and mapping to chromosome. *Experimental Hematology*, 1997, 25(5), 374-86.
34. Sharfe N. Reifman CM. Differential association of phosphatidylinositol 3-kinase with insulin receptor substrate (IRS)-1 and (IRS)-2 in human thymocytes in response to IL-7. *Journal of Immunology*, 1997, 159(3), 1107.
35. Thomas DC. Berg LJ. Peripheral expression of Jak3 is required to maintain T lymphocyte function. *Journal of Experimental Medicine*, 1997, 185(2), 197-206.
36. Rosenthal LA. Winestock KD. Finbloom DS. IL-2 and IL-7 induce heterodimerization of STAT-5 isoforms in human peripheral blood T lymphoblasts. *Cellular Immunology*, 1997, 181(2), 172-181.
37. Bilenker M. Roberts AL. Brolin RE. Ebert EC. Interleukin-7 activates intestinal lymphocytes. *Digestive Diseases and Sciences*. 1995, 40(8), 1744-9.
38. Yamada K. Shimaoka M. Nagayama K. Hiroi T. Kiyono H. Honda T. Bacterial invasion induces interleukin-7 receptor expression in colonic epithelial cell line T84. *European Journal of Immunology*, 1997, 27(12), 3456-60.
39. Fujihashi K. McGhee JR. Yamamoto M. Peschon JJ. Kiyono H. An interleukin- internet for intestinal intraepithelial T cell development; knockout of ligand or receptor reveal differences in the immunodeficient state. *European Journal of immunology*, 1997, 27(9), 2133-8.
40. Watanabe M. Ueno Y. Yajima T. Okamoto S. Hayashi T. Yamazaki M. Iwao Y. Ishii H. Habu S. Vehira M. Nihimoto H. Ishikawa H. Hata J. Hibi T. Interleukin-transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin-7 protein accumulation in the colonic mucosa. *Journal of Experimental Medicine*, 1998, 389-402.
41. Wiryana P. Beri T. Faltynek CR. Ho RJ. Augmentation of cell-mediated immunotherapy against herpes simplex virus by interleukins; comparison of in vivo effects of IL-2 and IL-7 on adaptively transferred T cells. *Vaccine*, 1997, 561-3.
42. Leong KH. Ramshow IA. Ramsay AJ. Interleukin-7 enhances cell-mediated immune responses in vivo in an interleukin-2-dependent manner. *Virol. Immunology*, 1997, 10(1), 1-9.

43. Fratazzi C. Guerriero M. Carini C. Interleukin-7 and sCD23 synergize in the induction of human T cell activation in HIV-1-infected subjects. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1997, 114(2), 120-9.
44. Carini C. Guerriero M. Fratazzi C. Modulation of TCR usage in HIV-1 infection is regulated by IL-7 and sCD23; *Allergologia et Immunopathologia*, 25(5), 238-46.
45. Kim JH. Loveland JE. Sitz KV. Ratto Kim S. Mclinden RJ. Tencer IL. Davis Burke DS. Boswell RN. Redfield RR. Birx AKL. Expansion of restricted cellular immune responses to HIV-1 envelope by vaccination ; IL-7 and IL- differentially augment cellular proliferative responses to HIV-1. *Clinical and Experimental Immunology*, 1997, 108(2), 243-250.
46. Maeurer MJ. Walter W. Martin D. Zitvogel L. Elder E. Storkus W. Lotze MT. Interleukin-7(IL-7) in colorectal cancer; IL-7 is produced by tissues from colorectal cancer and promotes preferential expansion of tumour infiltrating lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1997, 45(2), 182-93.
47. Finke S. Trojaneck B. Moller P. Schadendorf D. Neubauer A. Huhn D. Schmidt-Wolf IG. Increase of cytotoxic sensitivity of primary human melanoma cell transfected with the interleukin-7 gene to autologous and allogeneic immunologic effector cells. *Cancer Gene Therapy*, 1997, 4(4), 260-8.
48. Fratazzi C. Avvisati C. Guerriero M. Carini C. Regulation of human cytotoxic T lymphocytes development by synergistic effect of the IL-7 and sCD23. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1998, 86(1), 34-44.

INTERLEUKINA-9 (IL-9)

IL-9 a fost identificată inițial, ca factor de creștere a limfocitelor T și activator al mastocitelor. Van Suick (1989) a clonat-o la șoareci și a numit-o P40, iar în același an, Yang a izolat IL-9 umană prin stabilirea abilității ei de a stimula linia megacarioblastică. IL-9 murină și umană dețin fiecare, câte 144 reziduuri de aminoacizi incluzând un peptid semnal de 18 aminoacizi.

IL-9 umană obținută din linia C5MJ2 de celule T transformate de HTLV-I este de 20-30kD și induce creșterea liniei MO7 de megacariocite leucemice. IL-9 matură are 30-40kD datorită adăugării carbohidraților. Secvențele de 431 nucleotide codifică proteina de 144 aminoacizi cu greutatea moleculară de 16kD. Astfel, discrepanța în greutatea moleculară a IL-9 matură, rezultă din N-glicozilarea reziduurilor de asparagină 32, 45, 60 și 96.

cDNA IL-9 murin este format din 432 nucleotide care codifică proteina de 144 reziduuri de aminoacizi. Clivajul peptidului semnal hidrofob de 18 aminoacizi, conduce la secvența matură IL-9 murină de 126 reziduuri aminoacizi cu greutatea moleculară 14kD. Glicozilarea reziduurilor asparaginei din pozițiile 32, 60, 83, și 96, modifică molecula citokinei.

Gena IL-9 umană este localizată pe cromosomul 5 într-o regiune deletată în cazul anemiei refractare și este asociată cu genele IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 și GM-CSF. Se presupune că aceste gene se exprimă coordonat (1). Gena IL-9 murină este localizată pe cromosomul 13 și spre deosebire de dispoziția genelor umane menționate, la murine sunt localizate pe cromosomul 11.

În regiunea 5' necodificantă a genei IL-9 murină și umană, potențial există locuri de reglare a transcrierii la care se cuplează AP1, AP2, AP3, AP5, IRF-1 și NF-kB. Cele câteva ripituri în mRNA din regiunea 3' necodificantă a genei IL-9 umană ar contribui la reglarea posttranscripțională a nivelelor IL-9 (2).

Cooperarea diferiților factori de transcriere este esențială pentru exprimarea în limfocitele T a genei IL-9. S-a demonstrat că, cel puțin parțial, în celulele leucemice C5MJ2 transformate de HTLV-I, expresia genei IL-9 este controlată în activitatea transcripțională. Se precizează că, în regiunea 5' reglatoare a genei IL-9, situsul pentru cuplarea lui AP-1 se etalează de la -146 la -140, loc implicat în expresia genei. Situsul

NF- κ B de la -59 la -50 și secvența adiacentă de 20pb din amonte, joacă un rol critic în activitatea promotor a IL-9. Mutațiile în aceste locusuri abolesc activitatea promotor a cDNA IL-9 (3).

IL-9 murină și umană au omologii de 56% la nivelul aminoacizilor și de 67% la nivelul nucleotidelor. Se apreciază prezența unui înalt grad de conservare a structurilor terțiare prin secvențele constitutive ce conțin 10 reziduuri de cisteină dispuse în poziții identice.

Receptorul IL-9 (IL-9R)

Complexul IL-9R constă dintr-un ligand specific, lanțul alpha, și un lanț IL-2R gamma. Lanțul hIL-9Ralpha deține în domeniul citoplasmatic, două regiuni importante pentru creșterea celulelor mediată de IL-9. Regiunea proximală membranară Box-1 constă din secvențe consens și este necesară pentru proliferarea celulară indusă de IL-9 și pentru fosforilarea la tirozină a kinazelor Janus (Jak). Deleția acestei regiuni abrogă proliferarea celulelor și astfel, transducția semnalului. Substituția lui Pro-x-Pro în Box-1 cu Ala-x-Ala anulează abolirea proliferării, dar scade fosforilarea la tirozină mediată de IL-9, a kinazei Jak. Regiunea aval de Box-1 este, de asemenea, importantă deoarece deține un motif de cuplare Stat3. Deleția acestei regiuni afectează semnificativ creșterea celulelor indusă de IL-9 (4).

S-a demonstrat că gena IL-9R este localizată în regiunea brațului lung pseudoautosomală a cromosomilor Xq și Yq în vecinătatea telomerului și că cele 4 pseudogene IL-9R sunt localizate pe 9q34, 10p15, 16p13 și 18p11,3 care rezultă în urma translocăției pe parcursul evoluției (5,6). Gena IL-9R este formată din 11 exoni și 10 introni estinși pe 17kb. Regiunea 5' relevă multiple locuri de inițiere a transcrierii, ca și potențiale locuri de cuplare pentru AP1, 2, 3, Sp1 și NF- κ B, dar este lipsită de box TATA.

Omologii IL-9R sunt localizați pe cromosomii 9, 10, 16 și 18 și sunt similari în proporție de 90% cu gena IL-9R, dar nici unul nu codifică un receptor funcțional și nu deține secvențe omoloage cu regiunea 5' sau cu exonul 1 al genei. Lanțul IL-2R gamma din receptorul complex funcțional IL-9, reprezintă a treia subunitate a IL-2R gamma c, comună pentru IL-2, IL-4, IL-7 și IL-15, iar disfuncția acestuia determină apariția SCID-X care afectează dezvoltarea timpurie a limfocitelor T. Anticorpul monoclonal TUGm2 anti-gamma c, inhibă intens proliferarea celulelor indusă de interleukina-9. Lanțul gamma c este inclus în complexul receptor funcțional pentru IL-9 și este esențial pentru transducția semnalului dependent de IL-9 (7).

S-a construit cu gena neomicin-fosfotransferazei (Neo) un vector retroviral pLhIL-9RSN care conține cDNA ce codifică hIL-9R. Gena IL-9R s-a transdus într-o populație sortată de celule CD3+ și CD33+ din sângele cordonului ombilical uman care este bogat în celule progenitoare critroide (BFU-E) și s-a constatat că aceste celule formează sensibil colonii la stimularea cu doze scăzute de IL-9 și Epo. Prin urmare, gena hIL-9 funcțională, poate fi eficient transdusă în progenitori hematopoietici din sângele cordonului ombilical, cu formarea de colonii critroide dependente de citokine, folosind vectori retrovirali (8).

Introducerea în culturi de celule hematopoietice înalt purificate din sângele cordonului ombilical uman, a vectorilor retrovirali ce conțin genele hEpoR și hIL-9R, duce la apariția unui număr crescut de progenitori eritroizi, care, de asemenea, răspund la citokine; astfel, proliferarea progenitorilor liniilor eritroide este amplificată prin transducția acestor două gene (9).

Semnalizarea IL-9 prin Jak-Stat

IL-9 poate stimula proliferarea liniei leucemice MO7E de megacariocite umane, poate induce fosforilarea la tirozină și activează membrii familiei tirozinkinazelor Jak1, Jak3 și Tyk2. Activarea apare într-un minut, atinge maximum în 5-10 minute și persistă cel puțin 45 minute. Transducția semnalului activează proteinele de 88kD și Stat91 care sunt rapid fosforilate la tratarea cu IL-9. Interleukina poate fi parțial mediată prin cascada de semnalizare Jak-Stat (10,11).

Pentru elucidarea la nivel molecular a proliferării induse de IL-9 a diferitelor linii celulare hematopoietice, s-a testat linia MO7E dependentă de factori umani. IL-9 duce la o rapidă și tranzitorie creștere a genelor răspunsului primar jun-B și c-myc. Ea amplifică expresia genei c-myc care este complet inhibată la nivelul inițierii transcrierii, de herbicin A și genistein (12).

IL-9 induce fosforilarea la tirozină a IRS-1 (Insulin Receptor Substrat) via tirozinkinazei Jak. Spre deosebire de majoritatea citokinelor hematopoietice, dar similar cu IL-4, IL-9 induce fosforilarea la tirozină a proteinei de 170kD, care este legată de IRS-1. Induce, de asemenea, fosforilarea la tirozină a Stat3 și din acest punct de vedere diferă de IL-4 care are ca țintă fosforilarea la tirozină a Stat6 (13).

În urma fosforilării tirozinei 116 din hIL-9R, a kinazei Jak1 din celulele pro-B Ba/F3 și din celulele limfomului BW5147, sunt activate proteinele Stat3 și Stat5 cu potențial antiapoptotic și răspuns proliferativ (14).

IL-9 și unele tipuri celulare

IL-9 este implicată în răspunsul mastocitelor cărora le induce proliferarea și diferențierea, dar și în imunitatea ce protejează gazda în infecția intestinală cu Nematode. Astfel, infectarea șoarecilor cu nematodul intestinal *Trichinella spiralis* este asociată cu o marcată mastocitoză, eozinofilie și nivel seric crescut de IgE. Mastocitele din mucoasa intestinală sunt implicate în expulzarea parazitului din gazdă, prezența infecției determinând hiperproducția de IL-9, citokină de tip Th2 și în consecință, o intensă mastocitoză cu nivel seric înalt de protează-1. După infectare apar titruri înalte de IgG1 specifice parazitului și un răspuns crescut al mastocitelor, asociat cu rapida expulzare a parazitului din intestin (15).

Mastocitele, macrofagele și granulocitele sunt componente ale sistemului de apărare al gazdei contra viermilor paraziți *Schistosoma mansoni cercariae*. În timpul fazei acute a reacției granulomatoase, numărul mastocitelor și GM-CSF formatoare de colonii crește semnificativ în măduva osoasă. Numărul crescut de mastocite este însoțit de

concentrații crescute de IL-9 în mediul condiționat de celule splenice, iar numărul crescut de granulocite și macrofage se corelează cu nivelul înalt al IL-3. În ficatul și splina șoarecilor infectați, s-a constatat expresia amplificată a transcriptelor IL-9 și IL-3 (16).

Mastocitele sunt efectori ai răspunsului inflamator, eliberând mediatori biologici potențiali, atât cele apărute de novo cât și cele din rezervele preformate. Pretratarea mastocitelor 10P2 cu 25ng/ml IL-9 potențează semnificativ (cu 51,1%) celulele pentru a elibera mediatori. Tratarea celulelor timp de 72 ore cu 1-100ng/ml SCF duce la amplificarea semnificativă a proliferării acestora, care însă nu apare la aceeași doză de IL-9 (17).

IL-9 singur nu inițiază formarea coloniilor celulare, dar susține proliferarea și supraviețuirea stadiilor timpurii de BFU-E (progenitori eritroizi timpurii). În plus, unele linii de limfocite T stabilizate, cuplează IL-9, iar clonele CTL specific tumorale răspund la acțiunea acestei citokine.

Descrisă inițial ca factor de creștere a limfocitelor T, rolul interleukinei-9 este încă neclar și aceasta deoarece celulele T normale proaspăt izolate, nu răspund la acțiunea acestei citokine, care în schimb, induce proliferarea in vitro a limfocitelor T din limfoamele murine, iar hiperexprimată in vivo, duce la apariția limfoamelor timice. Se sugerează că, pe cale autocrină se pot iniția unele malignități umane precum boala Hodgkin. Alte ținte biologice potențiale pentru IL-9 sunt și limfocitele B (18,19).

Protecția contra apoptozei timocitelor murine BW5147, s-a obținut cu IL-4 și mai puțin cu IL-6, iar IL-2, IL-7 și IL-10 sunt ineficiente. În prezența dexametazonei, IL-4 și IL-9 mențin proliferarea acestor celule. Analiza a 8 linii de limfom timic relevă protecție semnificativă indusă de IL-9, în 7 din cele 8 linii celulare. IL-2 este un inductor mai puternic al proliferării celulare, în timp ce IL-9 este mai eficient în protecția celulelor contra apoptozei (20).

Analiza producției de citokine de către subseturile de limfocite T arată că IL-4, IL-9 și IL-10 sunt secretate numai de limfocitele T CD45 Ro+, iar secreția de IL-9 este asigurată de o cascadă de citokine care răspund de expresia IL-9. IL-2 este important pentru producerea de IL-4, iar combinația IL-2+IL-4 este importantă pentru producerea de IL-10. Combinația IL-4+IL-10 este necesară producției de IL-9 (21).

IL-9, citokină tip Th2, induce creșterea independentă de antigeni a unor clone Th de șoarece. În prezența ei sunt preferențial exprimate 3 gene: gena pentru granzym A și granzym B, două proteaze exprimate în limfocitele T activate (IL-9 induce gena granzym B și în mastocite), și gena cDNA care codifică IgER-alpha de înaltă afinitate. Anumite clone de limfocite exprimă mRNA IgER și pot cupla cu înaltă afinitate IgE. De aici concluzia că, IL-9 poate induce un fenotip mastocit-like în clonele de limfocite T (22).

IL-9 și cancerul

hIL-9 stimulează proliferarea celulelor hematopoietice eritroide primitive și progenitoare pluripotente, ca și creșterea liniilor mieloid selectate, dependente de CSF. Are abilitatea de a forma colonii din liniile celulare HL60, K562 și KG1, ca și din populațiile de celule leucemice AML proaspete. Stimulează 36,8% din CFU-L (Colony Forming Unit-Leukemie) induse de PHA-LCM (Phytohemaglutinina-Lymphocytic

Conditioned Medium) și se dovedește cel mai eficient CSF în comparație cu SCF, IL-3 și GM-CSF. În majoritatea cazurilor, IL-9 singură în concentrații optime, testată pe probe de celule AML, conduce la creșterea semnificativă a numărului de celule leucemice în faza S. Combinată cu SCF, duce la scăderea numărului celulelor aflate în faza Go și induce creșterea celor aflate în fazele G1 și S.

IL-9 are abilitatea de a induce, în condițiile prezenței sau absenței scrului, formarea coloniilor de celule leucemice în 3 linii mieloide. Acest efect este complet abrogat de anticorpii monoclonali anti-IL-9. În liniile celulare studiate și în probele de AML nu s-a detectat expresia mRNA IL-9, de unde concluzia că aceasta poate juca un rol în dezvoltarea leucemiei mieloide acute, prin stimularea proliferării celulelor leucemice, probabil, prin acțiune paracrină. IL-9+SCF duc la creșterea celulelor aflate în fazele G1 și S, dar sunt ineficiente pe inducția sau prevenirea apoptozei celulelor leucemice (23, 24).

Testarea expresiei mRNA IL-9 și răspunsul proliferativ indus de citokină în 5 linii de limfocite T infectate cu HTLV-I și în celulele leucemice primare din sângele a 8 pacienți cu ATL (Adult T-cell Leukemia) a demonstrat că 4 din cele 5 linii exprimă mRNA IL-9 necorelat cu expresia tax. rIL-9 amplifică creșterea numai la una din cele 5 linii de limfocite T infectate cu HTLV-I și la una din liniile leucemice. De aici concluzia implicării reduse a IL-9 în proliferarea celulelor ATL în cele două cazuri menționate (25).

Activarea cis-trans a genei IL-9R în linia celulară limfatică umană MT-2 transformată cu HTLV-I, linie care deține multiple copii ale provirusului integrat, inclusiv genoamele defective, arată că, prin LTR, provirusul se integrează într-un intron al genei IL-9R amonte de primul exon codificant al acesteia, situație în care LTR integrat are rol promotorial. Analiza mRNA himeric HTLV-I IL-9R presupune posibilitatea multiplicării interacțiunilor IL-9/IL-9R și HTLV-I. În acest mod se face activarea cis-trans a genei IL-9R în celulele limfatice umane transformate de HTLV-I (26).

hIL-9R ar putea fi o țintă pentru imunoterapia selectivă: receptorul se exprimă pe o varietate de celule maligne printre care cele din limfomul Hodgkin, din limfoamele nehodgkiniene, dar și pe celule din AML. rhIL-9-ETA, o toxină himerică obținută prin fuziunea hIL-9+endotoxina A din *Pseudomonas aeruginosa* (ETA) manifestă un marcat potențial antitumoral pentru liniile: L-540Cy, KM-H2 și L1236 de limfom Hodgkin, Daudi de limfom Burkitt, K562 de eritroleucemie și P815-hIL-9R de mastocitom. Efectul citotoxic este diferit, el putând inhiba până la 50% unele din aceste linii tumorale, ceea ce sugerează eventuala lor folosire în terapia acestor malignități care exprimă hIL-9R. Acest efect poate fi abrogat cu anticorpi policlonali anti-hIL-9R, rhIL-9-ETA (27).

La un pacient cu anemie refractară sideroblastică s-a detectat translocarea cromosomală t(5;16)(q31;p11,2), dar poate fi implicată și ruperea genei la acest nivel. În malignitățile mieloide se întâlnește, de asemenea, ruperea genei 5q sau deleția ei (28). În anemia Diamond-Blackfan (DBA) are loc aplazia hematiilor, probabil moștenită, deși în majoritatea cazurilor aceasta apare spontan. Se presupune că boala s-ar datora unor factori de creștere eritroidi precum Epo, EPO-R, SCF sau IL-3, care adăugați culturilor, induc o creștere semnificativă a progenitorilor medulari obținuți de la pacient. Analiza via segregării genei IL-9 la 22 familii cu DBA, folosind un microsatelit polimorf localizat în intronul 4, arată implicarea genei IL-9 în această afecțiune (29).

Astmul este o perturbare complexă inflamatorie moștenită a căilor respiratorii asociată cu semne clinice de atopie și hiperactivitate bronșică. Pe cromosomul 5 (q31-q33) s-a localizat o genă majoră responsabilă de astm, genă care de fapt este gena pentru IL-9 și care astfel reprezintă un factor de risc pentru această afecțiune (30). Se sugerează că siturile de pe acest cromosom sunt legate de apariția bolii în copilărie.

Din clinicile japoneze de boli alergice s-au analizat 306 membrii aparținând la 68 familii, constatându-se legătura dintre astm și genele marker IL-4 și IL-9. Se subliniază faptul că atopia sau astmul nu sunt legate de gena receptorului de înaltă afinitate pentru IgE, prezent pe cromosomul 11q13 (31).

Interleukina-9 aplicată în regiunea hipotalamusului anterior- aria preoptică- în care acționează citokinele IL-1, IL-2, IL-6 și IL-11 care sunt implicate în inducerea febrei, demonstrează rolul ei direct în apariția fazei termogene acute. Totuși, IL-9 poate folosi un cofactor pentru a determina apariția unui răspuns febril (32).

IL-9 contracarează activitatea inhibitorie a unor factori care acționează asupra progenitorilor hematopoietici primitivi de la om. Astfel, TGF-beta3 este un potent inhibitor al acestora, și adăugat la o cultură de celule CD34+ care conține IL-9, IL-11 și SCF duce la inhibarea cu peste 86% a formării de colonii. Într-o cultură celulară în care acționează IL-11, dacă este adăugat TGF-beta3, IL-9 scade activitatea supresoare a acestuia. Interleukina inhibă, de asemenea marcat, celulele CD34+ timpurii mai curând decât pe cele mature. În concluzie, IL-9 și IL-11 contracarează activitatea inhibitorie a TGF-beta3 asupra progenitorilor hematopoietici primitivi (33).

Interleukina -9 în maladii în care are rol de factor de creștere autocrin, este de evitat în terapie. Blocarea expresiei atât a IL-9 cât și a IL-9R cu oligonucleotide antisens se pare că ar stopa creșterea celulelor Hodgkin și Reed-Sternberg.

Implicarea IL-9 în dezvoltarea tumorilor liniilor de limfocite T este sugerată și de faptul că, după 6 luni de cultură în prezența citokinei, aceste linii devin IL-9 dependente și transplantate la șoareci dobândește o activitate crescută pentru tumorigeneză.

1. Koyano-Nakagawa N. Arai K. Specific versus cooperative regulatory mechanisms of the cytokine genes that are clustered on the same chromosome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1996, 98(6 Pt.2), 174-82.
2. Quesniaux VEJ. Interleukins 9,10,11,12 and kit ligand; a brief overview. *Res.Immunol.*, 1992, 143, 385-400
3. Zhu YX. Kang LY. Luo W. Li CCH. Yang L. Yang YC. Multiple transcription factors are required for activation of human interleukin 9 gene in T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (26), 15815-22.
4. Zhu YX. Sun HB. Tsang ML. McMahan J. Grigsby S. Yin T. Yang YC. Critical cytoplasmic domains of human interleukin-9 receptor alpha chain in interleukin-9-mediated cell proliferation and signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (34), 21334-40.
5. Kermouni A. van Roost E. Arden KC. Vermeesch JR. Weiss S. Godelaire D. Flint J. Lurquin C. Szikora JP. Higgs DR. et al. The IL-9 receptor gene (IL-9R) : genomic structure, chromosomal localization in the pseudoautosomal region of the long arm of the sex chromosomes, and identification of IL-9R pseudogenes at 9qter, 10pter, 16pter, and 8pter. *Genomics*, 1995, 29 (2), 371-82.

6. Vermeesch JR. Petit P. Kermouni A. Renauld JC. Van Den Berghe H. Marynen P. The IL-9 receptor gene, located with Xq/Yq pseudoautosomal region, has an autosomal origin, escapes X inactivation and is expressed from the Y. *Human Molecular Genetics*, 1997, 6(1), 1-8.
7. Kimura Y. Takeshita T. Kondo H. Ishii N. Nakamura M. Van Snick J. Sugamura. Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex. *International Immunology*, 1995, 7(1), 115-20.
8. Xiao M. Yang YC. Yang L. Chang MS. Cornetta K. Broxmeyer HE. Lu L. Transduction of human interleukin-9 receptor gene into human cord blood erythroid progenitors increases the number of erythropoietin-dependent erythroid colonies. *Bone Marrow Transplantation*, 1996, 18 (6), 1103-9.
9. Lu L. Ge Y. Liz H. Xiao M. Broxmeyer HE. Influence of retroviral-mediated gene transduction of both the recombinant human erythropoietin receptor and interleukin - 9 receptor gene into single CD34+ + CD33- or low cord blood cells on cytokine-stimulated erythroid colony formation. *Experimental Hematology*, 1996, 24 (2), 347-51.
10. Yin T. Yang L. Yang YC. Tyrosine phosphorylation and activation of JAK family tyrosine kinases by interleukin-9 in MO7E cells. *Blood*, 1995, 85 (11), 3101-6.
11. Johnston JA. Bacon CM. Riedy MC. O'Shea JJ. Signaling by IL-2 and related cytokines: JAKs, STATs, and relationship to immunodeficiency. *Journal of Leucocyte Biology*, 1996, 60 (4), 441-52.
12. Kang LY. Yang YC. Activation of jun-B and c-myc primary response genes by interleukin-9 in a human factor-dependent cell line. *Journal of Cellular Physiology*, 1995, 163 (3), 623-30.
13. Yin T. Keller SR. Quelle FW. Witthuhn BA. Tsang ML. Lienhard GE. Ihle JN. Yang YC. Interleukin-9 induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 via JAK tyrosine kinases. *Journal of Biochemical Chemistry*, 1995, 270 (35), 20497-502.
14. Demoulin D. Uyttenhove C. Van Roost E. Delestre B. Doneckers D. Van Snick J. Renauld JC. A single tyrosine of the interleukin-9 (IL-9) receptor is required for STAT activation, antiapoptotic activity, and growth regulation by IL-9. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16 (9), 4710-6.
15. Faulkner H. Humphreys N. Renauld JC. van Snick J. Grencis R. Interleukin-9 is involved in host protective immunity to intestinal nematode infection. *European Journal of Immunology*, 1997, 27 (10), 2536-40.
16. Khalil RM. Luz A. Mailhammer R. Moeller J. Mohamed AA. Omran S. Darmer Hultner L. *Schistosoma mansoni* infection in mice augments the capacity for interleukin-3 (IL-3) and IL-9 production and concurrently enlarges progenitor pools for mast cells and granulocytes-macrophages. *Infection and Immunity*, 1996, 64 (12), 4960-6.
17. Allen-Gipson DS. Chen M. Herman AS. Regulation of 10P2 murine mast cell proliferation and secretory function by stem cell factor or IL-9. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1998, 217 (4), 439-44.
18. Demoulin JB. Renauld JC. Interleukin-9 and its receptor: an overview of structure and function. *International Reviews of Immunology*, 1998, 16 (3-4), 345-64.
19. Renauld JC. Kermouni A. Vink A. Louhed J. Van Snick J. Interleukin-9 and its receptor: involvement in mast cell differentiation and T cell oncogenesis. *Journal of Leucocyte Biology*, 1995, 57 (3), 353-60.
20. Renauld JC. Vink A. Louhed J. van Snick J. Interleukin-9 is a major anti-apoptotic factor for thymic lymphomas. *Blood*, 1995, 85 (5), 1300-5.
21. Houssian FA. Schandene L. Stevens M. Cambiaso C. Goldman M. van Snick J. Renauld JC. A cascade of cytokines is responsible for IL-9 expression in human T cells. *Journal of Immunology*, 1995, 154 (6), 2624-34.
22. Louhed J. Kermouni A. Van Snick J. Renauld JC. IL-9 induces expression of granzymes and high-affinity IgE receptor in murine T helper clones. *Journal of Immunology*, 1995, 154 (10), 5061-70.
23. Lemoli RM. Fortuna A. Tafuri A. Fogli M. Amabile M. Grande A. Ricciardi MR. Petrucci MT. Bonsi L. Bagnara G. Visani G. Martinelli G. Ferrari S. Tura S. Interleukin-9 stimulates the proliferation of human myeloid leukemic cells. *Blood*, 1996, 87 (91), 3852-9.
24. Lemoli RH. Fortuna A. Tafuri A. Grande A. Amabile M. Martinelli G. Ferrari S. Tura S. Interleukin-9 in human myeloid leukemia cells. *Leukemia and Lymphoma*, 1997, 26 (5-6), 563-73.

25. Matsushita K. Arima N. Ohtsubo H. Fujiwara H. Fukumori J. Tanaka H. Frequent expression of interleukin-9 in RNA and infrequent involvement of interleukin-9 in proliferation of primary adult T-cell leukemic cells and HTLV-I infected T-cell lines. *Leukemia Research*, 1997, 21 (3), 211-6.
26. Kubota S. Siomi H. Hatanaka M. Pomcrantz RJ. Cis/trans-activation of the interleukin-9 receptor gene in an HTLV-I-transformed human lymphocytic cell. *Oncogene*, 1996, 12 (7), 1441-7.
27. Klimka A. Barth S. Drillich S. Wels W. van Snick J. Renauld JC. Tesch H. Bohlen H. Diehl V. Engert A. A deletion mutant of Pseudomonas exotoxin-A fused to recombinant human interleukin-9 (rhIL-9) - ETA shows specific cytotoxicity against IL-9 receptor-expressing cell lines. *Cytokines and Molecular Therapy*, 1996, 2 (3), 139-46.
28. van Soest RA. Bolk MW. Kluck PM. Janssen B. van Kessel AG. Wessels R. Landegent JE. Sublocalization of the breakpoints of a t(5;16) in myelodysplasia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1998, 100 (5-9).
29. Dianzani I. Garelli E. Crescenzo N. Timcus F. Mori PG. Varotto S. Nobili B. Brandalise S. Olivieri NF. Gabutti V. Ramenghi U. Diamond-Blackfan anemia: expansion of erythroid progenitors in vitro by IL-9, but exclusion of a significant pathogenetic role for the IL-9 gene and hematopoietic gene cluster on chromosome 5q. *Experimental Hematology*, 1997, 25 (12), 1279-7.
30. Nicolaides NC. Holroyd KJ. Ewart SL. Eleff SM. Kiser MB. Drawa CR. Sullivan CD. Grasso L. Thang LY. Messler CJ. Zhou T. Kleberger SR. Buetow KH. Levitt RC. Interleukin-9; a candidate gene for asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 1997, 94 (24), 13175-80.
31. Noguchi E. Shibasaki M. Arimami T. Takeda K. Maki T. Miyamoto T. Kawashima T. Kobayashi K. Hamaguchi H. Evidence for linkage between asthma/atopy in childhood and chromosome 5q31-q33 in Japanese population. *American Journal of Respiratory and Clinical Care Medicine*, 1997, 156 (5), 1390-3.
32. Lopez-Valpiesta EJ. Myers RP. Cytokines and thermoregulation: interleukin-9 injected in preoptic area fails to evoke fever in rats. *Brain Research Bulletin*, 1995, 36 (2), 181-4.
33. Lemoli RM. Fogle M. Fortuna A. Tura S. Interleukin-11(IL-11) and IL-9 counteract the inhibitory activity of transforming growth factor beta3 (TGF- beta3) on human progenitor cells. *Haematologia*, 1995, 80 (1), 5-12.

INTERLEUKINA-15 (IL-15)

Interleukina-15 este o citokină cu activități biologice similare cu ale citokinei IL-2, deși nu are secvențe omoloage cu ale acesteia. Similaritățile funcționale ale celor două citokine constau în activarea limfocitelor T și B și stimularea proliferării acestora. IL-15 stimulează, de asemenea, monocitele ca și fibrele musculare diferențiate, cărora le determină acumularea unor cantități importante de proteine contractile.

Este un chemoattractant pentru limfocitele T umane din sângele periferic. Spre deosebire de IL-2, IL-15 este exprimată abundent într-o mare varietate de celule precum fibroblastele, celulele epiteliale și monocitele, în care mRNA IL-15 este mai abundent decât în limfocitele T. De asemenea, se detectează în plămâni, ficatul și rinichii de om.

IL-15 este o glicoproteină de 14-15 kD (SDS-PAGE) identificată pentru prima dată în supernatantul culturii liniei celulare epiteliale renale de simieni (CV1/EBNA), pe baza abilității ei de a stimula proliferarea liniei celulare T murine CTLL-2.

IL-15 umană a fost clonată din linia celulară stromală IMTLH, relevând 97% identitate cu proteina simiană. Secvența genomică a hIL-15 este de 14.968pb lungime și include 6 exoni ce codifică proteina și 5 introni. cDNA IL-15 uman conține o regiune 5' necodificantă de 316 pb și una 3' de 400 pb. Gena IL-15 este cartată în cromosomul 4 (q 25-35) având o lungime de cel puțin 32 kb (1).

Glicoproteina IL-15 este formată dintr-un precursor polipeptidic de 162 aminoacizi cu o secvență lider de 48 aminoacizi, precursor ce va fi clivat pentru a forma proteina matură. Deși secvențele formate din reziduurile aminoacizilor componenți ai IL-15 și IL-2 nu au similarități, structura secundară predicată a IL-15 arată 4 domenii helix-like, structură caracteristică pentru familia de citokine helicale.

Similaritățile funcționale ale celor două citokine sunt determinate principalmente, de folosirea în comun a unei subunități a receptorului, care declanșează semnalizarea intracelulară. IL-15 stimulează proliferarea celulelor CTL și a blastelor activate cu PHA în aceeași măsură ca IL-2. Ea induce in vitro, generarea celulelor efectoare citotoxice. Poate stimula proliferarea limfocitelor B cocultivate cu anticorpi anti-IgM sau cu ligandul CD40. Induce secreția de IgM, IgG și IgA într-o manieră similară cu IL-2.

IL-15 derivată din celulele dendritice umane are activitate chemoattractantă și chemocinetică pentru celulele T, fiind considerată și un mitogen al acestora (2).

Receptorul IL-15 (IL-15R)

Așa cum s-a menționat, similaritățile funcționale ale citokinelor IL-15 și IL-2 de a acționa diferitele sisteme celulare, se datorază folosirii în comun a unor lanțuri proteinice din receptori. IL-15 interacționează cu un receptor heterotrimeric ce constă din două subunități (β și γ) ale IL-2R și dintr-o subunitate ce cuplează IL-15 cu înaltă afinitate, IL-15R α . Primele două subunități sunt necesare pentru semnalizarea fie a IL-2, fie a IL-15, ceea ce determină activități comune in vitro (3).

Înainte de a prezenta date despre receptorul IL-15, reamintim structura receptorului IL-2, care este format din 3 proteine: lanțul alpha (p55), lanțul beta (p75) și lanțul gamma (p64). Lanțurile beta și gamma sunt ale familiei receptorilor hematopoietici și sunt necesare în internalizarea ligandului și în transducția semnalului. Lanțul alpha al receptorului IL-2 nu este implicat în cuplarea IL-15; pentru aceasta sunt necesare numai lanțurile beta și gamma IL-2R. Se concludă că, IL-15 interacționează cu un receptor heterotrimeric ce constă din subunitățile beta și gamma ale IL-2R și dintr-o subunitate specifică ce cuplează IL-15 cu înaltă afinitate.

Nu surprinde faptul că aceste citokine relevă un număr de similarități in vitro. Totuși, expresia diferențiată a lor și a lanțurilor alpha din receptorii lor în diferite țesuturi și tipuri celulare, sugerează că IL-2 și IL-15 pot avea, cel puțin parțial, funcții fiziologice distincte. Astfel, producția de IL-15 de către macrofage, ca răspuns la stimuli din mediu și la agenți infecțioși, sugerează că interleukina joacă un rol în răspunsul imunitar protector, în rejecția alogrefelor și în patogenia bolilor imune (3).

În celulele pigmentare retiniene fetale de la om există transcripse pentru cele 3 componente ale IL-15R α , IL-2R β și IL-2R γ . Celulele pigmentare produc IL-15 care poate juca un rol important în răspunsul imun și inflamator, prin stimularea limfocitelor T infiltrate (4).

IL-15 reglează proliferarea limfocitelor B și a celulelor NK activate și stimulate cu chemoattractanți, efecte inhibitate de anticorpi anti-IL-2R β . Citokina induce fosforilarea pe tirozina subunității IL-2R β (p75) și a subunității IL-2R γ (p64) (5). Inhibarea cu anticorpi anti-p75 și anti-p64 IL-2R stopează stimularea proliferării și activitatea citotoxică a limfocitelor din boala proliferativă a limfocitelor granulare (LDGL), în timp ce tratarea cu anticorpi anti-p55 IL-2R nu are efect inhibitor asupra activității citokinei IL-15. Deci, limfocitele granulare CD3+ și CD3- sunt stimulate de IL-15, activitatea acestora fiind mediată de lanțul IL-2R γ (6).

IL-15 induce proliferarea celulelor din sângele uman, dacă acestea corespund lanțurilor IL-15R α , IL-2R β și IL-2R γ . Dacă însă, se blochează IL-15R α cu hexametazonă, IL-15 acționează slab asupra mononuclearelor, iar IL-2 nu este afectat. Se concludă că, în ciuda similarităților structurale și funcționale dintre lanțurile IL-2R α și IL-15R α , cel din urmă este indispensabil pentru cuplarea IL-15.

Reglarea expresiei IL-15R α poate reprezenta o nouă țintă pentru intervenția farmacologică direcționată pe limfocitele T (7). Lanțul IL-15R α care cuplează IL-15 este astfel parte a receptorului acestuia, prezent pe clona T și similar cu IL-2R α , dar totuși distinct de acesta.

Expresia mRNA al subunității IL-15R α este diferită de mRNA IL-2R α . Expresia formei solubile (s) recombinată a IL-15R α arată că aceasta este un potent inhibitor al activatorului biologic IL-15 (7,8).

Proliferarea mastocitelor declanșată de IL-15 se face în absența IL-2Ralpha și beta și nu implică subunitatea gamma (c). Cross-linking-ul mastocitelor cu IL-15(1^{15}) relevă o proteină de cuplare de 60-65 kD distinctă de componentele cunoscute ale IL-15R de pe limfocitele T. IL-15R al mastocitelor recrutează Jak2 și Stat5, în loc de Jak 1/3 și Stat 3/5 care sunt activate în celulele T. Astfel, IL-15 este un factor de creștere a mastocitelor, care utilizează un nou receptor și o cale de semnalizare distinctă (9).

IL-15 are 4 domenii helix și activitate biologică similară cu IL-2 datorită interacțiunii cu lanțurile IL-2Rbeta și gamma. Se poate astfel afirma că, IL-2R și IL-15R dețin subunitățile IL-2Rbeta/gamma, esențiale pentru transducția semnalului. Pentru înalta afinitate a IL-2, IL-2R reclamă o subunitate α specifică, așa cum și IL-15 murin soliciță o subunitate α specifică înrudită cu IL-2Ralpha. Comparativ, s-a stabilit că IL-15alpha murin, singur, cuplează IL-15 de o mie de ori mai mult decât o face IL-2Ralpha cu IL-2.

La om s-au izolat 3 variante de IL-15alpha care pot cupla IL-15 cu înaltă afinitate. Domeniul citoplasmatic al IL-15alpha, ca și al IL-2Ralpha este dispensabil pentru semnalizarea mitogenică, sugerându-se numai rolul primordial al lanțului alpha, de a conferi înaltă afinitate de cuplare. Totuși, la o concentrație mare, IL-15 ca și IL-2 poate semnaliza printr-un complex IL-2Rbeta/ gamma, în absența subunității alpha.

Genele IL-15RA și IL-2RA au organizare similară intron-exon și sunt intim legate în genomul uman și murin. Cu toate acestea, distribuția IL-15Ralpha este mult mai largă decât a IL-2Ralpha sugerându-se astfel un larg spectru de ținte celulare pentru IL-15 (10). Deci, pentru bioactivitatea interleukinei-15 pe linia de celule T murine sunt necesare componentele beta și gamma din IL-2R, dar nu și lanțul alpha al acestui receptor, iar pentru cuplarea sa, necesită subunitatea alpha a IL-15R.

IL-2 și IL-15 au multe activități biologice asemănătoare, ca o consecință a utilizării lanțurilor beta și gamma ale IL-2R. Fiecare citokină cuplează însă, la un lanț alpha specific al receptorilor. Diferențele dintre interacțiunea IL-2R și IL-15R contribuie la diferențele lor funcționale (11,12). În concentrații diferite și depinzând de timp, IL-15 determină eliberarea sIL-2R alpha din PBMC activate de PHA. Blocarea lanțului IL-2Ralpha cu anticorpi, previne eliberarea sIL-2Ralpha de către IL-15, dar nu de către IL-2.

IL-7, altă citokină ce utilizează lanțul gamma al IL-2R duce, de asemenea, la eliberarea sIL-2Ralpha deoarece, în anumite cazuri clinice se constată nivele serice anormale de sIL-2Ralpha. IL-15 și IL-2 sunt astfel considerate potente inductoare de eliberare a sIL-2Ralpha in vitro (13). IL-15 ca și IL-2, IL-4 și IL-7 utilizează în comun subunitățile beta și gamma ale IL-2R pentru transmiterea semnalului (14,15). Pentru a înțelege bazele moleculare ale redundanței și pleotropiei citokinelor s-au comparat reacțiile proteinelor Stat din limfocitele sângelui periferic, la acțiunea citokinelor. Astfel, IL-2 activează rapid Stat5 în limfocite, iar Stat3 și Stat5, în limfocitele preactivate. IL-7 și IL-15 induc aceleași complexe ca IL-4, fapt explicabil prin implicarea IL-4R. Deci, o singură citokină în diferite condiții fiziologice poate activa diferite combinații ale proteinelor Stat, astfel încât sunt considerate două mecanisme prin care citokina poate activa aceeași proteină Stat (16).

În concluzie, IL-15 este un membru al familiei citokinelor cu 4 domenii helix și care in vitro relevă activitate biologică IL-2-like. Ea utilizează lanțurile beta și gamma ale IL-2R care sunt esențiale pentru transducția semnalului.

Lanțul IL-15Ralpha murin arată o afinitate de cuplare cu IL-15, echivalentă cu a IL-2R heterotrimeric pentru IL-2. IL-15Ralpha este o structură similară cu IL-2R alpha definind împreună o nouă familie de citokine. Distribuția mRNA IL-15 și IL-15Ralpha arată că IL-15 are activitate biologică distinctă de IL-2 (17,18).

IL-15 și NK (Natural Killer)

Celulele ucigașe (NK) provin din celulele medulare CD3+, CD16+ și din limfocitele granulare mari. Celulele stromale ale măduvei osoase umane exprimă transcripți de IL-15, iar din supernatantul culturilor acestora se izolează citokina.

In vitro CD3, CD56, și NK pot fi obținute în culturi de progenitori hematopoietici CD34 în absența IL-2, a celulelor stromale și a altor citokine. Adiția ligandului c-kit în aceste culturi nu induce diferențierea celulelor citotoxice din cele CD3- CD56+, dar amplifică considerabil expansiunea lor.

IL-15 poate fi un ligand fiziologic relevant pentru diferențierea NK in vitro (19,20). IL-15R are efecte proliferative asupra subsetului de celule NK umane CD56 care poate fi abrogat de anticorpi anti-IL-2Rbeta (p75), dar nu de anticorpi anti-CD25 (p25). Activarea NK CD56 de către rIL-15 este similară cu cea indusă de rIL-2, ceea ce se demonstrează prin activitatea citotoxică NK, dar și prin producția de IFN gamma, GM-CSF și TNFalpha. Efectul citotoxic al NK, amplificat de rIL-15, se poate complet bloca cu anticorpi anti-IL-2Rbeta.

Celulele NK umane activate nu par să producă IL-15, dar rIL-15 este un ligand care activează NK umane prin componentul IL-2R, într-un model care nu este identic cu acela impus de rIL-2 (21).

IL-15R induce efect proliferativ asupra populațiilor de celule NK subsetul CD56 bright, care exprimă constitutiv înaltă afinitate pentru IL-2R prezent pe aceste celule. Efectul proliferativ al IL-15 poate fi blocat cu anticorpi anti-IL-2Rbeta (p75), dar nu cu anticorpi anti-IL-2Ralpha (p55) (22).

Celulele NK care provin din limfocitele mari granulare exprimă, de asemenea constitutiv IL-2R. Așa cum s-a menționat, rhIL-15 folosește IL-2R activând NK umane și poate sinergiza cu rhIL-12 pentru stimularea producției in vitro de către NK a IFNgamma. În mononuclearele umane, LPS declanșează o importantă producție de IL-15 în 5 ore. În câteva modele experimentale s-a demonstrat o producție mare de IL-15 de către mononucleare, în prezența infecțiilor microbiene.

IL-15 endogen activează celulele NK prin intermediul IL-2R, iar în combinație cu IL-12 endogen reglează producția de IFNgamma de către NK, după activarea mononuclearelor cu LPS. Se sugerează un important rol al IL-15 în răspunsul imunitar înăscut, deoarece citokina este un important ligand la IL-2R NK in vivo (23). La șoareci tratați cu anticorpi anti-IL-2beta, celulele NK izolate nu mai răspund la IL-2.

Pentru dezvoltarea și supraviețuirea celulelor NK in vivo, este implicată subunitatea IL-15Ralpha care cooperează cu IL-2Rbeta/gamma (c) pentru transducția semnalului intracelular la concentrație picomolară de IL-15. Celulele NK umane inactive exprimă mRNA IL-15Ralpha și cu adăugarea de IL-15 supraviețuiesc până la 8 zile, proces nesustținut de TNFalpha, IL-1beta, IL-10, IL-12 și nici de citokinele care folosesc lanțul gamma c pentru semnalizarea citokinelor IL-4, IL-7, IL-9 și IL-13.

Un mecanism prin care IL-15 inițiază supraviețuirea celulelor NK poate implica menținerea expresiei proteinei Bel-2 (24). Prin cuplarea la IL-2Rbeta și gamma, IL-15 stimulează multiple funcții ale NK care inițial au fost atribuite numai interleukinei-2. IL-15 induce activitatea NK în timpul răspunsului imun, înaintea activării limfocitelor T și ulterior producerii de IL-2 (25).

Printre timocitele postnatale imature există precursori care din suspensii de timocite pot forma celule NK fenotipic și funcțional mature. IL-15 stimulează expresia R-CD94/NK G2A, dar nu și a altor NK (26).

IL-15 și IL-2 afectează diferit diferențierea progenitorilor bipotenți T/NK. Celulele liniei fetale de celule timice (FTOC) în cultură, care dețin IL-2Rbeta+TCR sunt progenitori bipotenți T/NK cărora dacă li se administrează IL-15 în concentrații mici conduc la o creștere a acestei subpopulații de celule. Din contră, concentrațiile mici de IL-2 nu induc creșterea aceluiași fenotip celular (27).

Celulele NK sunt caracterizate prin abilitatea de a media citotoxicitatea spontană contra celulelor tumorale susceptibile și a celulelor infectate. IL-15 reglează activitatea antitumorală prin intermediul citotoxicității celulelor NK și a producției de IFNgamma de către acestea. Se apreciază că 10ng/ml de IL-15 este concentrația optimă pentru citotoxicitatea maximă a NK contra țintelor K562. IL-15 singur sau combinat cu IL-12 poate și respectiv pot amplifica citotoxicitatea antitumorală a celulelor NK (28).

Pacienții cu SCIDX-1 (Severe Combined Immunodeficiency X-linked) au mutații în gena gamma c a receptorului citokinelor, ceea ce duce la absența limfocitelor T și a celulelor NK. IL-15 ca și IL-2 deține în receptorul său subunitatea gamma c.

În diferențierea celulelor NK s-au studiat citokinele IL-15, IL-2 și IL-7 pe celulele sângelui cordonului ombilical, constatându-se maturarea celulelor NK prin proliferarea celor CD34+ și CD7+; astfel s-a demonstrat că, și IL-15 poate juca un rol important în maturarea celulelor NK din progenitori.

Lanțul gamma (c) transduce semnale majore implicate în diferențierea celulelor NK din progenitori hematopoietici. Interacțiunea IL-15 cu acest lanț este implicată într-o etapă timpurie, față de reacția lui IL-2 și IL-7 cu această subunitate a receptorului. Transferul geni în progenitorii hematopoietici ar putea restaura potențialul diferențierii celulelor NK la pacienții cu SCIDX-1.

Mutația în lanțul gamma (c), comun receptorilor pentru IL-2, IL-4, IL-7 și IL-15 este responsabilă de deficiența prezentă la acești pacienți. Mutația trunchiază partea majoră a cozii citoplasmatică a lanțului gamma (c), care nu afectează cuplarea IL-2 cu înaltă afinitate, dar scade parțial endocitoza IL-2 și previne modularea lanțului beta al IL-2R, ca și fosforilarea pe tirozină a proteinei Jak3 ca răspuns la IL-2 (29,30).

IL-2, IL-7, și IL-15, ca și IL-4, stimulează rapid fosforilarea la tirozină a IRS-1 și IRS-2 în celulele NK din sângele periferic uman și din liniile limfoide. Cele două fosfoproteine majore sunt receptori pentru insulină și IL-4. Ele se asociază cu Jak1 și Jak3 și cu IRS-1 și IRS-2 din limfocitele T. Aceste kinaze pot fosforila pe tirozina IRS-2 sugerând un posibil mecanism prin care receptorul citokinelor poate induce fosforilarea pe tirozina lui IRS-1 și IRS-2. Se susține că IRS-1 și IRS-2 pot avea roluri importante în activarea limfocitelor T, nu numai ca răspuns la IL-4, dar și la IL-2, IL-7 și IL-15 (31).

Sinteza proteinei IL-15 crește ca răspuns la infecția cu HHV-6 (Human Herpes Virus-6), ca și tropismul marcat al virusului pentru celulele NK și T. Infecția PBMC cu HHV-6 duce la reglarea superioară a citotoxicității celulelor NK, care nu poate fi abrogată decât cu anticorpi monoclonali anti-IL-15.

În concluzie, se consideră că activitatea amplificată a celulelor NK ca răspuns la infecția virală, reprezintă un mecanism natural de apărare antivirală, ducând la eliminarea rapidă a celulelor infectate (32). IL-15 este un factor de maturare specific pentru celulele NK și poate mima micromediul medular in vitro (33).

IL-15 și diferite tipuri celulare

IL-15 induce creșterea limfocitelor T și B, asemenea lui IL-2. Intervine în diferențierea in vitro a blastelor T CD4+, în celule producătoare de IL-4 și IFN γ . IL-15 și IL-2 au un număr de proprietăți esențiale în diferențierea in vitro a celulelor care produc IL-4. Adăugul de doze mari de IL-15 în culturi celulare primare, duce la creșterea substanțială de IFN γ , iar în culturile cu adăug de IL-12 și IL-15 combinate, proliferările celulare sunt mai mari decât în cazul în care aceste citokine sunt administrate separat (34).

Ca răspuns la rIL-15, unele clone de limfocite T umane produc IL-5. mRNA IL-5 devenind detectabil la 3 ore după stimularea cu IL-15 și atinge maximum la 9 ore. Sinteza de IL-5 indusă de IL-15 este inhibată de herbimicina A, un inhibitor al tirozin kinazelor implicate în transducția semnalului și care duce la sinteza IL-5, ca și la proliferarea celulelor T indusă de IL-15 (35).

IL-15 poate recruta și activa limfocitele T în membrana sinovială, contribuind astfel la patogeneza artritei reumatoide. Într-un model murin, injectare rIL-15 induce un infiltrat inflamator local în care predomină celulele T care proliferază ca răspuns la IL-15 (36). IL-15 este un factor de creștere pentru limfocitele T gamma/delta murine induse de infecția cu Salmonella. Derivat din macrofagele infectate, IL-15 poate contribui la activarea timpurie a limfocitelor T gamma/delta în timpul salmonelozelor (37). Citokina este elaborată de mononucleare și relevă activitate similară cu IL-2, stimulând creșterea celulelor T activate, și costimulând limfocitele B pentru a prolifera și produce Ig. La concentrații optime induce rapid limfocitele T cu memorie (CD45 Ro+), CD4+ și CD8+ și limfocitele naive (38).

IL-15 induce redistribuirea receptorilor de adeziune pentru limfocitele T. Factorii chemotaxici precum citokinele și chemokinele direcționează migrarea leucocitelor în locurile inflamației. Chemokinele au rol reglator în expresia proprietăților adezive ale integrinelor leucocitare. IL-15 are proprietăți chemotaxice și induce formarea de uropode pe limfocitele T la care sunt redistribuite moleculele de adeziune intercelulară (ICAM-3).

Inducerea de către IL-15 a formării uropodelor este evidențiată pe limfoblastele T care aderă la liganzi precum fibronectina, VCAM-1 și ICAM-1. Uropodul indus de IL-15 este îmbogățit cu numeroși receptori de adeziune și fiind bine expus mediului extern, se pare că modulează proprietățile de adeziune ale limfocitelor (39). IL-15 facilitează citotoxicitatea mediată de limfocitele activate in vivo de IL-2, în limfomul Burkitt (Daudi) și în neuroblastomul LA-N-5 (40).

Keratinocitele HaCAT proaspăt izolate, dar și cele cultivate exprimă constitutiv mRNA IL-15, iar celulele Langerhans proaspăt izolate exprimă transcripți IL-15. Producția de IL-15 indusă de UV-B în keratinocite, poate contribui la o relativă stare imunosupresivă indusă prin expunerea la soare (41,42).

IL-15 se exprimă înalt și în mușchii scheletici. În concentrație de 10 sau 100 ng/ml, citokina crește de 25 ori acumularea lanțului greu al miozinei în miocitele C₂ de șoarece. Deci, IL-15 poate stimula miocitele diferențiate și fibrele musculare pentru a acumula cantități crescute de proteine contractile. Afectează astfel parametri asociați cu hipertrofia fibrei musculare scheletice sugerând posibilitatea de a fi un agent anabolic pentru creșterea masei musculare scheletice (43).

Genul IL-15 se exprimă la nivele scăzute în culturi de astrocite și microglia fetale umane, dar când acestea sunt tratate cu IL-1β, IFNγ sau TNFα crește nivelul atât al mRNA cât și al proteinei IL-15. Se apreciază că IL-15 produs de astrocitele și microgлия fetale umane pot interveni în imunitatea mediată de limfocitele T (44).

Celulele endoteliale umane separate din venele dermice și ombilicale, exprimă de asemenea, mRNA și proteina IL-15, proces amplificat de UV-B și UV-A (45).

În contrast cu IL-2, IL-15 induce importante schimbări în morfologia granulocitelor neutrofile. Sinteza de novo a RNA și a proteinelor este crescută în neutrofilele activate de IL-15 în timp ce IL-2 nu are acest efect. De asemenea, IL-15 întârzie, în funcție de doză, apoptoza neutrofilelor mai eficient decât IL-2; astfel, la 50 ng/ml, IL-15 întârzie apoptoza ca și GM-CSF. Neutrofilele dețin complexe specifice de IL-15R (46). Printre diversele proteine înalte reglate se remarcă proteina citoscheletică actina.

Celulele epiteliale intestinale de la șobolan și om răspund la IL-15 și exprimă mRNA IL-15; citokina stimulează proteinele Stat determinând proliferarea acestor celule, posibil integrându-le în sistemul imunitar intestinal (47).

IL-15 și cancerul

Celulele leucemice umane U937 au fost transfectate cu constructul 5X jun/AP-1 CAT. Au fost tratate 24 ore cu diferite doze de IL-15 pentru a fi testate prin exprimarea activității CAT. S-a constatat că, la 0,05 ng/ml, IL-15 determină stimularea maximă a activității CAT. De asemenea, măsurând nivelele mRNA ale genelor c-jun și c-fos în aceleași condiții, s-a constatat în 15 minute stimularea expresiei acestora de 3,2 ori și respectiv două ori; de aici ideea că, IL-15 este implicată în reglarea genelor cu reacție timpurie (48).

La doza de 0,2 ng/ml, IL-15 induce în progenitorii mononucleari U937, alterarea rapidă a fosforilării pe tirozina proteinelor Stat3, Ick și IL-2Rβ. S-a demonstrat că receptorii și tirozinazele acestor celule, participă la răspunsul timpuriu al semnalizării induse de IL-15 (49).

IL-15/IL-T este produs de celulele leucemice T linia Hut-102 induse de HTLV-I și reclamează subunitatea IL-2Rβ. Sinteza IL-15 de către celulele Hut-102 este foarte crescută (mRNA IL-15 este de 5-10 ori mai mult). Transcriptele IL-15 pot produce un mesaj de fuziune cu o componentă a HTLV-I de unde ideea că, IL-T este identică

cu IL-15. Mesajul predominant din celulele Hut-102 este un mRNA himeric care leagă pe de o parte, un segment al regiunii R al LTR-HTLV-I și pe de altă parte, regiunea netranslatată 5' (UTR) a IL-15.

Segmentul R introdus, elimină peste 200 nucleotide ale IL-15 5' UTR incluzând 8 din 10 AUG ce sunt prezente în mesajul IL-15 normal. Astfel, IL-15 sintetizat de linia Hut-102 implică o creștere de transcripție IL-15 (mRNA) și translație secundară pentru producția unui mesaj de fuziune HTLV-I-R lipsit de mulți AUG (50,51).

IL-15 determină creșterea celulelor leucemice la pacienții cu B-CCL (B-Cell Chronic Lymphoproliferativ). Celulele B-CCL proaspăt izolate sunt stimulate de IL-15, spre deosebire de limfocitele B normale care nu răspund acestei citokine; dacă sunt tratate în prealabil cu forbol miristat acetat, limfocitele B devin reactive. Având proprietăți biologice similare cu ale IL-2 în diferite sisteme celulare (îndeosebi pe celulele T și NK) IL-15 folosește componentele receptorului IL-2.

Celulele leucemice B-CCL de la pacienții cu afecțiuni limfoproliferative cronice poartă IL-2R și cresc ca răspuns la IL-2. De asemenea, IL-15 determină pe lângă proliferarea celulelor B-CCL și proliferarea celulelor HCL. IL-15 stimulează proliferarea celulelor leucemice B mai puternic decât atunci când acționează în combinație cu IL-2.

Analiza subunităților IL-2R (p55,p75,p64) de pe celulele leucemice prin blocarea cu anticorpi monoclonali, demonstrează că B-CCL și B-HCL exprimă lanțurile beta și gama ale IL-2R, lanțuri care pot fi folosite de IL-15. Se concluzionează că IL-15 prin receptorul IL-2R intervine în proliferarea neoplazică a celulelor leucemiei cronice (52).

IL-15 este produs de un larg spectru de tipuri celulare, cu nivele înalte de mRNA IL-15 în linii de celule epiteliale, mononucleare, miocite și placentare. Stimulează proliferarea limfocitelor B activate de anticorpi anti-IgM umană sau de forbol ester, dar nu are efect pe celulele B inactivate. În combinație cu CD40, IL-15 este un inductor al secreției policlonale de IgM, IgG1 și nu de IgG4 sau IgE. Proliferarea sau diferențierea limfocitelor B induse de IL-15 sunt comparabile cu ale IL-2. Din toate citokinele studiate, numai IL-15 are capacitatea de a înlocui IL-2, deși numai parțial (53).

IL-15 are un potențial pentru imunoterapia cancerului pulmonar acționând pe liniile celulare neoplazice prin activarea celulelor NK și a mononuclearelor din sângele periferic (MNC). Astfel, la concentrația de 10ng/ml, IL-15 crește semnificativ activitatea celulelor NK și a MNC contra liniilor de celule de cancer pulmonar SBC-3/Co și a celulelor Daudi. 50 ng/ml fiind concentrația optimă. Un interval de incubație de 4-6 zile este optim pentru creșterea activității ucigașe a acestor celule.

Activate cu IL-15, MNC exercită de asemenea, o activitate distructivă și asupra liniilor celulare de cancer pulmonar H-69, N-291 și PC-9. IL-2 nu are efect sinergic sau aditiv cu IL-15 în inducerea activității NK. IL-4 are efect supresiv în inducerea de către IL-15 a activității celulelor ucigașe. IFN γ , IL-1 β , TNF α , IL-6 sau IL-10 nu activează celulele ucigașe via IL-15 în concentrație optimă (54). Mai mult chiar, s-a constatat că însăși celulele tumorale pulmonare SCLC (Small Cell Lung Cancer) au capacitatea de a elabora IL-15.

Un transcript izoform generat prin splicing alternativ în celulele acestui tip de cancer, are un ORF mai scurt datorită stopării codonilor în exonul A. Proteina receptor IL-15 predicată, are un peptid semnal mai scurt, dar compoziția în

aminoacizii constitutivi este identică cu a proteinei IL-15 mature. Se sugerează un potențial rol funcțional al IL-15 în tumorile umane, rol care este diferit de al activității IL-2-like (55).

IL-15 este de 3-4 ori mai potentă decât IL-2 generând splenocite cu efect citolitic care lizează celulele țintă YAC. În supresia metastazelor pulmonare induse de MCA-205, IL-15 atinge jumătate din potențialul interleukinei-2, dar ar avea un indice terapeutic superior acesteia (56).

In vitro, activitatea CTL și LAK (Lymphokine Activated Killer) din PBMC sângelui periferic este indusă contra țintelor tumorale, de către IL-15 de la donori normali. PBMC izolate de la pacienți cu melanom metastazic, inoculate cu diferite doze de rhIL-15 au fost testate în funcție de timp și doză, contra celulelor tumorale autogene, liniile sensibile la LAK (FMEX și Daudi) și linia K 562 sensibilă la NK. S-a demonstrat că activitatea LAK se manifestă în PBMC pacienților cu melanom în prezența IL-15, pentru lizarea celulelor tumorale autologe în maniera nerestrictivă MHC. Astfel, IL-15 poate juca un rol important în imunitatea antitumorală cu o posibilă folosire în imunoterapia cancerului (57). Transcripte pentru IL-15 s-au detectat și în celulele melanomului. De aceea, această citokină se poate modifica în interesul tumorii.

Linii celulare de cancer uman de diferite histotipuri, exprimă două produse IL-15 amplificate: o bandă de 524pb corespunzând lui mRNA IL-15 și una de 643pb, corespunzând unui mRNA alternativ spliced și care include un exon alterantiv de 119 pb. Totuși, IL-15 nu este detectabil în supernatantul celulelor canceroase care exprimă una din izoformele de mRNA, deși poate fi detectat în unele celule tumorale (58,59).

Transcripte IL-15 au fost detectate în 9 din 9 tumori (3 sarcoame Ewing, 5 osteosarcoame și un rabdomiosarcom). Liniile de osteosarcom și rabdomiosarcom au mRNA IL-15 începând de la nivele joase până la nivele înalte și eliberează IL-15, în timp ce sarcomul Ewing nu eliberează citokina. Cea mai înaltă producție de IL-15 s-a detectat în liniile de rabdomiosarcom RH 30 și RD (60).

IL-15 poate potența activitatea limfocitelor izolate din sângele periferic și lichidul peritoneal de la pacienți cu cancer ovarian. Celulele tumorale ovariene alogene și autologe sunt lizate în 18 ore. Se sugerează că principalii autori sunt celulele ucigașe producătoare de limfokine (61).

IL-15 și HIV

Maturarea pre-CTL în efector CTL- virus-specific, depinde de limfocitele T mediate de IL-2 via IL-2R. PBL de la maimuța Rhesus infectată cu SIV (mac) sau de la pacienți infectați cu HIV, cocultivate cu un peptid epitop CTL și cu rIL-2 devin CTL. rIL-15 facilitează, de asemenea, activitatea CTL efector conducând expansiunea CTL-virus-specific ce apare în condițiile neutralizării cu IL-2. Deci, această maturare poate apare și independent de IL-2. Se sugerează astfel, că există un mecanism prin care CTL se pot extinde in vivo în absența IL-2 și a limfocitelor T-CD4+ funcționale (62).

Tratarea cu IL-15 a PBMC de la subiecți infectați cu HIV duce la o creștere a citotoxicității celulelor NK la nivele similare cu cele ale PBMC de la donori sănătoși. Efectul este independent de citokinele reglatoare și nu este prevenit de anticorpii ce neutralizează IFN, TNF, IL-2 sau IL-12.

IL-15 amplifică abilitatea proliferativă atât la control cât și la subiecții HIV-seropozitivi, ca răspuns la mitogeni și antigeni. Nu s-a stabilit o corelație între infecția cu HIV și producția de IL-15 in vitro, infecția virală neavând efect asupra abilității mononuclearelor de a produce IL-15 ca răspuns la prezența lui Staphilococcus aureus. Este astfel de reținut că, IL-15 ar avea un potent rol imunoreglator în infecția cu HIV (63,64).

IL-15 poate induce activitatea celulelor LAK la subiecți HIV-seropozitivi și poate stimula producția de IFN γ a PBMC. Nivelul p24 HIV este moderat scăzut în prezența a 10 ng/ml de IL-15, față de 10 ng/ml IL-2, dar este similar la 100 și 500 ng/ml pentru fiecare citokină în parte (65).

IL-15 produs de mononucleare/macrofage deși are activitate biologică similară cu IL-2, nu are omologii semnificative de secvențe. Stimulează limfocitele B umane pentru a prolifera și secreta Ig. În timpul infecției cu HIV se constată o creștere marcată a nivelelor ei serice, creștere corelată cu nivelele serice ale IgG și parțial IgM. Se sugerează că mononuclearele/macrofage pot fi o sursă de înalte nivele serice de IL-15 la subiecți infectați cu HIV și de aici ideea că, această citokină participă la apariția hiperglobulinemiei frecvent asociată acestei infecții (66).

IL-15 produsă de mononucleare/macrofage și de celule non-T au activitate biologică suprapusă cu a IL-2 și este implicată în rețeaua celulară locală pentru activarea și expresia T CD8+ într-un organ înalt afectat cum este plămânul. IL-15 induce proliferarea celulelor T din tractul respirator al pacienților infectați cu HIV.

Linfocitele T pulmonare sunt CD45RO+/CD8+ ce exprimă spontan activitatea markerilor (CD69 și HLA-DR), fiind echipate cu subunități receptoare IL-2R β și gamma și cu recent identificata proteină IL-15 α care cuplează IL-15. Macrofagele pulmonare exprimă, de asemenea, nivele înalte de IL-15 iar anticorpi anti-IL-15 inhibă funcția accesorie a macrofagelor alveolare asupra proliferării T CD8+ indusă de mitogeni. Deci, citokinele derivate din macrofagele produse la locurile infiltrării limfocitelor T, joacă un rol în activarea răspunsului imun mediat de limfocitele T CD8+ HIV-specifice (67).

Așa cum se știe, citokinele pot avea aplicații clinice în tratarea infecției cu HIV și de asemenea, ca vaccin adjuvant. IL-15 și IL-12 în doze de până la 10ng/ml au efect slab pe producția de p24 HIV în linia ACH-2 de limfocite T și în linia mononuclearelor U-1 infectate cronic cu HIV. Din contră, celulele infectate dar tratate în prealabil cu forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) determină o scădere a Ag.p24 HIV în celulele U-1, cu 16% în cazul interleukinei-12 și cu 15% în cazul interleukinei-15. Deci, IL-15 și IL-12 pot avea efecte diferite în infecția latentă și acută iar abilitatea lor de a amplifica sau reduce producția virusului poate depinde de activarea celulelor. Prin producția de Agp24 HIV, se poate stabili eficiența tratamentului combinat IL-15 + IL-12; în funcție de doză, producția p24 poate crește sau scade (68,69)

IL-15 amplifică proliferarea PBMC obținute de la pacienți HIV-1 seropozitivi și crește foarte rar proliferarea limfocitelor. Citokina intervine în corectarea răspunsului proliferativ afectat al CD4+ de la subiecții infectați cu HIV-1, dar fără efect mitogenic (70).

IL-15, IL-2 și receptorii lor, induce activitatea limfocitelor T în sarcoidoza pulmonară. Macrofagele din lavajul bronhiolar de la pacienți cu sarcoidoză activă, expun mRNA IL-15 și IL-15 pe membrană și în citoplasmă, spre deosebire de macrofagele de la martori, care nu dețin IL-15. Limfocitele T CD4+ pulmonare de la pacienții cu sarcoidoză dețin subunitățile IL-2Rbeta și gamma prin intermediul cărora acționează IL-15 determinând proliferarea limfocitelor T, proliferare comparabilă cu cea indusă de IL-2.

Adăusul gradat de IL-15 și IL-2 la limfocitele T din lavaj, duce la creșterea semnificativă a stimulării TNFalpha, care reglează răspunsul proliferativ mediat de IL-15. Blocarea lanțurilor IL-2Rbeta și gamma cu anticorpi monoclonali specifici, abolește activitatea stimulatorie a IL-15 (71).

Citokinele cu profil Th1 sunt mediatori importanți ai imunității protective a gazdei contra infecției șoarecilor cu *Toxoplasma gondii*. Administrarea de rIL-15 exogen cu Ag.solubil din lizat de *Toxoplasma gondii* (TLA) protejează complet efectul contra parazitului letal, în timp ce tratarea numai cu rIL-15 sau TLA nu are efect. După imunizarea cu TLA/rIL-15 are loc o semnificativă proliferare a splenocitelor ce expun fenotipul CD8+ și care răspund la TLA. La șoarecii vaccinați crește nivelul IFNgamma. Celulele T CD8+ au activitate CTL amplificată contra macrofagelor, ținte infectate cu *Toxoplasma gondii* (72).

1. Krause H. Jandrig B. Wernicke C. Bulfone-Paus Silvia. Pohl T. Diamantstei T., Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin-15 gene (IL-15). *Cytokine*. 1996, 8 (9), 667-674.
2. Jonuleit H. Weidemann K. Muller G. Degwert J. Hoppe U. Kuop J. Enk AH. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. *Journal of Immunology* 1997, 158 (6), 2610-5.
3. Kennedy MK. Park LS. Characterization of interleukin-15 (IL-15) and IL- receptor complex. *Journal of Clinical Immunology*, 1996, 16(3), 134-43.
4. Kumaki N. Anderson DM. Cosman D. Kumaki S. Expression of interleukin- and its receptor by human fetal retinal pigment epithelial cells. *Current Eye Research*, 1996, 15(8), 876-82.
5. Adunyah SE. Wheeler BJ. Cooper RS. Evidence for the involvement of LCK and MAP kinase (ERK-11) in the signal transduction mechanism of interleukin-15. *Biochem. And Biophys. Res. Commun.*, 1997, 232 (3), 754.
6. Zambello R. Facco M. Trentin L. Sancetta R. Tassinari C. Perin A. Milani Pizzolo G. Rodeghiero F. Agostini C. Meazza R. Farrini S. Semenzato Interleukin-15 triggers the proliferation and cytotoxicity of granular lymphocytes in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood*, 1997, 98 (1), 201-11.
7. Chae D.W. Nosaka Y. Strom TB. Malinski W. Distribution of IL-15Ralphachain on human peripheral blood mononuclear cells and effect of immunosuppressive drugs on receptor expression. *Journal of Immunology*, 157 (7), 2813-9.
8. Cosman D. et al. Interleukin-15 and its receptor. *Ciba Found Symp.*, 1995, 221-229.
9. Tagaya Y. Burton DJ. Miyamoto Y. Waldmann TA. Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. *EMBO Journal*, 1996, 15 (18), 4928- 39.
10. Anderson DM. Kumaki S. Ahdich M. Bertles J. Tometsko M. Loomis A. Giri J. Copeland NG. Gilberet DJ. Jenkins NA. Et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkaze of IL-15 RA and IL-2R genes. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (50), 29862-9.
11. Kumaki S. Armitage R. Ahdich M. Park L. Cosman D. Interleukin-15 up-regulates interleukin-2 receptor alpha chian but down-regulates its own high- affinity binding sites on human T and B cells. *Europ can Journal of Immunology*, 1996, 26 (6), 1235-9.

12. de Jong JL. Farner NL. Widmer MB. Giri JG. Sondel PM. Interaction of with the shared IL-2 receptor beta and gamma c subunits. The IL-15/beta/gamma c receptor ligand complex is less stable than the IL-12/beta/gamma c receptor-ligand complex. *Journal of Immunology*, 1996, (4), 1339-48.
13. Treiber-Held S. Stewart DM. Kurman CC. Nelson DL. IL-15 induces the release of soluble IL-2R alpha from human peripheral blood mononuclear cells. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1996, 79 (1), 71-8.
14. Giri JG. Anderson GM. Kumaki S. Park LS. Grabstein KH. Cosman D. IL-15: a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *Journal of Leucocyte Biology*, 1995, 57 (8), 763-6.
15. Giri JG. Ahdieh M. Eisenman J. Shanebeck K. Grabstein K. Kumaki S. Namen A. Park LS. Cosman D. Anderson D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO Journal*, 1994, 13 (12), 2822-30.
16. Lin JX. Migone TS. Tsang M. Friedmann M. Weatherbec JA. Zhon L. Yamanchi A. Bloom ET. Meietz J. John S. et. al. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13 and IL-15. *Immunity*, 1995, 2 (4), 473-82.
17. Cosman D. Kumaki S. Ahdieh M. Eisenman J. Grabstein KH. Paxton R. DuBase R. Friend DJ. Park LS. Anderson D. et. al. Interleukin-15 and its receptor. *Ciba Foundation Symposium*, 1995, 195, 221-9.
18. Giri JG. Kumaki S. Ahdieh M. Friend DJ. Loomis A. Shanebeck K. DuBase R. Cosman D. Park Ls. Anderson DM. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO Journal*, 1995, 14 (15), 3654-63.
19. Mrozek E. et. al. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 1996, 87 (7), 2632-2640.
20. Mrozek E. et al. Interleukin-15 induces CD56+ large lymphocytes from CD34+ progenitor cells (Meeting abstract). *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.*, 1996, 37: A 30, 98.
21. Carson WE. Et al. Interleukin-15 is a novel cytokine which activates human natural killer cells using components of interleukin-2 receptor (Meeting abstract). *Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 1994, 13: A 962.
22. Carson WE. Giri JG. Lindermann MJ. Linett ML. Ahdieh M. Paxton R. Anderson D. Eisenman J. Grabstein K. Caligiuri MA. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 1994, 180 (4), 1395-403.
23. Carson WE. Ross ME. Baiocchi RA. Marien MJ. Boiani N. Grabstein K. Caligiuri MA. Endogenous production of interleukin-15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 96 (6), 2578-82.
24. Carson WE. Fehniger TA. Haldar S. Eckhert K. Lindermann MJ. Lai CF. Croce CM. Baumann H. Caligiuri MA. A potential role for interleukin-15 in regulation of human natural killer cells survival. *Journal of Clinical Investigation*, 1997, 99 (5), 937-943.
25. Warren HS. Kinnear BF. Kastelein RL. Lanier LL. Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56 dim) human NK cells. *Journal of Immunology*, 1996, 156 (9), 3254-9.
26. Mingari MC. Vitale C. Cantoni C. Bellomo R. Ponte M. Schiavetti F. Bertone S. Moretta A. Moretta L. Interleukin-15 induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the HLA class I-specific inhibitory receptor. *European Journal of Immunology*, 1997, 27 (6), 1374-80.
27. Leclercq G. Debacker V. de Smedt M. Plum J. Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on differentiation of bipotential T/natural killer progenitor cells. *Journal Experimental Medicine*, 1996, 84 (2), 325-36.
28. Qian JX. et. al. Interleukin-15 up-regulates activity of the cord blood cells by enhancing NK cytotoxicity, IFN-gamma production and proliferation (Meeting abstract). *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.*, 1996, 37, A 3102.
29. Cavazzana-Calvo M. Hacein-Bey S. de Saint Baside G. De Coene C. Selz F. Le Deist F. Fischer A. Role of interleukin-2 (IL-2), IL-7 and IL-15 in natural killer cell differentiation from cord blood hematopoietic progenitor cells and gamma c transduced severe combined immunodeficiency x1 bone marrow cells. *Blood*, 1996, 88 (10), 3901-9.
30. Morelón E. Dantry-Varsat A. Le Deist F. Hacein-Bay S. Fischer A. de Saint Baside G. T-lymphocyte differentiation and proliferation in the absence of the cytoplasmic tail of the common cytokine receptor gamma c chain in a severe combined immune deficiency x1 patient. *Blood*, 1996, 88 (5), 1708-7.

31. Johnston JA. Wang LM. Hanson EP. Sun XY. White MF. Oake SA. Pierce Jh. Olshea JJ. Interleukin 2, 4, 7 and 15 stimulate tyrosine-phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 in T cells. Potential role of JAK kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (48), 28527-30.
32. Flamand L. *tefănescu I. Menzes J. Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *Journal of Clinical Investigation*, 1996, 97 (6), 1373-81.
33. Puzanov I.J. Bennett M. Kumar V. IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of natural killer cells. *Journal of immunology*, 1996, 157 (10), 4282-5.
34. Seder Ra. High-dose IL-2 and IL-15 enhance the in vitro priming of naive CD4- T cells IFN-gamma but have differential effects on priming for IL-1. *Journal of Immunology*, 1996, 156(7) 2413-22.
35. Mari A. Suko M. Kaminuma O. Ivone S. Ohmura T. Nishizaki Y. Nagahori T. Asakura Y. Hoshino A. Okumura Y. Sato G. Ito K. Okudaira H. IL IL-15 promotes production of human T helper cells. *Journal of Immunology*, 1996, 156 (7), 2400-5.
36. McJunes IB. Al-Mughales J. Field M. Leung BP. Huang FP. Dixon R. Sturrock RD. Wilkinson PC. Liew FY. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation on rheumatoid arthritis. *Nature. Medicine*, 1996, 2 (2), 157-82.
37. Nishimura H. Hiromatsu K. Kobayashi N. Grabstein KH. Payton R. Sugamura K. Bluestone JA. Yoshikai Y. IL-15 is a novel growth factor for murine gamma delta T cells induced by *Salmonella* infection. *Journal of immunology*, 1996, 156 (2), 663-9.
38. Kanegane H. Tosato G. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood*, 1996, 88 (1), 230-5.
39. Nieto M del Pozo MA. Sanchez-Madrid F. Interleukin-15 induces adhesion receptor redistribution in T lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 1996, 26 (6), 1302-7.
40. de Jong JL. et. al. Interleukin-15 enhances cytotoxicity mediated by lymphocytes activated in vitro by interleukin-2 (Meeting abstract). *Journal of Immunology*, 1996, 157(4), 1529-37.
41. Blauvelt A. Asada H. Klaus-Kovtun V. Altman DJ. Lucey DR. Katz SI. Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes, Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is down-regulated by ultraviolet B radiation. *Journal of Investigative Dermatology*. 1996, 106 (5), 1047-52.
42. Mohamadzadeh M. Takashima A. Dougherty I. Knop J. Bergstresser PR. Cruz PD Jr. Ultraviolet B irradiation up-regulates the expression of IL-15 in human skin. *Journal of immunology*, 1995, 155 (9), 4492-6.
43. Quinn LS. Haugk KL. Grabstein KH. Interleukin-15 ; a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology*, 1995, 136 (8), 3669-72.
44. Lee YB. Satoh J. Walker DG. Kim SU. Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture. *Neuroreport*, 1996, 7 (5), 1062-6.
45. Mohamadzadeh M. McGuire MJ. Dougherty I. Cruz PD Jr. Interleukin-15 expression by human endothelial cells: up-regulation by ultraviolet B and psoralen plus ultraviolet A treatment. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*, 1996, 12 (1), 17-21.
46. Girard D et al., Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils : modulation of phagocytosis, and apoptosis by IL-15. *Blood*, 1996, 88 (8), 3176-3184.
47. Reinecker HC. MacDermott RP. Mirau S. Dignass A. Podolsky DK. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin-15. *Gastroenterology*, 1996, 111 (6), 1706-13.
48. Subramanian SV. Adunyah SE. Induction of c-jun and c-fos mRNA expression by interleukin-15 in human leukemia U937 cells. (Meeting abstract). *Proc. Annu. Am.Assoc. Cancer Res.* 1996, 57, A 337.
49. Wheeler B. Adunyah SE. Interleukin-15 induces rapid alteration of tyrosine phosphorylation of patients in human leukemia U937 cells (Meeting abstract). *Proc. Annu.Am.Assoc. Cancer Res.*, 1996, 37, A 357.
50. Bamford RN.et al. Interleukin (IL) 15/ IL-T production by the adult T cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region/IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 (7), 2897-2902.
51. Bamford RN. Battiata AP. Waldman TA. IL-15: the role of translational regulation in their expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 1995, 59 (4) 476-80.
52. Trentin L. Cerutti A. Zambello R. Sancetta R. Tassinari C. Facco M. Adami F. Rodeghiere F. Agostini C. Semenzato G. Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood*, 1996, 87 (8), 3327-35.

53. Armitage RJ, Macduff BM, Eisenman J, Paxton R, Grabstein KH. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *Journal of Immunology*, 1995, 154 (2), 483-90.
54. Takeuchi E, Yamagawa H, Yano S, Haku T, Sone S. Induction by interleukin-15 of human killer cell activity against lung cancer cell lines and its regulatory mechanisms. *Japanese Journal of Cancer research*, 1996, 87 (12), 1251-8.
55. Meazza R, Verdiani S, Biassoni R, Coppolecchia M, Gaggero A, Orengo AM, Colombo MP, Azzorone B, Ferrini S. Identification of a novel interleukin-15 (IL 15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. *Oncogene*, 1996, 12 (10), 2187-92.
56. Munger W. et. al. Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15 a new T cell growth factor comparison with interleukin-2. *Cell Immunology* 1995, 165 (2), 298-293.
57. Gamero AM, Ussery D, Reintegen DS, Puelo CA, Djeu JY. Interleukin-15 induction of lymphokine-activated killers, cell function against autologous tumor cells in melanoma patient lymphocytes by a CD-18-dependent, perforin related mechanism. *Cancer Reserch*, 1995, 55 (21), 4988-91.
58. Azzarone B. et. el. Are inteleukin-2 and interleukin-15 tumor promoting factors for human non-hematopoietic cells ? *Eur. Cytokine Netw.*, 1996, 7 (1), 27-36.
59. Meazza R, Gaggero A, Neglia F, Basso S, Sforzini S, Pereno R, Azzarone B, Ferrini S. Expression of two interleukin-15 mRNA isoforms in human tumors does not correlate with secretion: role of different signal peptides. *European Journal of Immunology*, 1997, 27 (5), 1049-1054.
60. Lollini PL, Palmieri G, De Giovanni C, Landuzzi L, Nicoletti G, Rossi I, Griffeni C, Frabetti T, Scotlandi K, Benini S, Baldini N, Santoni A, Nanni P. Expression of interleukin-15 (IL-15) in human rhabdomyosarcoma, osteosarcoma and Ewing's Sarcoma. *International Journal of Cancer*, 1997, 71(5), 732-6.
61. Mark J. et. al. IL-15 can overcome the inhibitory environment of ascitic fluid for tumoricidal lymphocytes from ovarian carcinoma patients: synergy with IL-12 (Meeting abstract). *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.* 1996, 37, A 3313.
62. Kancu T. et. al. IL-15 stimulates the expansion of AIDS virus specific CTL. *Journal Immunology*, 1996, 157 (8), 3681-3687.
63. Chehimi JE. Et. al. Immunomodulatory effects of interleukin-15 in HIV infected patients. *Conf. Retro. and Opportun. Infect*, 1996, 95.
64. Chehimi J, Marshall JD, Salvucci O, Frank J, Chehimi S, Kaweckki S, Bacheller D, Rifat S, Chonaib S. IL-15 enhances immune functions during HIV infection. *Journal of Immunology*, 1997, 158 (12), 5978-87.
65. Lucey DR, Pinto LA, Bethke FR, Rusnake J, Melcher GP, Hashemi FN, Landay AL, Kessler HA, Paxton RJ, Grabstein K, Shearer GN. In vitro immunologic and virologic effects of interleukin-15 on peripheral blood mononuclear cells from normal donors and human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1997, 4 (1), 43-8.
66. Kacani L, Stoiber H, Dierich MP. Role of IL-15 in HIV-1 associated by hiperpergammaglobulinemia. *Clinical and Experim. Immunology*, 1997, 108 (1), 14-8.
67. Agostini C, Trentin L, Saucetta R, Faccio M, Tassinari C, Cerutti A, Bortolin M, Milani A, Siviero M, Zambello R, Semenzato G. Interleukin-15 triggers and growth of the CD8 T-cell pool in extravascular tissues of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Blood*, 1997, 1, 90 (3), 1115-23.
68. Mc Neeley MB. et. al. Differential effect of IL-12 and IL-15 on HIV-1 replication by latent and acutely infected mononuclear cells. *Conf. Adv. AIDS Vaccine Dev.*, 1996, 134.
69. Bayard-Mc Neeley M, Doo H, He S, Hafner A, Johnson JL. Differential effect of interleukin-12, interleukin-15 and interleukin-2 on human immunodeficiency virus type1 replication in vitro. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1996, 3 (5), 547-53.
70. Patki AH, Quinones-Maten ME, Dorazio D, Yen-Lieberman B, Boom WH, Thomas EK, Ledreman MM. Activation of antigen-induced lymphocyte proliferation by interleukin-15 without the mitogenic effect of interleukin-2 that may induce human immunodeficiency virus-1 expression. *Journal of Clinical Investigation*, 1996, 98 (3), 616-21.
71. Agostini C, Trentin L, Faccio M, Saucetta R, Cerutti A, Tassinari C, Cimarosto L, Adami F, Cipriani A, Zambello R, Semenzato G. Role of IL-15, IL-2 and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *Journal of Immunology*, 1996, 157 (2), 910-8.
72. Khan IA, and Kasper LH. IL-15 augments CD8+ T cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondi* infection in mice. *Journal Immunology*, 1996, 157 (5), 2103-2108.

INTERLEUKINA-13 (IL-13)

Interleukina-13 este o citokină înrudită structural și funcțional cu interleukina-4. Similaritățile lor funcționale se explică, cel puțin în parte, prin componentele comune ale receptorilor lor prezenți pe membranele celulare, respectiv subunitățile IL-13R alpha și IL-4R alpha (1).

Cele două citokine sunt produse de limfocitele T, fiind codificate de genele corespunzătoare prezente la om pe cromosomul 5, iar la șoarece pe cromosomul 11. La om, genele IL-13 și IL-4 ocupă regiunea q23-31 a cromosomului 5.

Gena IL-13 umană conține un fragment DNA de 4,6kb, iar cea de la șoarece, un fragment DNA de 4,3 kb. Ambele gene sunt formate din 4 exoni și 3 introni, având un înalt grad de identitate a secvențelor pe întreaga lor lungime. La om, gena IL-13 este localizată la 12 kb de capătul 5' față de gena IL-4, conectându-se în maniera cap-coadă. În regiunea care flanchează capătul 5' s-au identificat locurile de cuplare pentru diferiți factori de transcriere.

Compararea IL-13 cu IL-4 relevă considerabile similarități în organizarea structurii genelor, prezentând numeroase locuri potențiale de cuplare pentru factorii de transcriere comuni celor două gene, așa cum sunt siturile AP1, AP2, AP3, PEA3, HRE, TCF-1, GATA-3 și elementul IFN-responsiv.

Elementele promotoriale care cuplează NF-AT sunt candidați activi pentru medierea coordonată a expresiei genelor acestor două citokine (1, 2, 3, 4)

IL-13 este produs de T CD4+ și de T CD8+. Clonele T CD4+ aparținând limfocitelor Th0, Th-1 și Th2-like, produc IL-13 în urma activării cu antigeni specifici sau după activarea policlonală. Expresia mRNA IL-13, ca și producția proteinei IL-13 de către limfocitele T din sângele periferic și de către clonele de limfocite T sunt induse rapid și relativ îndelung, spre deosebire de producția de IL-4 care, în aceleași condiții, este tranzitorie.

Expresia mRNA IL-13 este indusă prin modalități de activare insuficiente însă, pentru a induce și expresia mRNA IL-4. IL-13 prezintă multe activități biologice similare cu ale IL-4 datorită componentei comune din receptorii lor care au rolul de a transmite semnale. Totuși, IL-13 nu are abilitatea de a activa celulele T, așa cum face IL-4, deoarece aceste celule nu dețin componenta specifică receptorului IL-13. Astfel, diferențele în expresia activării biologice a limfocitelor T de către IL-13 și IL-4, pot avea consecințe asupra rolului relativ al citokinelor în răspunsul imun (5).

Jung T. et al.(6) subliniază faptul că IL-13 este o citokină identificată originar ca produs al celulelor activate, elaborată de limfocitele T CD4+ umane cu memorie, ca și de cele CD8+, CD45 RO, dar și de cele CD4+ naive și CD8+ CD45 RA.

IL-4 care, așa cum s-a menționat, deține multe activități biologice asemănătoare cu ale IL-13, este elaborat exclusiv de limfocitele T CD4 45 RO activate. Spre deosebire de IL-4, IL-13 este asemănător cu IFN-gamma, având o cinetică prelungită. Citokina este produsă de limfocitele T din sângele periferic, care produc și IL-4 dar nu și IFN-gamma. De asemenea, este produsă de limfocitele T naive CD45 R0, care nu pot elabora IL-4. În consecință, IL-13 poate avea funcții IL-4-like în condițiile în care fie că IL-4 nu este produs de limfocitele T, fie că producția ei a fost stopată (6).

IL-4R-alpha forma solubilă, poate fi implicat în modularea efectelor IL-4 ca și IL-13 BP (Binding-Protein) din serul și urina șoarecilor, cuplând IL-13 cu înaltă afinitate (de 100-300 ori mai mare decât IL-13R alpha clonat). IL-13 BP poate astfel inhiba cuplarea IL-13 la receptorul său din plasmalemele celulelor, jucând rolul unui modulator al efectelor IL-13 in vivo (1).

Clonarea și caracterizarea cDNA IL-13R-alpha cât și a proteinei acestuia arată omologii de 70% cu IL-13R-alpha murin și de 95% în aminoacizii domeniului citoplasmatic. Activitatea de cuplare a IL-13 este redusă la celulele transfectate numai cu IL-13R-alpha. Cuplarea este mai substanțială când sunt prezente lanțurile alpha ale IL-13R și IL-4R, ceea ce presupune că ambele componente sunt esențiale pentru IL-13R (8).

IL-13R are o structură diferită la variate tipuri celulare și poate participa mai mult ca o componentă a IL-4R. Prin cuplările încrucișate ale citokinelor IL-13 și IL-4 s-a ajuns la concluzia că IL-13R este complex și are o subunitate comună cu IL-4R. IL-4 nu cuplează totdeauna la celulele la care se cuplează IL-13 fiind valabil deci, și reversul. Se propune ca forma de 65-70kD a IL-13, să fie componenta predominantă, comună pentru IL-13R și IL-4R. (9).

IL-13 și IL-4 produc aceleași schimbări în celulele endoteliale ale venei ombilicale umane (HUVEC), schimbări distincte de cele induse de alte citokine. Aceste două citokine stimulează comparabil VCAM-1 cu același timp al cineticii, dar la doze de 10 ori mai mici decât cele necesare pentru activarea și proliferarea limfocitelor B.

Folosirea anticorpilor monoclonali anti-lanț alpha IL-4R (CD124) demonstrează că expresia acestui lanț este esențială pentru răspunsul celulelor HUVEC la acțiunea citokinelor IL-4 și IL-13, subunitatea alpha fiind o componentă a receptorilor ambelor citokine (10).

Lanțul comun gamma c lipsește din celulele endoteliale. Se sugerează astfel că citokinele IL-4 și IL-13 sunt importante în modularea funcțiilor celulelor endoteliale și pot acționa printr-un singur receptor complex ce include lanțul alpha IL-4R și nu lanțul gamma c (10).

Caput D. et al. (11) arată că IL-13 secretat de celulele T are numeroase proprietăți asemănătoare cu ale IL-4, care s-ar datora componentelor comune din receptori. IL-4R are două componente: o glicoproteină de 140kD și lanțul gamma al IL-2R, însă nici una dintre acestea nu cuplează IL-13.

Clonarea dintr-o linie de carcinom renal uman Caki-1 a unui cDNA care codifică IL-13R (o proteină de 380 aminoacizi) arată că acesta are omologii cu IL-15R și cu receptorul prolactinei.

Transfecția celulelor COS-7 cu DNA IL-13R produce reacția de cuplare cu înaltă afinitate a IL-13, dar nu a IL-4. Cotransfecția cu cDNA IL-13 clonat și cu cDNA IL-4R duce la formarea de celule care cuplează cele două citokine. Celulele ce conțin lanțul alpha al IL-4R și IL-13R, răspund la cele două citokine (11,12).

În liniile de carcinom colorectal, IL-4R are 3 subunități: de 65kD, 75kD și 130kD. Subunitatea de 75kD reprezintă lanțul gamma comun cu al IL-2R. Subunitatea de 65kD cuplează primar cu IL-13 marcat cu ¹²⁵I.

S-a demonstrat că un lanț, altul decât gamma, cuplează IL-13 și IL-4 și fosforilează postreceptor IRS-1 (Insulin Receptor Substrat-1); IRS-1 de 170kD se tirozinfosforilează sub acțiunea insulinei și a IGF-1-like. Există linii celulare de carcinom colorectal a căror creștere este inhibată când IL-13R și IL-4R declanșează fosforilarea substratului IRS-1 (13).

IL-13R de pe liniile celulare de carcinom și de pe liniile sanguine umane deține, în comparație cu IL-4R, 3 subunități: de 130kD, 75kD și 65kD. O suspensie de celule carcinoatoase incubate cu exces de hIL-4 nemarcat, nu permite cuplarea IL-13 marcat cu ¹²⁵I. Totuși, hIL-13 nemarcat nu poate fi complet înlocuit cu hIL-4 ¹²⁵I de pe proteina de 130kD. Se concluează că, hIL-4R și hIL-13R, deși similare sunt totuși distincte (14).

Structura IL-13R și IL-4R este variabilă, în funcție de tipul celular și de starea funcțională a celulelor. În liniile celulare de carcinom ovarian uman pot exista câteva tipuri de IL-13R, iar modelele de semnalizare induse de IL-13 și IL-4 pot fi diferite în fiecare tip de receptor.

Liniile IGROV-1 și PA-1 de cancer ovarian exprimă cu înaltă afinitate IL-4R și un număr variat de IL-13R. IL-13 inhibă cuplarea IL-4 în ambele linii, în timp ce IL-4 nu inhibă cuplarea IL-13 în linia IGROV-1. Ambele citokine induc fosforilarea kinazelor Jak-1, Jak-2 și Tyk-2 în celulele PA-1. În celulele IGROV-1 sub acțiunea celor două citokine se exprimă kinaza Jak-2, și se amplifică fosforilarea kinazei Tyk-2. IRS-1 și IRS-2 sunt constitutiv fosforilate în ambele linii celulare, dar numai IRS-1 crește ca răspuns la acțiunea citokinelor.

În mod asemănător, STAT-6 se fosforilează în toate liniile de cancer testate ca răspuns la acțiunea celor două citokine.

Se concluează că, liniile de cancer ovarian prezintă două tipuri de IL-13R și, de asemenea, că modelele de semnalizare pot fi ușor diferite în funcție de fiecare tip de receptor (15).

În cazul celulelor de gliom uman, IL-13R nu interacționează cu IL-4, dar IL-4R interacționează cu IL-13. Aceste celule tumorale prezintă un mare număr de IL-13R și sunt sensibile la hIL-13 și la endotoxina de Pseudomonas (PE)- PE 38QQR-. Liniile gliale umane sunt foarte sensibile la hIL-13-PE 38QQR-, situație în care toxina himerică nu este blocată de hIL-4.

Se sugerează că hIL-13R se exprimă predominant pe celulele gliomului și nu interacționează cu IL-4, astfel că, acesta este diferit de cel demonstrat pe câteva linii de adenocarcinom (16).

În limfocitele B există IL-4R cu două lanțuri: unul alpha asemănător cu al IL-13R și celălalt, gamma c IL-2R, asemănător cu IL-12R, IL-9R și IL-15R. IL-4 induce celulele care nu dețin lanțul gamma c, astfel încât, inducerea transcripților liniei germinale

C-epsilon în celulele B, poate implica semnale via IL-13R. De asemenea, lanțul alpha IL-4R poate transduce semnale intracelulare care duc la apariția transcriptelor genei C-epsilon, independent de asocierea lui cu celelalte lanțuri ale receptorului.

S-a demonstrat că homodimerizarea receptorului (IL-4R alpha) indusă de ligand determină în celulele B-JAB, activarea kinazei Janus (Jak-1), a STAT-6 și a transcriptelor liniei germinale C-epsilon. Se apreciază că acest proces este suficient pentru transmiterea semnalelor intracelulare și, pe de altă parte, depinzând de Jak-1, se produce orientarea către elaborarea de IgE (17).

Anticorpii monoclonali anti-IL-4 uman blochează cuplarea IL-4 la receptor, implicit funcția biologică a acestuia, dar blochează în același timp și funcția lui IL-13. Se consideră astfel că, IL-4 este un component secundar al IL-13R. De asemenea, se susține că lanțul gamma c nu participă la medierea transmiterii semnalului, de unde concluzia că, subunitatea de cuplare a receptorilor pentru IL-4 și IL-13 este lanțul alpha, care mediază transmiterea semnalului (18,19,20,21,22).

cDNA hIL-13R s-a identificat printre liniile de mielom analizate, linia U266 fiind singura care exprimă transcripte IL-13R și care produce și IgE. Gena IL-13R este localizată pe cromosomul Xq24 între gena receptorului lanțului gamma IL-2R (Xq13.1) și gena IL-9R (Xq28), lângă gena ligand CD40 al cărui produs este implicat, ca și IL-13, în proliferarea și direcționarea limfocitelor B umane, către izotipul IgE. Absența secvențelor nucleotide sugerează că în evoluție au existat căi independente pentru genele acestor receptori (23).

Transmiterea semnalului IL-13 induce o rapidă fosforilare și activare a TK-urilor familiei Jak din celulele unor linii de carcinom de colon. Jak-2 este activat într-un minut, pentru că în 10 minute fosforilarea să atingă maximum. IL-13 fosforilează și kinazele Jak-1, Fyk-2 și IRS-1 (170kD), dar nu fosforilează kinaza Jak-3. Ca și IL-13, IL-4 fosforilează aceleași kinaze, dar nu activează Jak-3 nici în celulele HT-29 ale carcinomului de colon și nici în celulele sistemului imunitar. Se subliniază faptul că, activarea celulelor cu IL-4 se face via IL-4R, fără intervenția lanțului gamma al receptorului.

Citokinele IL-13 și IL-4 induc fosforilarea STAT-6, dar nu acționează pe STAT-1,3,5. Se sugerează că, în cazul celulelor carcinomului de colon, IL-13 utilizează IL-4R și calea de semnalizare Jak-2 care poate juca, în acest tip de celule, un rol important în funcțiile IL-4R și IL-13R (24,25).

Celulele FF1 stimulate de IL-13 determină, ca și IL-4 și IGF-1, activarea fosforilării la substratul de 170kD, care este puternic asociat cu subunitatea de 85kD a fosfoinozitol-3 (Pi3) kinazei cu Grb-2. Deci, IL-13 fosforilează tirozina substratului 4PS oferind o interfață esențială între IL-13R și moleculele de semnalizare care conțin domeniul SH2.

Fibroblastele murine stimulate cu IL-13 și IL-4 care dețin IL-4R alpha, dar nu subunitatea IL-2R, sunt fosforilate la tirozina IRS/3PS. Amplificarea IRS-1/4PS apare ca răspuns la IL-4, dar nu la IL-13 în limfocitele transfectate cu lanțul gamma IL-2R. Prin urmare, IL-13 nu folosește subunitatea gamma IL-2R în receptorul său complex, dar în cazul IL-4 expresia acesteia amplifică medierea tirozinfosforilării IRS-1/PS, fără însă, a fi absolut necesară acestui proces (26).

Analiza similarităților și diferențelor în transmiterea semnalelor de către IL-13 și IL-4, urmărită prin activitatea kinazelor Janus, dovedește încă odată că, cele două citokine au răspunsuri biologice similare așa cum sunt: inițierea elaborării IgE și inducția Ag MHC clasa II ca și a CD23 în limfocitele B umane. Comparând abilitatea celor două citokine de a activa moleculele de semnalizare în linia celulară TF1 (dependentă de mulți factori), se constată că, spre deosebire de IL-13, IL-4 induce fosforilarea Jak-1, dar ambele fosforilează 4PS și Jak-1 (27).

IL-13 acționează în continuarea transmiterii semnalelor via STAT-6, deoarece șoarecii deficienți în STAT-6 nu răspund prin schimbări morfologice sau prin creșterea expresiei MHC clasa II și, de asemenea, nu determină scăderea producției de oxid nitric în macrofagele activate (28).

Stimularea cu TNF alpha induce o creștere de 2-3 ori a expresiei IL-4R alpha și corectează dezechilibrul subunităților complexului receptorului IL-4/IL-13 din celulele endoteliale. Corectează, de asemenea, heterodimerizarea și orientează capacitatea de semnalizare via IL-13 și IL-4 inducând finalmente, activarea STAT-6 (29).

IL-13 elaborat de Th0, Th2-like și T-CD8 ca răspuns la acțiunea antigenilor, induce rapid tirozinfosforilarea și activarea raf-1 kinazei în progenitorii liniei celulare U937, și în funcție de doză, tirozinfosforilează în numai 30 secunde, câteva proteine (de 93, 80, 74, 49,5, 42, 30, 22 și 18kD). Efectul IL-13 poate fi blocat prin inhibarea cu erbstatin. În concluzie, IL-13 prin mecanismul său de transducție, implică tirozinfosforilarea și activarea rapidă a serin/treonin kinazei raf-1 (30).

Efectul IL-13 asupra diferitelor tipuri celulare

IL-13 și IL-4 acționează fiecare pe celulele endoteliale umane în care induc expresia ICAM-1 (Molecule de Adeziune InterCelulară) și VCAM-1 (Molecule de Adeziune a Celulelor Vasculare). Ambele tipuri de molecule sunt induse de citokine care recunosc liganzi înalt exprimați pe leucocite. Ele induc separat tirozinfosforilarea TK-azelor Jak-2, care, la rândul lor, activează factorul de transcriere STAT-6. În celulele endoteliului vascular uman, ele folosesc o cale comună care nu implică lanțul gamma c.

În mod similar, expunerea timp de 18 ore a celulelor mezoteliomului malign uman, la TNF alpha și IL-13, conduce la sinteza mRNA VCAM-1 și la expresia acestor molecule pe membranele a 60-70% din celule. VCAM-1 s-a detectat pe 10-50% din celulele nestimulate ale liniei de mezoteliom (31,32).

În afecțiunile alergice, inducția VCAM-1 de către IL-4 are un impact major asupra extravazării subseturilor de leucocite. Inducția selectivă a acestor molecule de către cele două citokine determină mobilizarea cozinofililor și limfocitelor T din căile aeriene ale pacienților alergici (33).

În cazul sinuzitelor cronice hiperplazice nealergice cu polipoză nazală (CHP/NP) infiltrarea cu cozinofile se asociază cu VCAM-1 endoteliale., molecule care mediază selectiv tranzitul transendotelial al acestor granulocite.

IL-1 beta, TNF alpha și IL-3 suprareglează expresia VCAM-1 și a chemokinei RANTES (Regulated Activity Normal T Expressed and Secreted) care mediază chemotaxisul limfocitelor, monocitelor și cozinofililor în cazul sinuzitelor menționate și

poate contribui la acumularea marcată a eozinofilelor. Pe de altă parte, TNF alpha poate juca un rol critic în reglarea eozinofilelor (34). IL-13 și nu IL-4 prelungeste supraviețuirea eozinofilelor inducând chemotaxisul acestora. Citokina activează specific eozinofilele umane care exprimă CD69 și crește semnificativ mRNA IL-13. La peste 3ng/ml, rhIL-13 prelungeste supraviețuirea acestor celule, dar este inhibat de anticorpul monoclonal anti-IL-13 și de GM-CSF, ceea ce sugerează că ar induce producerea acestor factori de către granulocitele eozinofile și că ar exista un mecanism autocrin responsabil de supraviețuirea acestor celule. Se concluzionează că, IL-13 poate juca un rol important în supraviețuirea și revigorarea eozinofilelor în bolile alergice.

În astm, în celulele mucoasei bronșice se constată un influx selectiv de eozinofile și o susținută activitate a mRNA IL-13 (35, 36, 37). Infiltrarea eozinofilelor, macrofagelor și limfocitelor T în mucoasa bronșică este, de asemenea, asociată cu IL-13 și IL-4, dar și cu producerea de VCAM-1 în fazele târzii ale reacției tegumentului la agresarea cu alergeni (38).

IL-13 este un modulator al câtorva funcții ale neutrofilelor umane cărora le produce schimbări morfologice, transformându-le în celule tipice activate. rhIL-13 crește și tirozinfosforilarea câtorva proteine, stimulează formarea de novo a RNA prin aceasta inducând câteva proteine tipice pentru neutrofile.

Proprietățile antiinflamatorii ale IL-13 se asociază cu cele ale IL-4, IL-10 și TGF beta, represând producția de citokine proinflamatorii și favorizând elaborarea de IL-1 gamma (39,40).

Bazofilele umane elaborează, de asemenea, IL-13 după stimularea cu anti-IgE, spre deosebire de neutrofilele și bazofilele izolate de la aceiași donori. Ele pot fi și o importantă sursă de citokine proalergice. IL-13 este conținută în granulațiile bazofile, dar se detectează și în supernatant.

Nivele înalte de IL-13 sunt detectabile, independent de IgE, după activarea bazofilelor, ceea ce duce la secreția prelungită de citokină. Producția de IL-13 de către bazofile este reglată exclusiv de IL-3 care induce direct expresia citokinei, dar, de asemenea, IL-5, GM-CSF, IGF-1 C5a și IL-1 beta pot induce o producție, de data aceasta, mai redusă de IL-13. S-a demonstrat că, bazofilele umane au un important rol imunoregulator datorat posibilității de a elabora simultan, citokinele IL-13 și IL-4, într-o manieră restrictivă (41,42).

Producția de IL-13 poate fi blocată cu actinomicina D și ciclofosfamidă.

Factorul recombinant de eliberare a histaminei umane (hHRF) direcționează eliberarea histaminei și secreția de IL-4 de către bazofilele subiecților atopici. Acest factor afectează eliberarea de IL-4, IL-13 și histamină mediată de IgE din bazofile, celule care în mod normal nu eliberează această imunoglobulină.

În cultură stimulată 16-20 ore cu anticorpi anti-IgE, secreția de IL-13 este amplificată de hHRF, ceea ce sugerează că acest factor modifică răspunsul bazofilelor privind secreția dependentă de IgE, prin cuplarea la un receptor specific, amplificând astfel rolul posibil al acestei proteine în inflamațiile alergice cronice (43).

IL-13 și IL-4 sunt citokine cheie imunoreglatoare care induc și amplifică răspunsul imunitar de tip Th2 și care stimulează și elaborarea de IgE. Bazofilele reprezintă o sursă importantă de IL-13 și IL-4, constituind un segment distinct de celelalte tipuri celulare. Sunt unicele celule care exprimă constitutiv mRNA IL-4 și

IL-13, secretând aceste două citokine după activarea cu IL-13 și C5a, independentă de IgE. Alte funcții ale bazofilelor, precum chemotaxisul, exocitoza și elaborarea de leucotriene C4 sunt reglate separat (44).

Generarea de IL-13, care este o citokină de tip Th2, în mastocitele pulmonare LMC (Lung Mast Cell) și în cele ale liniei HMC-1 este indusă de anticorpi anti-IgE, constatăndu-se creșterea rapidă și persistentă (16 ore) a mRNA IL-13. La două ore după activare, în supernatant nu se constată creșterea citokinei, aceasta fiind detectabilă la 8 ore. LMC prin multiple semnale de transducție, conduce la creșterea atât a expresiei mRNA IL-13 cât și a proteinei IL-13 (45).

În rinitele alergice, mastocitele din mucoasa nazală arată o creștere a expresiei Fc epsilon RI, CD40. IL-4 și IL-13 pot induce sinteza IgE în limfocitele B. Se apreciază că mastocitele pot induce reacții alergice datorită tocmai expresiei crescute de Fc epsilon RI, ca și prin amplificarea producției de IgE în micromediul local (46).

RANTES este un puternic chemoattractant cu proprietăți de activare a eozinofilelor, bazofilelor și limfocitelor T. Celulele epiteliale ale traheei umane, stimulate cu IL-1 beta, TNF alpha și IFN gamma determină creșterea proteinei RANTES (mRNA se exprimă de 20 ori mai mult), creștere care, însă, este inhibată nesemnificativ de dexametazonă și de IL-4, iar IL-10 și IL-13 nu au efect inhibitor (47).

Celulele endoteliale HUVEC stimulate cu IFN gamma, IL-1 beta sau TNF alpha produc puțin RANTES sau deloc. În schimb, mixtura TNF alpha+IFN gamma declanșează o producție semnificativă de RANTES. Se consideră că IFN gamma sensibilizează HUVEC pentru a stimula efectul TNF alpha. Producția de lanțuri alpha declanșată de cele două citokine este însă inhibată puternic de citokinele tip Th2, respectiv IL-4 și IL-13 (48).

RANTES și MIP-1 alpha (Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha) facilitează selectiv producția de IgE și IgG4 în celulele B umane. La rândul lor, cele două citokine stimulative sunt induse de IL-4.

Anticorpii monoclonali anti-RANTES și anti-MIP-1 alpha, blochează producția de IgE și IgG4, dar nu de IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 și IgA2. Anticorpii monoclonali anti-IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 și TNF alpha nu stopază producția de RANTES și MIP-1 alpha și astfel, nici producția de IgE și IgG4.

Producția de IgE și IgG4 de către limfocitele B reclamă două semnale de la limfocitele T- IL-4 și IL-13, ca și ligandul CD40 (CD40L). Laolaltă cu CD40L și CD86, IL-4 și respectiv IL-13, favorizează cuplul CD23-CD21, care funcționează ca un costimul selectiv și potent pentru sinteza de IgE și IgG4 umane (50).

Prezența genei IL-13 în diverse tipuri de celule tumorale, ridică întrebarea asupra rolului IL-13 elaborat de celulele B, asupra funcției normale a acestor celule in vivo, cât și asupra comportării acestei citokine în malignitățile limfocitelor B in vivo. Prezența genei IL-13 este demonstrată în limfoamele de grad înalt cu celule B, în limfoamele foliculare, în liniile limfoblastoide și în limfomul Burkitt, dar și în unele limfoame cu celule T. Dimpotrivă, gena nu s-a detectat în nici una din cele 5 linii celulare nelimfoide. Se subliniază și faptul că, liniile de celule B nu dețin IL-13R, observație dedusă din absența cuplării IL-13 radiomarcant la aceste limfocite (51).

IL-13 elaborat de limfocitele Th2 modulează și activitatea macrofagelor într-o manieră similară cu cea descrisă pentru IL-4. Macrofagele activate cu IL-13 reduc producția monokinelor inflamatorii, ca răspuns la IFN alpha sau LPS.

IL-13 reduce producția de oxid nitric de către macrofagele activate, oxidul nitric fiind implicat în citotoxicitatea și imunosupresia asociate macrofagelor și are efecte pleiotropice. Se remarcă faptul că, în timp ce potențialul inflamator al macrofagelor este specific redus, cel al altor seturi de macrofage este neafectat. Citokina este un presupus modulator al răspunsului imunitar *in vivo*, cu efecte ce pot viza atât funcția de supresor cât și cea de stimulator a macrofagelor (52).

Nicoletti et al. (53) susțin că IL-13 este un puternic inhibitor al funcției macrofagelor privind expresia de suprafață a CD14 și producția de IL-1 și TNF alpha. La șoareci, ea reduce dramatic efectele letale ale LPS dacă este administrată cu 4 sau 24 ore înainte, sau concomitent cu LPS agresivă. Această acțiune mediată de IL-13 se poate explica și prin nivelul de 8 ori mai redus al TNF și IL-1 beta din sângele periferic: în schimb, nivelul crescut de IL-6 și IL-10 se constată mult mai târziu după agresiunea cu LPS (53).

În macrofagele alveolare de la om, IL-13 reduce eliberarea proteinei și mRNA MIP-1 alpha induse de LPS. Pentru PMB și AM (Alveolar Macrophag), efectul inhibitor al IL-13 asupra proteinei MIP-1 alpha este maxim în 24 ore. Efecte similare, dar mai reduse, manifestă și IL-4. De aici, concluzia că IL-13, ca și IL-4 și IL-10 are efecte inhibitorii asupra transcrierii genei MIP-1 alpha din mononucleare inclusiv macrofage, fiind astfel un important mediator pentru supresia răspunsului inflamator (54).

Prezența IL-13 în sinoviumul reumatoid (în 27 din 28 probe de lichid sinovial) are efecte antiinflamatorii. rIL-13 reduce semnificativ producția de către macrofagele din lichidul sinovial, a IL-1-beta și TNF-alpha. Abilitatea IL-13 exogen de a scădea producția citokinelor proinflamatorii, sugerează posibilitatea terapiei artritelor reumatoidale. Citokina are efecte reglatoare și în sângele subiecților cu artrite inflamatorii, putând fi folosită pentru diminuarea activității monocitelor/macrofagelor la locul inflamației cronice.

Testarea în cultură a mononuclearelor din lichidul sinovial și a PBMC subiecților cu artrită inflamatorie, arată că IL-13 inhibă semnificativ producția de TNF alpha de către mononuclearele din sângele periferic, indusă de LPS, dar nu o inhibă pe cea din lichidul sinovial. Concluzia este că, răspunsul la IL-13 al celulelor din lichidul sinovial și al mononuclearelor cultivate nu este egal cu al mononuclearelor sanguine, și de asemenea, că similaritățile răspunsului la IL-4 și IL-13 argumentează existența unui element comun în receptorii celor două citokine, alterarea lanțului comun putând duce la reacții diferențiate (55,56).

IL-13 inhibă secreția citokinelor din monocitele sângelui periferic al pacienților cu nefropatii IgA, ca și secreția spontană de citokine de către PBM stimulate de LPS. Același efect îl are IL-13 și în cazul culturilor de PMB normale, ca și producția de TNF alpha și IL-8 de către aceste celule stimulate de LPS (57). Pe de altă parte, producția de TNF-alpha de către macrofagele stimulate de LPS, poate fi inhibată de IL-4 și IL-13, date demonstrate pe liniile de șoareci RAW2647 și J774. Acumularea în macrofage a mRNA-TNF-alpha sugerează faptul că supresia are loc la nivel translațional, acțiunea inhibitoare fiind mediată de secvența bogată în UA din regiunea 3' netranslatată a mRNA (58).

În infecții, IL-13 răspunde laolaltă cu alte citokine tip Th2 cu funcții similare (IL-4, IL-5, IL-10), prin amplificarea imunității umorale și inhibarea imunității mediate celular de către limfocitele tip Th1 (IFN gamma, IL-2, IL-12); aceasta duce la un efect protectiv prin îndepărtarea primară a patogenilor, prin mecanisme umorale.

Progresia infecției cu HIV este asociată cu trecerea de la profilul Th1 la profilul Th2. Activarea necontrolată a citokinelor proinflamatorii IL-1, TNF-alpha și IFN-gamma, poate fi un defect fundamental care stimulează procesele inflamatorii (59).

În funcție de apărarea exercitată de macrofagele pulmonare contra unei mari varietăți de patogeni pulmonari, însăși acestea se pot infecta cu HIV care astfel le afectează funcțiile. IL-13 are capacitatea de a inhiba HIV-1 din macrofagele infectate și cu HCMV deoarece, se constată o replicare sporită a HIV-1, ceea ce nu se constată când celulele sunt infectate numai cu HIV-1. În macrofagele alveolare tratate cu IL-13, producția de HIV-1 este puternic supresată, chiar în cazul în care celulele au fost coinfectate cu HCMV. Tratamentul cu IL-13 amplifică marcat, în funcție de doză, replicarea HCMV în macrofagele latente (60).

Proteina NEF-HIV-1 are omologii semnificative cu proteina retrovirală transmembranară p15E care este înalt conservată ; ea induce expresia mRNA IL-10 în mononuclearele sângelui periferic uman, ca și în liniile promonocitare umane H95 și U937. NEF nu afectează citokinele IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, p40, IL-13 și IFN gamma, dar forma sa extracelulară induce IL-10 contribuind astfel la imunopatogeneza cu HIV-1 (61).

La subiecții cu limfom cu celule B sau alte maladii, suprainfecția cu HIV-1 nu schimbă nivelul producției citokinelor IL-6, IL-10 și IL-13 (62).

Terapia cu IL-13

Tentativele terapeutice experimentale oferă slabe speranțe în combaterea unor afecțiuni. Totuși, IL-13 (produs de limfocitele Th2) inhibă creșterea tumorii transplantate la șoareci atât la locul acesteia cât și în jurul ei. Administrarea in vivo a IL-13 are efecte inhibitorii asupra creșterii celulelor mastocitomului imunogenic P1815 și H-2d. Șoarecii injectați cu celule tumorale P815 secretă cantități mari de IL-13 și rejectează tumora inducând imunitate antitumorală sistemică specifică. Asemenea efecte s-au obținut și în cazul tumorii 3LL neimunogenică, prin administrarea locală a IL-13, fără însă, să se obțină inducția de durată a memoriei anti-3LL (63).

Cu proteina himerică formată din IL-13 și forma trunchiată a proteinei PE38 QQR de endotoxină A din *Pseudomonas*, s-a acționat asupra celulelor carcinomului renal (RCC) care dețin IL-13R ce cuplează cu mare afinitate proteina himerică. Marea sensibilitate a celulelor RCC la IL-13 PE38QQR se corelează cu marea densitate a IL-13R. Liniile IL-13R negative sau cele care exprimă un număr mic de receptori (300 per celulă) cum sunt cele din măduva osoasă umană, nu sunt sensibile la proteina himerică. Chiar dacă IL-13 și IL-4 sunt omoloage, iar IL-13R și IL-4R împart o subunitate a receptorilor, IL-4 nu intră în competiție cu citotoxicitatea mediată de IL-13 pe RCC.

Liniile umane de limfocite T, B și de monocite nu răspund la acțiunea citotoxicului IL-13-PE38QQR, care însă poate fi folosit în tratamentul RCC (64).

Celulele canceroase mamare ZR-75-1 expuse la IL-4 sau la IL-13 timp de 10 zile induc o scădere cu 75% și respectiv 55% a activității mitogenice a 15 beta-estradiolului. Cele două citokine acționează similar și asupra celulelor liniei tumorale mamare T47D. Citokinele IL-4 și IL-13 pot reduce proliferarea celulelor cancerului mamar indus de

estrogeni, dar cu rezerva că în alte condiții, rezultatele nu sunt aceleași, respectiv nu este inhibată proliferarea (65). Testarea preparatelor de rhIL-13 și rhIL-4 asupra liniiilor clonale de cancer mamar, relevă capacitatea acestora de inhibare a creșterii și proliferării a trei din nouă clone (66).

Glucocorticoizii sunt intens folosiți în tratarea bolilor mediate de sistemul imunitar, iar citokinele au un rol important în combinarea răspunsurilor de apărare. Dacă PBMC incubate cu IL-1, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-12 și GM-CSF nu au efect asupra afinității de cuplare a glucocorticoizilor la receptorii lor, IL-13, dimpotrivă, scade afinitatea de cuplare. În virtutea abilității ei de a induce afinitate diminuată la cuplarea glucocorticoizilor, IL-13 poate fi recomandată în tratarea bolilor inflamatorii (67).

În stări alergice, crește producția de IL-13 în limfocitele T, iar în supernatantul culturilor de limfocite Th2, producția citokinei este indusă de alergeni cum sunt polenul, praful de casă și *Dermatophagoides pteronyssimus*. Se conclue astfel că, limfocitele T alergen-specifice de la subiecți atopici, secretă cantități mari de IL-13, comparativ cu subiecții neatopici, în contextul modelului de citokine tip Th2 (68).

Se poate afirma că IL-13 deține similarități structurale și funcționale importante cu IL-4. Similaritățile funcționale se datorează, în parte, și componentelor comune (lanțul alpha) ale receptorilor lor (IL-4R și IL-13R). Receptorii pot fi asimilați în membranele celulelor sau pot fi solubili. Cei din urmă au un rol important în influențarea efectului biologic al citokinelor, frecvent în sensul de a le reduce efectul. Astfel, IL-13R din ser și urină cuplează IL-13 de 100-300 ori mai puternic decât IL-13 din membrane (1).

IL-13 și IL-4 au similarități de aproximativ 30% în resturile de aminoacizi, iar genele au structura exoni-introni, de asemenea similară. Cele două citokine acționează asupra limfocitelor B cărora le influențează producția de IgE și IgG4.

1. Zhang JG., Hilton DJ., Willson TA., McFarlane C., Roberts B A., Moritz RL., Simpson RJ., Alexander WS., Metcalf D., Nicola AN. Identification, purification and characterization of a soluble interleukin (IL)-13-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272, 14, 9474-9480.
2. McKenzie AN., et al., Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. *Journal of Immunology*, 1993, 150, (12),
3. Smirnov AV., Smirnova MG., Korobko VG., Frolova EI., Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13: resemblance in their organization. *Gene*, 1995, 155 (2), 277-281.
4. Dolganov G. et al., Coexpression of the interleukin-13 and interleukin-4 genes correlates with their physical linkage in the cytokine gene cluster in human chromosome 5q23-31. *Blood*, 1996, 87 (8), 3316-3326.
5. de Waal Malefyt R. et al., Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 cell clones and EBV-transformed B cells. *International Immunology*, 1995, 7 (9), 1405-1416.
6. Jung T., Wijdenes J., Neumann C., de Vries JE., Yssel H., Interleukin-13 is produced by activated human CD45 RA+ and CD45 RO+ T cells: modulation by interleukin-4 and interleukin-12. *European Journal of Immunology*, 1996, 26 (3), 571-577.
7. Zhang JG., Hilton TA, McFarlane C, Roberts BA, Moritz RL, Simpson RJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA. Identification, purification and characterization of a soluble interleukin (IL)-13-binding protein. Evidence that it is distinct from the cloned IL-13 receptor and IL-4 receptor alpha-chains. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (14), 9474-9480.

8. Aman MJ, Tayebi N, Obiri NY, Puri RK, Modi WS, Leonard WJ. CDNA cloning and characterization of the human interleukin-13 receptor alpha chain. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 15, 271 (46), 2926-70.
9. Obiri NL, Leland P, Murata T, Debinski W, Puri RK, The IL-13 receptor structure differs on various cell types and may share more than one component with IL-4 receptor. *Journal of Immunology*, 1997, 158 (2), 756-
10. Kotowicz K, Callard RE, Friedrich K, Matthews DJ, Klein N. Biological activity of IL-4 and IL-13 on human endothelial cells: functional evidence that both cytokines act through the same receptor. *International Immunology*, 1996, 8 (12), 1915-1925.
11. Caput D, Laurent P, Kaghad M, Lelias JM, Lefort S, Vita N, Ferrara P. Cloning and characterization of a specific interleukin (IL)-13-binding protein structurally related to the IL-15 receptor alpha chain. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (28), 16921-16926.
12. Miloux B, Laurent P, Bonnin D, Lupker J, Caput D, Vita N, Ferrara P. Cloning of the human IL-13 R alpha-1 chain and reconstitution with the IL-4 R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. *FEBS Letters*, 1997, 401 (2-3), 163-166.
13. Schnyder B et al. Growth inhibition signalled through the interleukin-4/interleukin-13 receptor complex is associated with tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *Biochemical Journal*, 1996, 315 (Pt.3), 767-774.
14. Feny N et al., Characterization of interleukin-13 receptor in carcinoma cell lines and human blood cells and comparison with the interleukin-4 receptor. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 1995, 15 (7-8), 931-949.
15. Mura TA, et AL., Human ovarian carcinoma cell lines express IL-4 and IL-13 receptors: comparison between IL-4 and IL-13 induced signal transduction. *International Journal of Cancer*, 1997, 170 (2), 230-240.
16. Debinski W et al., Receptor for interleukin (IL)-13 does not interact with IL-4 but receptor for IL-4 interacts with IL-13 on human glioma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (37), 22428-22433.
17. Fujiwara H, Hanissian SH, Tsytsykova A, Githa PS. Homodimerization of the human interleukin-4 receptor alpha chain induces Cepsilon germline transcripts in B cells in the absence of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1997, 94 (11), 5866-5871.
18. Zurawski SM et al., The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (23), 13869-13878.
19. Matthews DJ, Hibbert L, Friedrich K, Minty A, Callard RE. X-SCID B cell responses to interleukin-4 and interleukin-13 are mediated by a receptor complex that includes the interleukin-4 receptor alpha chain (p140) but not the gamma chain. *European Journal of Immunology*, 1997, 27 (1), 116-121.
20. Obiri N et al., Receptor for interleukin-13. Interaction with interleukin-4 by a mechanism that does not involve the common gamma chain shared by receptors for interleukins 2, 4, 7, 9 and 15. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (15), 8797-87804.
21. Hilton DJ et al., Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin-13 receptor that is also a component of the interleukin-4 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93 (1), 497-501.
22. Gauchat JF, Schlagenhaut E, Feng NP, Moser R, Yamage M, Jeannin P, Alonani S, Elson G, Notarangelo LD, Eugster HP, Bonnefoy JY. *European Journal of Immunology*, 1997, 27 (4), 971-978.
23. Guo J, Apiou F, Mellerin MP, Lebeau B, Jaques Y, Minvielle S. *Genomics*, 1997, 42 (1), 141-145.
24. Murata T et al., Receptors for interleukin (IL)-4 do not associate with the common gamma chain, and IL-4 induces the phosphorylation of JAK2 tyrosine kinase in human colon carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (51), 30829-30836.
25. Murata T et al., IL-13 induces phosphorylation and activation of JAK2 Janus kinase in human colon carcinoma cell lines: similarities between IL-4 and IL-13 signaling. *Journal of Immunology*, 1996, 156 (8), 2972-2978.
26. Wang LM et al., The insulin receptor substrate-1-related 4PS substrate but not the interleukin-2R gamma chain is involved in interleukin-13 mediated signal transduction. *Blood*, 1995, 86 (11), 4218-4227.

27. Keegan AD et al., Similarities and differences in signal transduction by interleukin-4 and interleukin-13 : analysis of Janus kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92 (17), 7681-7685.
28. Takeda K et al., Impaired IL13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. *Journal of Immunology*, 1996, 157 (8), 3220-3222.
29. Lughfi SM et al., Tumor necrosis factor alpha enhances the expression of the interleukin (IL)-4 receptor alpha-chain in endothelial cells increasing IL-4 or IL-13-induced Stat 6 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (9), 5487-5494.
30. Adunyah SE et al., Interleukin-13 induces rapid tyrosine phosphorylation and activation of Raf-1 kinase in human monocytic progenitor cell line U937. *Biochem. And Biophys. Res. Commun.*, 1995, 206 (1), 103-111.
31. Palmer-Crocker RL et al., IL-4 and IL-13 activate the JAK2 tyrosine kinase and Stat 6 in cultured human vascular endothelial cells through a common pathway that does not involve the gamma chain. *Journal of Clinical Investigation*, 1996, 1, 98 (3), 604-9.
32. Ruco LP et al., Expression of ICAM-1 and VCAM-1 in human malignant mesothelioma. *Journal of Pathology*, 1996, 179 (3), 266-271.
33. Jahnsen FL et al., Expression of functional VCAM-1 by cultured nasal polyp-derived microvascular endothelium. *American Journal of Pathology*, 1997, 150 (6), 2113-2123.
34. Hamilos DL, Leung DY, Wood R, Boan DK, Song YL, Schotman E, Hamid Q. Eosinophil infiltration in nonallergic chronic hyperplastic sinusitis with nasal polyposis (CHS/NP) is associated with endothelial VCAM-1 upregulation and expression of TNF-alpha. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1996, 15 (4), 443-450.
35. Luttmann W, Knoechel B, Foerster M, Matthys H, Virchow JC Jr, Kroegel C. Activation of human eosinophils by IL-13. Induction of CD69 surface antigen, its relationship to messenger RNA expression, and promotion of cellular viability. *Journal of Immunology*, 1996, 157 (4), 1678-1683.
36. Horie S et al., Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Internal Medicine*, 1997, 36 (2), 179-185.
37. Humbert M, Durham SR, Kimuritt P, Powell N, Assouli B, Pfister R, Menz G, Kay AB, Corrigan CJ. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1997, 99 (5), 657-665.
38. Ying S, Meng Q, Barata LT, Robinson DS, Durham SR, Kay AR. Association between IL-13 and IL-4 (mRNA and protein), vascular cell adhesion molecule-1 expression and the infiltration of eosinophils, macrophages, and T cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *Journal of Immunology*, 1997, 158 (10), 5050-5057.
39. Girard D et al., Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions. *Journal of Leucocyte Biology*, 1996, 59 (3), 412-419.
40. Marie C, Pitton C, Fitting C, Cavaillon JM. IL-10 and IL-4 synergise with TNF-alpha to induce IL-1 gamma production by human neutrophils. *Cytokine*, 1996, 8 (2), 147-151.
41. Li H et al., IL-13 released by and localized in human basophils. *Journal of immunology*, 1996, 156 (12), 4833-4838.
42. Daepf GC et al., Human blood basophils produce interleukin-13 in response to IgE-receptor-dependent and-independent activation. *Blood*, 1996, 88 (8), 3028-3031.
43. Schroedere JT et al., Recombinant histamine-releasing factor enhances IgE-dependent IL-4 and IL-13 secretion by human basophils. *Journal of Immunology*, 1997, 159 (1), 447-452.
44. Dahinden CA, Rihs S, Oehsenberger B. Regulation of cytokine expression by human blood basophils. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1997, 113 (1-3), 134-137.
45. Jaffe JS, Raible DG, Post TJ, Wang Y, Glaum MC, Butterfield JH, Schuman ES. Human lung mast cell activation leads to IL-13 mRNA expression and protein release. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1996, 15 (4), 473-481.
46. Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilon RI, CD40L, IL-4, and IL-13 and can induce IgE synthesis in B cells. *Journal of Clinical Investigation*, 1997, 99 (7), 1492-1499.
47. Berkman N, Robichaud A, Krishnan VL, Roesem SG, Robbins R, Jose PJ, Barnes PJ, Chung KF. Expression of RANTES in human airway epithelial cells: effect of corticosteroids and interleukin-4, 10 and 13. *Immunology*, 1996, 87 (4), 599-603.

48. Marfaing-Koka A, Devergne O, Gorgone G, Portier A, Schall TJ, Galanaud P, Emilie D. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *Journal of Immunology*, 1995, 154 (4), 1870-1875.
49. Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Fujimoto M, Lindley I, Furusho K. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha selectively enhance immunoglobulin IgE and IgG4 production by human B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 1996, 182 (5), 2397-2402.
50. Jeannin P et al., CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferative and selective differentiation into IgE- and IgG4 producing cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (25), 15613-15619.
51. Fior R et al., Interleukin-13 gene expression by malignant and EBV transformed human B lymphocyte. *European Cytokine Network*, 1994, 5 (6),
52. Doherty et al., Modulation of murine macrophage function. *Journal of Immunology*, 1993, 151 (12), 7151-7160.
53. Nicoletti F et al., Prevention of endotoxin-induced lethality in neonatal mice by interleukin-13. *European Journal of Immunology*, 1997, 27 (6), 1580-1583.
54. Berkman N, John H, Roesems G, Jose P, Barnes PJ, Chung KF. Interleukin-13 inhibits macrophage inflammatory protein-1-alpha production from human alveolar macrophages and monocytes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1996, 15 (3), 382-389.
55. Isomaki P et al. The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its antiinflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 1996, 39 (10), 1693-1702.
56. Hart PH et al. Regulatory effects of IL-13 on synovial fluid macrophages and blood monocytes from patients with inflammatory arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*, 1995, 99 (3), 331-337.
57. Matsumoto K. Interleukin-13 inhibits cytokine secretion by blood monocytes from patients with IgA nephropathy. *Nephron*, 1997, 75 (3), 295-302.
58. Mijatovic T et al. Interleukin-4 and 13 inhibit tumor necrosis factor-alpha mRNA translational activation on lipopolysaccharide-induced mouse macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (22), 14394-14398.
59. DiPiro JT. Cytokine networks with infection: mycobacterial infections, leishmaniasis, human immunodeficiency virus infection and sepsis. *Pharmacotherapy*, 1997, 17 (2), 205-223.
60. Hatch WC, Freedman AR, Boldt-Houle DM, Groopman JE, Terwilliger EF. Differential effects of interleukin-13 on cytomegalovirus and human immunodeficiency virus infection in human alveolar macrophages. *Blood*, 1997, 89 (9), 3443-3450.
61. Brigino E, Haraguchi S, Koutsonikolis A, Cianciolo GJ, Owens U, Good RA, Day NK. Interleukin 10 is induced by recombinant HIV-1 Nef protein involving the calcium/calmodulin-dependent phosphodiesterase signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94 (7), 3178-3182.
62. Emilie D et al. Production and roles of IL-6, IL-10 and IL-13 in B-lymphocyte malignancies and in B-lymphocyte hyperactivity of HIV infection and autoimmunity. *Methods*, 1997, 11 (1), 133-142.
63. Lebel-Binay S et al. Experimental gene therapy of cancer using tumor cells engineered to secrete interleukin-13. *European Journal of Immunology*, 1995, 25 (8), 2340-2348.
64. Puri RK et al. Targeting of interleukin-13 receptor on human renal cell carcinoma cells by a recombinant chimeric protein composed of interleukin-13 and a truncated form of *Pseudomonas* exotoxin A (PE 38QQR). *Blood*, 1996, 87 (10), 4333-4339.
65. Blais Y et al. Interleukin-4 and interleukin-13 inhibit estrogen-induced breast cancer cell proliferation and stimulate GGCDF-15 expression in human breast cancer cells.
66. Serve H et al., Inhibition of proliferation and clonal growth of human breast cancer cells by interleukin-13. *Cancer Research*, 1996, 56 (15), 3583-3588.
67. Spahn JD, Szeffler SJ, Surs W, Doherty DE, Nimmagadda SK, Leung DYM. A novel action of IL-13 induction of diminished monocyte glucocorticoid receptor-binding affinity. *Journal of Immunology*, 1996, 157, 2654-2659.
68. Till S et al. IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN-gamma expression. *Immunology*, 1997, 91 (1), 53-57.

S U M A R

Prefața	3
INTERLEUKINA-2 (IL-2)	5
Receptorul interleukinei-2 (IL-2 R)	10
Lanțul gamma c al receptorului IL-2	11
Lanțul beta al receptorului IL-2	13
Lanțul alpha al receptorului IL-2.....	13
Transmiterea semnalului post-IL-2R	14
IL-2 și virusurile	15
IL-2 și cancerul	16
INTERLEUKINA-4 (IL-4)	23
IL-4, limfocitele T și alte tipuri celulare	25
IL-4 și limfocitele B	29
Receptorul IL-4 (IL-4R).....	31
IL-4 și HIV	34
IL-4 și cancerul	36
INTERLEUKINA-7 (IL-7)	43
Interleukina-7 și limfocitele T	43
Interleukina-7 și limfocitele B	46
Receptorul IL-7 (IL-7R)	47
IL-7 și calea de semnalizare Jak-STAT	50
IL-7 și epiteliul intestinal	51
IL-7 și virusurile	52
IL-7 și cancerul.....	53
INTERLEUKINA-9 (IL-9)	57
Receptorul IL-9 (IL-9R)	58
Semnalizarea IL-9 prin Jak-Stat	59
IL-9 și unele tipuri celulare	59
IL-9 și cancerul	60
INTERLEUKINA-15 (IL-15)	65
Receptorul IL-15 (IL-15R)	66
IL-15 și NK (Natural Killer)	68
IL-15 și diferite tipuri celulare	70
IL-15 și cancerul	71
IL-15 și HIV	73
INTERLEUKINA-13 (IL-13)	79
Efectul IL-13 asupra diferitelor tipuri celulare	83
Terapia cu IL-13	87



ISBN 973-575-316-2

Lei 12000