

# Messaggi del sistema immunitario

Marco Baggiolini

*Università di Berna - Università della Svizzera Italiana*

Negli ultimi anni mi è capitato qualche volta di presentare la mia attività di ricerca a lettori o ascoltatori con interessi culturali relativamente lontani dalle mie preoccupazioni scientifiche. Non mi sono mai avventurato, tuttavia, sulle pagine di una rivista di teologia e questo privilegio (che può essere minaccia per il lettore) lo devo a un'occasione che molto mi onora, quella di contribuire a un omaggio quasi letterario a un amico e maestro di vita.

Dal '96 le mie presenze in Ticino sono diventate più frequenti e soprattutto più pubbliche grazie all'Università. Parlare dell'Università sarebbe stato più facile. Ho deciso comunque a favore dell'immunologia perchè l'Università della Svizzera Italiana è opera degli studenti e dei docenti e la parola su questi temi non spetta necessariamente a me. La ricerca biologica, d'altra parte, ha fortemente determinato il mio percorso e mi è parso naturale attenermi al mio lavoro accademico.



## 1. UN PO' DI STORIA

Ho studiato medicina a Basilea con la ferma intenzione di prepararmi a curare dei pazienti, ma a confronto con la clinica, complessa e spesso imponderabile per uno studente, la mia "vocazione" cominciò a vacillare. Durante gli ultimi semestri avevo ormai rinunciato all'idea di fare il "dottore" e grazie all'insistenza di *Peter Dukor*, che era l'intellettuale fra i miei colleghi di studio, divenni assistente di biochimica. Feci così il mio apprendistato di ricercatore. Imparai a fare esperimenti, a sviluppare ed applicare tecniche di analisi, a valutare risultati. Poi ci fu il colpo di fortuna: divenni collaboratore di *Christian de Duve* alla Rockefeller University di New York. Erano gli anni Sessanta e la differenza fra i grandi laboratori negli Stati Uniti, a livello di risorse intellettuali e materiali, e quelli delle nostre università era enorme. Anche il clima accademico era molto diverso da quello che avevo lasciato.

Alla Rockefeller c'erano più professori che studenti. Il campus, un quadrilatero di forse cento per trecento metri fra lo East River e la York Avenue, era un parco di libertà intellettuale dove gli studenti e i postdocs erano i VIP. Il presidente, Detlev Bronk, ci conosceva tutti per nome e i professori compresi i più anziani e famosi (ricordo Dubos, Lippmann, Moore, Palade, Stein) erano straordinariamente accessibili, presenti, attenti ai minimi problemi della sperimentazione. La biblioteca era aperta tutto il giorno e tutta la notte e le finestre dei nostri laboratori (c'era sempre qualcuno al banco di lavoro) davano un costante apporto di luce alla notte dei quartieri residenziali di Manhattan.

A New York imparai la differenza fra "il bene e il male" nel mestiere che avevo deciso di fare. Imparai che la ricerca si deve concentrare per principio su problemi fondamentali. Imparai che un progetto è una scalata per la direttissima, da preparare in ogni particolare pensando anche all'eventualità di uno scacco e alle informazioni da ricavare quando l'ipotesi non si avvera. Principi ovvi, forse, ma che spesso non sono rispettati.

Il mio compito era di isolare i granuli dei neutrofili, i globuli bianchi che difendono il nostro organismo contro le infezioni batteriche, per determinarne la funzione. I granuli sono inclusioni caratteristiche di queste cellule e furono evidenziati per la prima volta nel secolo scorso dal famoso studioso tedesco Paul Ehrlich, usando coloranti anilini. La colorazione indicava che c'erano granuli di proprietà differenti ed Ehrlich aveva concluso che solo dopo averli isolati e caratterizzati "chimicamente" si sarebbe potuta capire la loro funzione. Questo progetto mi occupò per circa tre anni a New York e continuò con Beatrice Dewald e Ursula Bretz al mio ritorno a Berna. La Rockefeller University era all'avanguardia nella ricerca sui meccanismi delle funzioni dei leucociti nella difesa antibatterica e contava ricercatori di grandissima fama, fra loro James Hirsch e Zanvil Cohn, ambedue scomparsi, che ricordo con molto affetto e riconoscenza per il loro continuo supporto quando presi la direzione delle ricerche immunologiche della Sandoz.



Rimasi per 12 anni nell'industria farmaceutica con più di cento collaboratori a carico. Ero diventato un manager, ma avevo ancora un mio laboratorio e pubblicavo regolarmente. Grazie a questi interessi rimasi presente in ricerca e nell'83 fui richiamato all'università come direttore di un istituto di ricerca che ricorda Theodor Kocher, leggendario chirurgo e unico premio Nobel bernese.

Descrivo in queste pagine le fasi salienti della ricerca che ha definito la segnalazione molecolare del traffico dei leucociti nella difesa immunitaria e nell'infiammazione.

Questa ricerca cominciò nell'87 con la scoperta della prima di una lunga serie di molecole segnale, l'interleuchina-8, che venne identificata contemporaneamente da noi e da un gruppo di ricercatori americani. Da noi il lavoro si sviluppò rapidamente e coinvolse ben presto circa due terzi dell'Istituto con Beatrice Dewald, Marcel e Pius Loetscher, Bernhard Moser, Marcus Thelen, Mariagrazia Uguccioni, Alfred Walz e Marlene Wolf come ricercatori principali nonché numerosi studenti e ospiti stranieri e si avvale di numerose collaborazioni di cui ricordo soltanto la più intensa, con Ian Clark-Lewis dell'Università della British Columbia di Vancouver.

## 2. I LEUCOCITI

Prima dell'avvento degli antibiotici, le malattie infettive e le infezioni locali che sovente degeneravano in ascessi e setticemia, erano la principale causa di morte. I patologi del secolo scorso sapevano perfettamente che i leucociti lasciano il torrente circolatorio passando attraverso la parete dei vasi capillari, e si accumulano nei tessuti invasi da batteri. La ragione di questa migrazione rimase tuttavia oscura finché Elias Metschnikoff, uno zoologo russo attivo a Messina, dimostrò che i leucociti si comportano come le amebe: inglobano (fagocitano) i batteri e li degradano nel loro interno. È interessante che sia stato un biologo sperimentale e non un medico a dare la corretta interpretazione a quanto si osservava comunemente al microscopio e a chiarire il meccanismo della difesa antibatterica. La teoria sulla funzione dei leucociti nell'immunità, che valse a Metschnikoff il premio Nobel, è tutt'ora valida, come dimostrano le ricerche degli ultimi decenni che ne hanno svelato molti degli aspetti molecolari.

Circa un secolo dopo la scoperta di Metschnikoff alcuni ricercatori americani riuscirono ad isolare un "fattore chemiotattico", una sostanza secreta dai batteri che induce la migrazione dei leucociti, mostrando così come il sistema immunitario possa individuare e poi reprimere lo sviluppo di un'infezione. Chemiotassi significa migrazione in risposta a uno stimolo chimico. La sostanza prodotta dai batteri si diffonde localmente nei tessuti e all'interno dei loro vasi capillari. I leucociti la recepiscono come messaggio d'allarme, lasciano la circolazione e attratti nei tessuti da concentrazioni crescenti dello stimolo ne raggiungono l'origine.



### 3. LE CHEMOCINE

Dopo la scoperta dell'interleuchina-8, in circa un decennio, furono identificate in vari laboratori ben quaranta proteine di questo tipo. Sono state denominate chemochine per richiamare le loro proprietà chemiotattiche e attivatrici. Esse sono prodotte e secrete da vari tipi di cellule in tutti i tessuti. Certe caratteristiche strutturali, come la posizione invariata di quattro cisteine che mantengono la proteina nella conformazione attiva, permettono di identificare le chemochine come membri di un'unica famiglia di messaggeri cellulari.

Anche sotto l'aspetto funzionale questi messaggeri hanno importanti proprietà comuni come la capacità di attivare leucociti e di stimolarne la migrazione. Le prime due cisteine sono adiacenti (CC) o separate da un aminoacido (CXC) e questa piccola differenza permette di separare le chemochine e i loro rispettivi geni in due classi funzionalmente diverse.

Le chemochine agiscono legandosi a recettori esposti sulla superficie dei leucociti in numero che può variare da 1000 a 50'000 per cellula. Quando lega una chemochina il recettore si attiva e emette dei segnali biochimici all'interno della cellula che entra così in funzione. L'attivazione dipende dalla presenza del complesso fra chemochina e recettore. Se la chemochina si dissocia o il complesso viene internalizzato dalla cellula, il recettore si inattiva e la risposta cessa a meno che nuovi recettori vengano attivati.

Normalmente si valutano le funzioni delle chemochine su leucociti isolati. La chemiotassi, per esempio, si saggia in una camera a due compartimenti (uno contenente le cellule e l'altro una chemochina) separati da una membrana con fori microscopici attraverso i quali le cellule stimulate migrano dal compartimento superiore a quello inferiore. La migrazione è un fenomeno complesso che richiede dalla cellula movimenti coordinati e la facoltà di aderire al substrato sul quale essa avanza.

Con delle tecniche speciali si può mostrare la stimolazione dell'apparato motorio. I leucociti neutrofili rispondono all'interleuchina-8 formando propaggini cellulari che si allungano e si ritraggono regolarmente e ricordano i movimenti natatori di esseri unicellulari come le amebe. Le chemochine inoltre attivano certe proteine della membrana aumentando l'adesività dei leucociti, che possono così fissarsi sulla parete dei capillari prima di diffondersi nei tessuti. Le chemochine, infine, inducono il rilascio di sostanze che i leucociti impiegano per uccidere i batteri, come i radicali di ossigeno e l'acqua ossigenata, o per alimentare il processo infiammatorio ed eliminare strutture tissutali da esso danneggiate.

### 4. LA DIVERSIFICAZIONE DEL SISTEMA

All'inizio degli anni novanta era ormai evidente che studiando le chemochine saremmo arrivati a capire i principi della selettività nell'attivazione di vari tipi di leu-



cociti: neutrofili nelle infezioni batteriche, eosinofili nelle allergie, monociti nelle infiammazioni croniche, ecc. La chiave della selettività sta nell'espressione dei recettori. Ne sono già stati identificati quattordici, cinque per le chemochine di tipo CXC e ben nove per le chemochine di tipo CC. Di ognuno si conosce esattamente la selettività ed è dunque possibile interpretare chiaramente la genesi di patologie infiammatorie diverse sulla base delle chemochine presenti nel tessuto e dei recettori presenti sulle cellule infiltranti. Nelle infiammazioni allergiche delle vie respiratorie, per esempio, si osservano sovente infiltrazioni miste di eosinofili e linfociti. È noto che i linfociti producono fattori che stimolano gli eosinofili e ne prolungano la vita.

Analizzando piccoli frammenti di tessuto leso abbiamo recentemente osservato che in queste patologie i linfociti e gli eosinofili presentano un recettore comune, il CCR3, e possono dunque essere reclutati dalle stesse chemochine. Questa osservazione suggerisce nuove modalità terapeutiche: bloccando l'attività di un unico recettore sarebbe possibile ridurre selettivamente l'infiltrazione dei due tipi di leucociti che condizionano l'infiammazione allergica. I linfociti sono spesso preponderanti nelle infiammazioni croniche come la poliartrite.

In questo caso l'analisi del tessuto dimostra un altro recettore, il CCR5 e la totale assenza di CCR3. I linfociti presenti nelle lesioni artritiche sono dunque differenti da quelli che troviamo nelle allergie. Questo ci aiuta a capire le differenze della patologia e ci suggerisce altre modalità per un eventuale intervento terapeutico.

## 5. IL TRAFFICO NATURALE DEI LINFOCITI

I linfociti presentano una grande varietà di recettori per le chemochine, la cui espressione dipende dal loro stato funzionale e di attivazione. Ho già citato l'accumulo di sottopopolazioni con proprietà funzionali differenti nell'infiammazione allergica e nelle infiammazioni reumatiche. Recenti lavori dimostrano che le chemochine regolano anche l'afflusso fisiologico di linfociti nei tessuti linfatici.

Un esempio particolarmente interessante riguarda la chemochina chiamata BCA e il suo recettore, il CXCR5. L'interazione fra BCA e CXCR5 è esclusiva: non c'è altra chemochina che si lega a questo recettore e non c'è altro recettore che lega la BCA. In topi transgenici nei quali è stato eliminato il gene del recettore mancano i linfonodi addominali e la formazione del tessuto linfatico associato all'intestino è difettosa. Nel tessuto umano troviamo la chemochina BCA unicamente nelle zone popolate da linfociti B e il suo recettore unicamente in questo tipo di linfociti che vengono così attratti nel tessuto al quale sono destinati.

Un altro notevole esempio del coinvolgimento della chemiotassi in funzioni estranee all'infiammazione è quello della chemochina chiamata SDF e del suo recettore, il CXCR4. Anche in questo caso la relazione fra chemochina e recettore è esclusiva. Lavori su topi transgenici mostrano che la delezione del gene della chemochina o



del gene del recettore hanno le stesse conseguenze: difetti multipli del sistema cardiovascolare. Si pensa sulla base di questi risultati che certe chemochine possano attrarre cellule embrionali destinate a formare un'unità funzionale, come la parete dei vasi capillari nel caso specifico.

## 5. CO-RECETTORI PER IL VIRUS DELL'AIDS

Alla fine del '95 apparve nella rivista "Science" un sorprendente articolo di Paolo Lusso, Robert Gallo e colleghi che descriveva tre chemochine, RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ , come fattori prodotti da linfociti e capaci di sopprimere l'infezione da parte del virus dell'Aids. La mia prima reazione, abbastanza tipica per un ricercatore assillato dagli affari suoi, fu di pensare che si trattasse di uno sbaglio. Ebbi tuttavia la modestia e l'avvedutezza di non lasciar perdere.

Contattai Fernando Arenzana e Jean Louis Virelizier, due noti ricercatori dell'Istituto Pasteur di Parigi, e inviai loro una ventina di chemochine oltre alle tre descritte da "Science" da saggiare come inibitori del famoso virus. Dopo qualche settimana arrivarono risultati che erano in perfetto accordo con dati pubblicati: l'infezione veniva inibita da RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ , ma da nessuna delle altre chemochine che erano state analizzate.

Pochi mesi dopo: altra notizia sensazionale. Edward Berger e i suoi colleghi al National Institute of Health di Bethesda dimostrano che un recettore simile a quelli delle chemochine funge da sito di legame per il virus dell'Aids.

Si sapeva da una decina d'anni che per infettare una cellula il virus si deve legare specificamente sulla sua membrana, e che una proteina della superficie cellulare, che è tipica per i linfociti e si chiama CD4, era coinvolta. Era pure chiaro, tuttavia, che il CD4 da solo non bastava. Berger aveva apparentemente identificato un sito che complementava la funzione del CD4. Era semplice, a questo punto, tirare le conclusioni: dato che il virus si lega a un recettore per le chemochine l'effetto inibitore di RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  era probabilmente dovuto a competizione. Nel corso di poche settimane non meno di cinque gruppi di ricerca identificarono il recettore comune alle tre chemochine, il CCR5, e ne dimostrarono la funzione di sito di legame del virus, legame bloccato in presenza di RANTES, MIP-1 $\alpha$  o MIP-1 $\beta$ . Di colpo si era aperta una nuova possibilità nella terapia dell'Aids.

La funzione del recettore clonato da Berger, tuttavia, non era chiara, e il problema immediato era di trovare la chemochina che lo attiva. Eravamo in una posizione di vantaggio perchè questo recettore, senza che se ne sospettasse la funzione nell'Aids, era stato clonato due anni prima da Marcel Loetscher nel nostro Istituto.

Analizzammo tutte le chemochine a disposizione e ne trovammo una sola con le proprietà desiderate, l'SDF, e in collaborazione con il gruppo dell'Istituto Pasteur dimostrammo che anche questa chemochina blocca l'infezione. Il recettore fu denomi-



nato CXCR4. In base all'affinità per il CCR5 o il CXCR4 si distinguono oggi inequivocabilmente due tipi di virus denominati R5 e X4. I virus di tipo R5 predominano nella fase iniziale dell'infezione quando il paziente è sieropositivo, ma non ancora clinicamente ammalato, mentre i virus di tipo X4 prendono il sopravvento nella fase conclamata della malattia.

È ragionevole considerare l'uso di chemochine per inibire l'infezione sapendo che esse attivano i leucociti e possono dunque indurre sequele infiammatorie? Per rispondere a questa domanda abbiamo paragonato l'effetto protettivo di una chemochina naturale, il RANTES, e di un suo derivato, un cosiddetto antagonista, che si lega al recettore, ma non lo attiva. L'antagonista si rivelò efficace dimostrando che è sufficiente occupare il recettore per impedire l'accesso del virus e che qualsiasi sostanza, chemochina o no, capace di bloccare il recettore è potenzialmente interessante.

Sono infatti apparsi recentemente vari lavori che mostrano l'efficacia antivirale di molecole molto più piccole delle chemochine e dei loro derivati, e dunque più facili da sintetizzare e da somministrare. La ricerca di nuovi inibitori aprirà senza dubbio e presto nuove possibilità terapeutiche anche per le malattie infiammatorie, certe forme di infiammazione allergica e per la prevenzione del rigetto d'organi trapiantati.

## 6. PASSATO E PRESENTE

Non molto avvezzo alle celebrazioni, ho scritto le parole come venivano usando poi abbondantemente una grossa matita rossa virtuale per stralciare, strumento di igiene personale che ho poi dovuto abbandonare per evitare di stralciare tutto. L'esercizio che ho fatto, pensando all'amico che onoriamo e pensando a me, è diventato una specie di esame di coscienza nel quale le omissioni mi appaiono come le colpe più gravi.

Tre decenni di ricerca su cose che perlopiù non si vedono nemmeno al microscopio, ma che pur spiegano una funzione fondamentale del nostro organismo: la difesa in un mondo fatto di microbi dalle risorse inverosimili. Consiglierei a un giovane amico di far lo stesso? Non dissuaderei nessuno, perché il lavoro con le tecniche di oggi, pur rimanendo artigianale, è diventato affascinante, più intellettuale e più aperto a successi concreti. Farei tuttavia notare il rischio per il ricercatore di rimanere a lungo e forse per tutta la carriera dietro le quinte di un teatro con la scena zeppa di attori e gli scenari che cambiano a dispetto del copione.

Lo stile della ricerca biologica oggi assomiglia solo lontanamente a quello degli anni sessanta, quando il lavoro era spesso affidato a ricercatori singoli, studenti o giovani assistenti che sotto la guida di un professore potevano dedicarsi a progetti di grande respiro. I campi erano suddivisi in base a temi biologici e a specifiche esperienze di lavoro. Oggi invece la partitura è il DNA. Centinaia di migliaia di sequenze sono accessibili a tutti attraverso le banche dati e il vantaggio per lo specialista o per chi



apre un filone nuovo è sovente minimo. Lo studioso solitario è rarissimo e anche nell'ambito di un unico istituto la ricerca procede con l'apporto coordinato di gruppi di superspecialisti.

Le tecniche di biologia molecolare conferiscono grande precisione e trasparenza al lavoro e le idee interessanti sono subito seguite, globalmente, da chi si trova sulla stessa pista. La maturità della tecnica ci ha fatto diventare più concreti, più lineari nelle nostre ipotesi, più efficienti, ma anche meno divertenti e divertiti.