

**Alma Mater Studiorum
Università degli Studi di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA
CLINICA E SPERIMENTALE ED
EMOLINFOPATOLOGIA**

XXII ciclo

Settore Scientifico Disciplinare di Afferenza: MED/15

**L'ESPRESSIONE DELL'ENZIMA INDOLEAMINA 2,3-
DIOSSIGENASI COME MECCANISMO
IMMUNOREGOLATORIO IN CELLULE
DENDRITICHE NORMALI E LEUCEMICHE**

Presentata da: **Dott.ssa Sara Trabanelli**

Coordinatore Dottorato

Prof. Stefano Pileri

Relatore

Prof. Roberto M. Lemoli

Esame finale anno 2010

Indice

SOMMARIO

INTRODUZIONE

I. TOLLERANZA IMMUNOLOGICA E TUMOR ESCAPE

II. L'ENZIMA INDOLEAMINA 2,3-DIOSSIGENASI

1. *"Tryptophan depletion theory"*
2. Indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO)
3. Regolazione dell'espressione di IDO
4. Popolazioni cellulari esprimenti IDO
5. Funzione biologica di IDO
 - IDO come induttore di tolleranza
 - IDO come meccanismo contro-regolatorio
6. Meccanismi di soppressione della risposta T cellulare mediati da IDO
 - Azione diretta mediata su linfociti T
 - Azione indiretta mediata da APCs
 - Effetto *bystander*
7. Implicazioni cliniche

III. LE CELLULE DENDRITICHE

1. Le cellule dendritiche (DC)
2. DC e induzione della tolleranza: il ruolo di IDO
3. IDO nelle DC dei linfonodi drenanti il tumore

4. DC IDO⁺ e la capacità di sopprimere la risposta T cellulare

IV. I LINFOCITI T REGOLATORI

1. I linfociti T regolatori (Treg)
2. Ruolo di IDO nell'induzione di Treg

V. LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

1. La leucemia mieloide acuta
2. Le cellule dendritiche leucemiche

MATERIALI E METODI

1. Cellule
2. Separazione di cellule mononucleate da sangue periferico
3. Separazione immunomagnetica
4. Citofluorimetria
5. Generazione di DC da monociti sani e di AML-DC da blasti leucemici
6. Maturazione delle DC e delle AML-DC
7. Reazioni di PCR qualitativa
8. Reazioni di PCR quantitativa
9. Western blotting
10. Immunocitochimica
11. Valutazione dell'attività enzimatica di IDO
12. Test di proliferazione dei linfociti T
13. Induzione dei linfociti T regolatori (Treg)

14. Valutazione della capacità soppressiva dei Treg
15. Inibizione della risposta anti-leucemica CD4⁺
16. Inibizione della risposta anti-leucemica CD8⁺

RISULTATI

I. ESPRESSIONE E FUNZIONE DI IDO NELLE mo-DC

1. Il differenziamento da monocita a mo-DC
2. Up-regolazione di IDO durante la maturazione delle mo-DC
3. IDO, espresso dalle mo-DC mature, inibisce la proliferazione di linfociti T allogenici e autologhi
4. Espressione di IDO2 in mo-DC mature
5. IDO aumenta la capacità delle DC mature di generare cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ allogeniche e autologhe
6. Le cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ generate dalle mo-DC IDO⁺ sono linfociti T regolatori (Treg)
7. Ruolo della PGE₂ nell'up-regolazione di IDO nelle mo-DC mature

II. ESPRESSIONE E FUNZIONE DI IDO IN DC DERIVATE DA CELLULE CD34⁺

1. Il differenziamento da precursore CD34⁺ a DC
2. Espressione e funzione di IDO in DC derivate da cellule CD34⁺

III. ESPRESSIONE E FUNZIONE DI IDO NELLE AML-DC

1. Il differenziamento da blasto ad AML-DC
2. Up-regolazione di IDO nelle AML-DC

3. IDO, espresso dalle AML-DC, inibisce l'alloproliferazione di linfociti T
4. IDO aumenta la capacità delle AML-DC di generare T regolatori (Treg)
5. Treg indotti da AML-DC inibiscono la risposta CD4⁺ anti-leucemica
6. Treg indotti da AML-DC inibiscono la risposta CD8⁺ anti-WT-1

DISCUSSIONI

BIBLIOGRAFIA

Sommario

L'enzima indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO) catalizza la conversione dell'aminoacido essenziale triptofano in chinurenine. Questa proprietà conferisce a IDO la capacità di inibire la risposta immunitaria sia causando la deplezione dal microambiente di triptofano, che è necessario ai linfociti T per proliferare ed espandersi, sia producendo metaboliti che possono causare l'apoptosi dei linfociti T.

Nel presente studio è stata indagata la funzione di IDO in cellule dendritiche normali e leucemiche.

Lo studio dell'espressione di IDO in cellule dendritiche normali ha permesso di osservare che, quando immature, IDO è poco espresso, mentre durante la maturazione IDO viene up-regolato. In particolare, l'incremento nell'espressione di IDO non è strettamente legato al livello di maturazione, ma alla qualità dello stimolo maturativo. Infatti uno stimolo endogeno come il ligando di CD40 ha una scarsa efficacia nell'up-regolazione di IDO, uno stimolo batterico come l'LPS ha un'efficacia intermedia, mentre uno stimolo rappresentato da citochine pro-infiammatorie ha un'efficacia massima. L'espressione di IDO risulta direttamente proporzionale alla produzione di chinurenine, all'inibizione della proliferazione dei linfociti T e all'induzione di una popolazione di linfociti T regolatori.

Lo studio dell'espressione di IDO in cellule dendritiche leucemiche ha permesso di osservare che IDO è espresso a un livello intermedio nelle cellule dendritiche leucemiche immature e viene up-regolato durante la maturazione. La conseguenza principale dell'espressione di IDO in cellule dendritiche leucemiche è l'induzione di una popolazione di linfociti T regolatori fortemente in grado di limitare sia la risposta CD4⁺ che la risposta CD8⁺ anti-leucemica e capaci di inibire la maturazione di altre cellule dendritiche.

Nel complesso, i dati emersi da questo studio hanno permesso di concludere che, in cellule dendritiche normali, IDO rappresenta un meccanismo tollerogenico la cui intensità di espressione è correlata all'intensità dello stimolo attivatorio da controbilanciare, a cui è sottoposta la cellula dendritica. Nelle cellule dendritiche leucemiche IDO rappresenta un meccanismo di *tumor-escape* in grado di inibire l'attivazione di cellule dendritiche, linfociti CD4⁺ e linfociti CD8⁺.

Introduzione

I. Tolleranza immunologica e tumor escape

Il sistema immunitario rappresenta un prodotto dell'evoluzione estremamente specializzato e complesso. La sua funzione è quella di proteggere l'organismo dall'attacco di agenti patogeni (detti antigeni) mediante la sintesi di molecole altamente specializzate (gli anticorpi) e la generazione di elementi cellulari (linfociti e fagociti) che contrastano e distruggono gli antigeni.

Osservazioni effettuate sia nei pazienti che nei modelli sperimentali hanno chiaramente dimostrato che i tumori sono in grado di evocare una risposta immunitaria.

Agli inizi del 1900, Paul Ehrlich postulò che cellule fetali aberranti, capaci di dar luogo a tumori, fossero continuamente eliminate ad opera del sistema immunitario grazie all'esposizione, sul loro plasmalemma, di molecole antigeniche contro le quali l'ospite può produrre una risposta anticorpale sufficiente ad eliminare gli elementi neoplastici.

Cinquant'anni più tardi Thomas sviluppò l'ipotesi che nel corso dell'evoluzione della specie, lo sviluppo dell'immunità cellulare venisse stimolato dalla necessità di rigettare le cellule maligne insorte per mutazione somatica.

La forma più radicale di controllo immune fu sviluppata da Burnet nel corso degli anni '70, sotto la spinta della scoperta dei meccanismi immunologici del rigetto dei trapianti da parte dei linfociti T, ed è nota come "Teoria dell'immunosorveglianza".

Il concetto di immunosorveglianza, proposto da Burnet prevede che una delle funzioni fisiologiche del sistema immunitario sia quella di riconoscere e distruggere i cloni di

cellule trasformate prima che esse possano crescere e formare tumori, nonché di eliminare tumori una volta che essi si siano generati. Spesso l'importanza della sorveglianza immunologica è stata messa in dubbio dalle risultanze di alcuni studi. Oggi sappiamo che il sistema immunitario risponde veramente alla generazione e crescita di numerosi tumori.

La prova dell'esistenza di un processo di immunosorveglianza all'interno di un organismo umano è data dall'aumentata incidenza di neoplasie in soggetti immunodeficienti. Circa il 5% delle persone affette da immunodeficienza congenita sviluppa neoplasie con una prevalenza 200 volte superiore a quella attesa. Molte neoplasie si sviluppano comunque in persone che non soffrono di immunodeficienze manifeste. E' quindi evidente che le cellule tumorali devono sviluppare dei meccanismi che consentano loro di sfuggire o di eludere il sistema immunitario anche di un ospite immunocompetente.

Queste osservazioni hanno portato a rivedere, almeno in parte, il concetto di immunosorveglianza e ad includerlo nell'ambito di un fenomeno molto più complesso di interazione tra sistema immunitario e cellule tumorali definito di *immunoediting*, secondo il quale esisterebbe una sorta di rimodellamento continuo delle caratteristiche antigeniche del tumore da parte del sistema immunitario dell'ospite. La risposta immunitaria dell'ospite, eliminando cellule ad alta immunogenicità, favorirebbe, di fatto, la selezione dei cloni tumorali dotati di una maggiore resistenza ai meccanismi di difesa dell'ospite stesso.

L'instabilità genetica, tipica dei tumori maligni, costituisce, ovviamente, un prerequisito fondamentale che sottostà all'eterogeneità antigenica, e non solo, dei vari cloni tumorali su cui sembra agire la selezione operata dal sistema immunitario.

Nell'ambito del fenomeno di *immunoediting*, a sua volta, si distinguono tre fasi nell'interazione tra tumore e ospite: 1) l'eliminazione dei cloni fortemente immunogenici, che corrisponde al concetto classico di immunosorveglianza; 2) l'instaurarsi di una fase di apparente equilibrio, in cui il sistema immunitario seleziona varianti tumorali con aumentata capacità di resistere alla risposta immunitaria; 3) l'*escape*, il processo attraverso il quale i cloni tumorali rimodellati dal sistema immunitario si espandono in modo incontrollato portando allo sviluppo di un tumore clinicamente evidente in un ospite immunocompetente (Dunn et al., 2002).

L'evasione della risposta immunitaria da parte del tumore, o *tumor-escape*, è considerata un evento indispensabile per la crescita e la progressione tumorale anche se gli esatti meccanismi genetici e molecolari che ne sono alla base non sono stati ancora completamente chiariti. Uno dei principali obiettivi dell'immunologia dei tumori è quello di comprendere le vie attraverso cui le cellule tumorali riescono a sottrarsi alla distruzione da parte del sistema immunitario, nella speranza di individuare strategie atte ad aumentare l'immunogenicità dei tumori e la risposta dell'ospite.

I principali meccanismi finora individuati che le cellule tumorali mettono in atto per eludere le difese immunitarie sono: 1) la perdita o riduzione dell'espressione sulla superficie cellulare di molecole di istocompatibilità, in cui le cellule tumorali possono non riuscire ad esprimere i normali livelli di HLA di classe I, sfuggendo all'attacco dei linfociti T citotossici; 2) la perdita di antigeni tumorali fortemente immunogenici, favorita dall'instabilità genetica del tumore, durante la quale mutazioni o delezioni a carico dei geni che codificano antigeni tumorali non essenziali per la crescita e/o il mantenimento del fenotipo tumorale, creano un vantaggio di crescita nelle cellule che ne hanno perduto l'espressione; 3) perdita di co-stimolazione: le cellule tumorali

spesso non presentano molecole co-stimolatorie, pur presentando peptidi antigenici in associazione a molecole HLA di classe I. Questo fenomeno non solo previene la sensibilizzazione, ma può rendere anche i linfociti T anergici, cioè incapaci di reagire, o indurli ad andare in apoptosi; 4) fattori prodotti dalle cellule tumorali in grado di sopprimere la risposta immunitaria, come il TGF- β , in grado di inibire la proliferazione e le funzioni effettrici dei linfociti e dei macrofagi, o il Fas L, in grado di uccidere i linfociti T che esprimono Fas.

La maggior parte dei tumori che si sviluppano anche in ospiti immunocompetenti, pur mantenendo l'espressione di antigeni tumorali potenzialmente in grado di provocarne il rigetto in ospiti preimmunizzati, suscita, nell'ospite naturale, una risposta immunitaria debole o addirittura assente. A conferma di tali osservazioni, è ormai noto da tempo che, nonostante l'antigenicità di una proteina costituisca un requisito necessario, spesso non è sufficiente a garantirne l'immunogenicità.

La tolleranza immunologica si definisce come uno stato di non responsività ad un antigene, indotto da una precedente esposizione a quello stesso antigene. La tolleranza agli antigeni *self* rappresenta una caratteristica fondamentale del sistema immunitario normale: la mancata tolleranza al *self* si traduce nello sviluppo di risposte immunitarie verso gli antigeni autologhi e, di conseguenza, nell'instaurarsi di malattie autoimmuni. La tolleranza al *self* può essere indotta negli organi linfoidi primari a seguito del riconoscimento degli antigeni *self* da parte di linfociti autoreattivi immaturi (fenomeno definito "tolleranza centrale") o negli organi linfoidi periferici, a seguito dell'incontro di linfociti maturi autoreattivi con antigeni *self* in particolari condizioni (definito "tolleranza periferica").

La tolleranza centrale si verifica perché tutti i linfociti, nel corso della loro maturazione negli organi linfoidi primari, passano attraverso uno stadio in cui l'incontro con l'antigene porta alla tolleranza piuttosto che all'attivazione.

La tolleranza periferica si genera grazie al riconoscimento degli antigeni in assenza di un livello adeguato di costimolazione o grazie ad una persistente e ripetuta stimolazione per opera degli antigeni autologhi a livello dei tessuti periferici.

I meccanismi principali alla base della tolleranza linfocitaria sono: 1) la morte cellulare per apoptosi, chiamata "delezione clonale"; 2) l'inattivazione funzionale della cellula, chiamata "anergia clonale"; 3) la soppressione dell'attivazione linfocitaria e delle funzioni effettrici per opera di linfociti ad azione regolatrice (Abbas et al., 2000).

La delezione clonale può essere causata dalla ripetuta stimolazione dei linfociti attivati da parte di antigeni persistenti. L'attivazione dei linfociti, infatti, porta alla co-espressione di due molecole: un recettore capace di trasdurre un segnale di morte cellulare, chiamato Fas ed il suo ligando.

L'anergia clonale, invece, è un fenomeno che si può verificare quando un peptide antigenico è presentato in assenza di molecole costimolatorie o quando linfociti T specifici per un determinato antigene vengono in contatto con una forma mutata dell'antigene.

Alcune risposte immunitarie vengono inibite da linfociti T soppressori, che producono citochine in grado di bloccare l'attivazione e le funzioni dei linfociti T effettori. Questi linfociti si caratterizzano per la capacità di rilasciare citochine anti-infiammatorie, quali TGF- β , IL-10, IL-4 e IL-13 (Jang e Chess, 2004; O'Garra e Vieira, 2004).

Quest'ultimo meccanismo, scoperto solo di recente, sembra assumere un'importanza particolare nel mantenimento della tolleranza anche nei confronti di antigeni *non self* quali, ad esempio, quelli tumorali, ed è tuttora oggetto di numerosi studi. A tal

proposito, nel 1995 Sakaguchi ha dimostrato per la prima volta che l'attività regolatoria è propria soltanto di una particolare popolazione di cellule T con fenotipo CD4⁺CD25⁺, definita Tregs.

Nonostante i meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno di tolleranza periferica verso antigeni tumorali non siano stati completamente chiariti, vi sono forti evidenze che tale tolleranza sia alla base del processo di *tumor-escape*, indispensabile per lo sviluppo e la crescita tumorale in organismi immunocompetenti. Numerosi studi hanno peraltro messo in evidenza che i tumori possono essere ben tollerati a livello locale nonostante la presenza a livello sistemico di linfociti T tumore-specifici. La crescita incontrollata di tali tumori dimostra che l'immunosoppressione non deve necessariamente essere sistemica per essere efficace. se, infatti, nei linfonodi drenanti il tumore, si crea uno stato di anergia locale, questo può essere sufficiente a garantire l'assenza di risposte immunitarie verso il tumore (Munn et al., 1995).

Tra i meccanismi studiati alla base del fenomeno di tolleranza verso antigeni tumorali, è stata recentemente proposta l'espressione dell'enzima indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO) da parte delle cellule tumorali stesse o da parte di *antigen presenting cells* (APCs) che presentano antigeni tumorali ai linfociti T dell'ospite.

II. L'enzima indoleamina 2,3-diossigenasi

1. "Tryptophan depletion theory"

Nel corpo umano, il triptofano, l'aminoacido essenziale meno abbondante in natura, può andare in contro a tre diversi destini: 1) partecipare alla biosintesi proteica, 2) partecipare alla biosintesi della serotonina, 3) essere catabolizzato. Nel corpo umano, la maggior parte del metabolismo del triptofano avviene lungo la via delle chinurenine (Fig. 1) che porta alla sintesi, come ultimo prodotto, di nucleotina adenina dinucleotide (NAD).

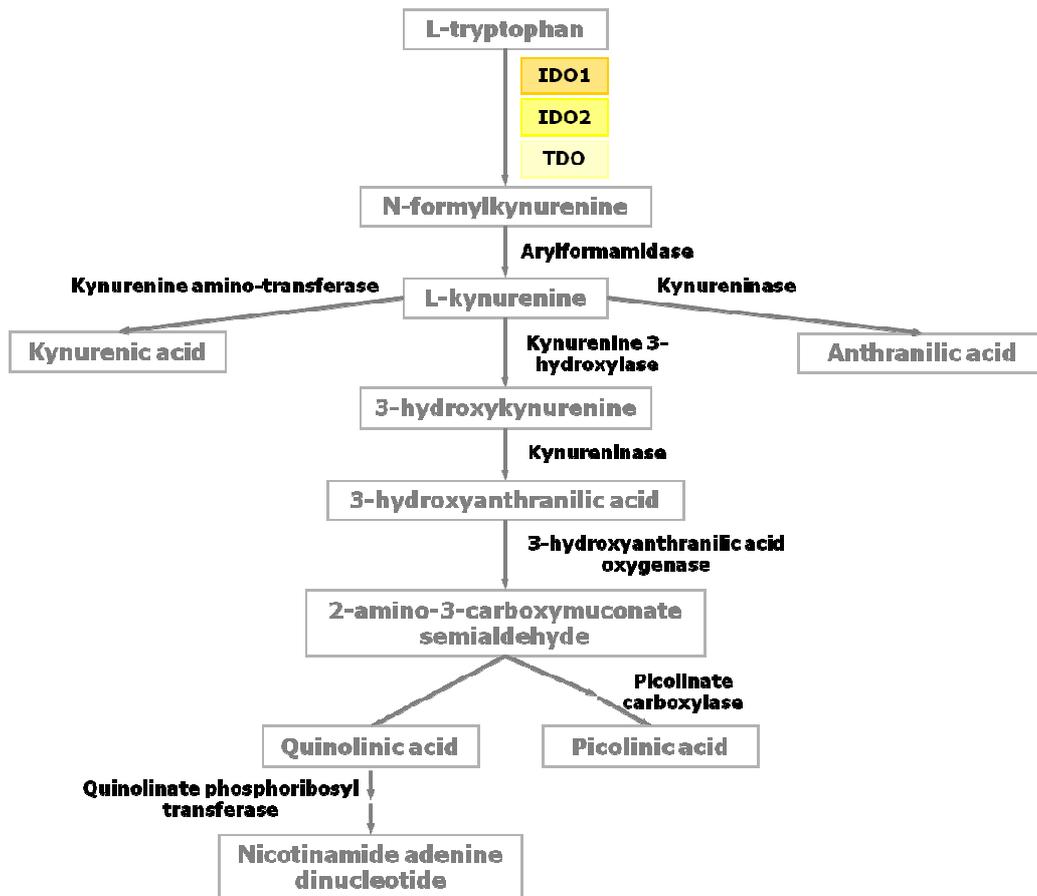


Fig. 1. Degradazione del triptofano lungo la via delle chinurenine

La reazione iniziale, che viene considerata il *rate-limiting step* nella degradazione del triptofano, è costituita dall'ossidazione del L-triptofano a N-formil-L-chinurenina ed è catalizzata dall'enzima epatico triptofano 2,3-diossigenasi (TDO) o dall'enzima ubiquitario extraepatico indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO).

Diversi studi hanno mostrato come la concentrazione di triptofano e dei suoi metaboliti siano in grado di modulare l'attività del sistema immunitario. Una concentrazione elevata di triptofano, ad esempio, causa l'accumulo anormale di leucociti nei tessuti, mentre la deplezione del triptofano sopprime la proliferazione cellulare e, perciò, avere effetti immunomodulatori o anti-microbici.

Nel 1984, Pfefferkorn, usando colture tissutali, dimostrò che la crescita di un parassita extracellulare, il *Toxoplasma gondii*, poteva essere inibita dall'induzione di IDO mediata dall'IFN- γ e che questa capacità di protezione correlava con la diminuzione della concentrazione di triptofano nel mezzo di coltura. Egli inoltre trovò nel mezzo di coltura N-formil-chinurenina e chinurenina, ma a livelli troppo bassi per poter avere effetti biologici. D'altra parte, aggiungendo questi due metaboliti alla coltura, osservò una diminuzione nella crescita del parassita.

Infatti, anche i prodotti che derivano dal metabolismo del triptofano, nel microambiente cellulare, possono essere biologicamente attivi e modulare diversi processi. Ad esempio, l'acido quinolinico agisce da agonista per il recettore del glutammato attivato dall' N-metil-D-aspartato (NMDA) (Perkins e Stone, 1983).

Molti altri studi *in vitro* hanno dimostrato che la deplezione del triptofano è implicata nelle risposte del sistema immunitario. Ad esempio, l'induzione di IDO nelle cellule dell'endotelio da parte dell'IFN- γ causa l'arresto della crescita batterica durante le infezioni da stafilococco. Inoltre, in alcuni tipi di tumore si è visto che l'induzione di IDO IFN- γ -mediata depriva il tumore di triptofano e ne rallenta la crescita. Ma è

anche stato dimostrato che l'espressione di IDO da parte di cellule tumorali ne facilita l'evasione dalla risposta T. Nella maggior parte di questi studi, riportando il triptofano a concentrazioni fisiologiche nel mezzo di coltura, si ripristinava la crescita di cellule tumorali, batteri e parassiti intracellulari, supportando la teoria della deplezione del triptofano.

Nonostante grandi evidenze *in vitro* a supporto della "teoria della deplezione del triptofano", bisogna considerare diversi fattori a sfavore di tale teoria. Il primo è che la maggioranza dei batteri può sintetizzare autonomamente il triptofano e può riprodursi anche in assenza di tale aminoacido. Quindi, per i batteri, il triptofano non è un aminoacido essenziale, ma è essenziale per le cellule coinvolte nella risposta immunitaria contro i batteri. Inoltre nei siti di infezione aumenta la morte cellulare sia per necrosi che per apoptosi, con conseguente proteolisi e rilascio degli aminoacidi. E' difficile pensare che in tale contesto IDO possa avere un ruolo cruciale nel controllare la concentrazione locale di triptofano. A sfavore della teoria della deplezione del triptofano c'è anche l'evidenza che molti patogeni sono in grado di avvertire e rispondere alle variazioni nella concentrazione del triptofano up-regolando l'espressione genica degli enzimi coinvolti nella sintesi di questo aminoacido. Le difficoltà maggiori che non permettono di provare la teoria della deplezione del triptofano sono costituite dal fatto che la grande maggioranza degli studi è stata condotta *in vitro* e che spesso la situazione *in vitro* non rispecchia quella *in vivo*. D'altra parte gli studi condotti *in vivo* hanno mostrato che durante la risposta immunitaria non è cruciale solo la diminuzione della concentrazione del triptofano, ma anche la produzione dei suoi metaboliti. Infatti, *in vivo*, in molti tessuti, alcuni metaboliti della via delle chinurenine sono attivi sulle cellule del sistema immunitario, tra cui le chinurenine, il 3-idrossi-antranilato e il quinolinato.

Si può concludere che alla teoria della deplezione del triptofano si sostituisce la più corretta “teoria dell’utilizzo del triptofano”, composta quindi non solo dalle conseguenze che comporta la deplezione di triptofano, ma anche da quelle derivate dall’aumento dei suoi metaboliti.

2. *Indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO)*

Mentre l’espressione dell’enzima triptofano 2,3-diossigenasi (TDO) sembra essere limitata al fegato e non è indotta o regolata da segnali di tipo immunitario, quella dell’enzima indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO) è stata rinvenuta in diversi tipi cellulari ed è regolata da segnali derivanti dalle cellule del sistema immunitario.

IDO fu scoperto dal gruppo di Hayaishi nell’intestino di coniglio come una diossigenasi contenente un gruppo eme, che mostrava specificità per un’ampia varietà di indoleamine tra cui l’L-triptofano e la serotonina (Yasui et al., 1986).

La proteina IDO matura è un monomero contenente il gruppo eme come unico gruppo prostetico. E’ codificata da un gene di 10 esoni di 15 kbp di DNA localizzato, sia nell’uomo che nel topo, sul cromosoma 8 (Mellor et al., 2004). La sequenza primaria di IDO umano mostra solo il 57% di identità con la sequenza murina. Il cDNA umano di IDO codifica una proteina di 403 aminoacidi, con un peso molecolare di 45 kDa. La struttura terziaria di IDO umano è stata definita nel 2006 da Sugimoto utilizzando la cristallografia a raggi X. IDO è formata da due domini distinti ripiegati ad alfa elica, uno più piccolo e uno più grande, con il gruppo prostetico eme posizionato tra loro (Fig. 2). Il gruppo eme è essenziale per l’attività enzimatica di IDO.

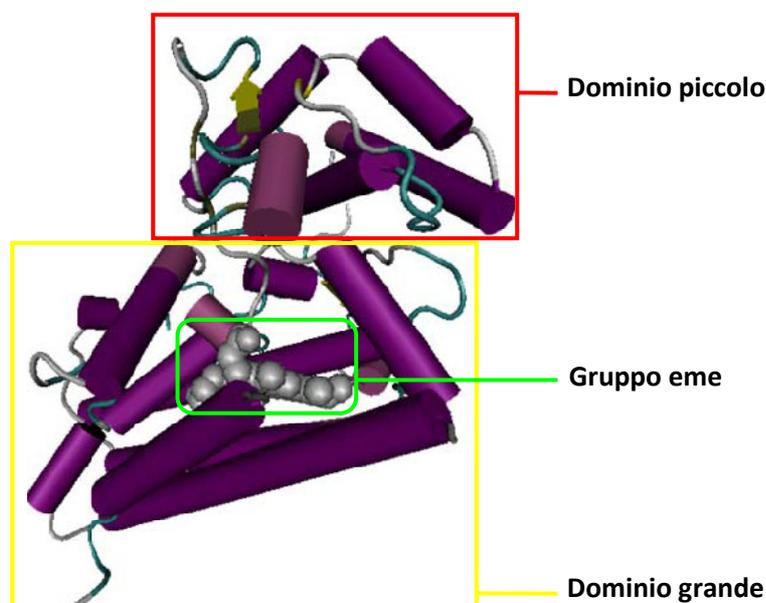


Fig. 2. Struttura della proteina IDO

IDO viene sintetizzato in uno stato inattivo, con il gruppo eme presente come ione ferrico. L'attivazione richiede la perdita di un singolo elettrone che permette il passaggio da ione ferrico a ione ferroso e che facilita il legame dell'L-triptofano e dell'O₂ al sito attivo dell'enzima (Thomas e Stocker, 1999) (Fig. 3).

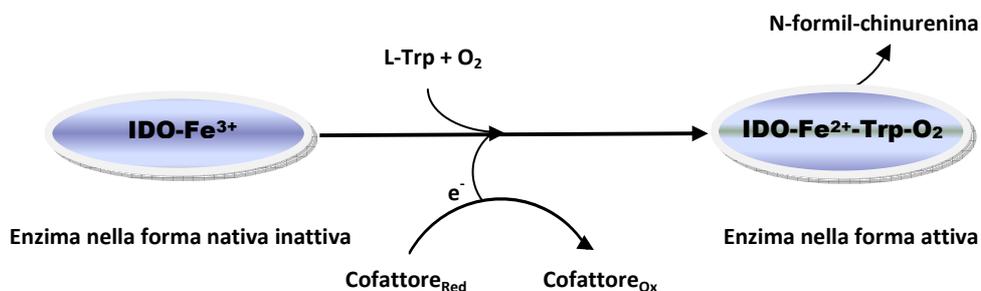


Fig. 3. Passaggio di IDO dalla forma inattiva a quella attiva

Una volta attivato, l'oloenzima IDO catalizza il clivaggio ossidativo dell'anello pirrolico dell'L-triptofano e genera la N-formil-L-chinurenina, che viene metabolizzata ad acido formico e al prodotto finale stabile chinurenina. IDO ha un'alta affinità per l'L-triptofano (K_m circa 0,02 mM) e perciò può catabolizzare

rapidamente il triptofano rendendo l'ambiente circostante privo di questo aminoacido essenziale.

IDO può essere espresso anche in assenza di un'attività funzionale della proteina. Si è visto infatti che DC murine CD8 α ⁺, catabolizzano il triptofano quando esposte all'IFN- γ mentre le cellule CD8⁻ non mostrano tale proprietà sebbene entrambe le popolazioni mostrino quantità equiparabili di proteina quando analizzate con Western-blotting (Mellor e Munn, 2004). Analogamente alle DC murine, anche quelle umane possono esprimere costitutivamente la proteina IDO senza mostrare alcuna attività enzimatica sino a quando non vengono attivate mediante esposizione all'IFN- γ o con i ligandi di CD80/CD86. La necessità di una stretta regolazione dell'attività dell'enzima è facilmente intuibile se si considerano i potenziali effetti tossici, consistenti nella deplezione di triptofano, derivanti da un'espressione costitutiva ad alti livelli della proteina funzionalmente attiva. Per questo motivo, IDO subisce anche un controllo post-traduzionale, dovuto al reclutamento e all'inserimento del gruppo eme e ai cambiamenti nello stato di ossidoriduzione (Thomas et al., 2001). Antiossidanti e potenziale redox cellulare possono influenzare anch'essi l'attività enzimatica di IDO. L'ossido nitrico, ad esempio, inattivando direttamente il sito catalitico dell'eme può promuovere la degradazione della proteina IDO mediata dal proteasoma (Samelson e Yeh, 2006).

Dal 1970 al 2007 si è creduto che il primo step della degradazione del triptofano a chinurenina fosse catalizzato solo dai due enzimi TDO e IDO. Nel 2007 Murray rettificò questo paradigma quando scoprì l'esistenza di un gene omologo a IDO. Successivamente tre diversi gruppi dimostrarono che questo gene codificava un enzima in grado di catalizzare il triptofano (Ball et al., 2007; Metz et al., 2007; Yuasa et al., 2007). Questo enzima, in base alla sua somiglianza strutturale con IDO e alla

sua funzione enzimatica, fu chiamato in diversi modi: proteina simile a indoleamina 2,3-diossigenasi, indoleamina 2,3-diossigenasi 2 o proto-indoleamina 2,3-diossigenasi (INDOL1, IDO2 o protoIDO). La proteina IDO2 mostra un'alta somiglianza a livello aminoacidico rispetto alla proteina IDO ed è codificata da un gene adiacente a quello di IDO sul cromosoma 8, suggerendo che il gene per IDO2 derivi da duplicazione del gene per IDO. Il trascritto di IDO2 è soggetto a splicing alternativo e può quindi essere troncato in diversi punti escludendo alcuni esoni che fanno parte della regione codificante (Metz et al., 2007). Inoltre il gene umano presenta anche un trascritto alternativo, con un pattern di espressione tissutale molto più ristretto, che codifica per altri 13 aminoacidi nella regione NH₂ terminale della proteina.

3. Regolazione dell'espressione di IDO

In molti tipi cellulari il gene IDO è indotto, a livello trascrizionale, in risposta a specifici stimoli infiammatori. L'interferone di tipo II (IFN- γ) rappresenta il principale induttore di IDO sia *in vitro* che *in vivo*. Il promotore di IDO contiene elementi a sequenza multipla che conferiscono responsività all'IFN- γ , chiamati elementi ISRE (*interferon stimulated DNA response elements*) e elementi GAS (*gamma-activated sequence*), che rispettivamente riconoscono IRF-1 e attivano STAT-1 α . Esistono altri stimoli infiammatori che possono indurre IDO (Takikawa, 2005; Thomas e Stocker, 1999; Mellor e Munn, 2004) come ad esempio l'IFN- α , l'IFN- β e il lipopolisaccaride (LPS), anche se sono meno efficaci dell'IFN- γ .

Il collegamento tra IDO e l'IFN- γ è facilmente spiegabile se si ipotizza che IDO abbia un ruolo nei meccanismi di difesa dell'ospite dalle infezioni, ma è meno chiaro se si

attribuisce ad IDO un ruolo regolatorio. Al momento, l'ipotesi più convincente per spiegare tale relazione è che l'induzione di IDO da parte dell'IFN- γ faccia parte di un pathway anti-infiammatorio contro-regolatorio volto a limitare un'eccessiva attivazione delle risposte T-cellulari nei siti locali di infiammazione (Mellor e Munn, 2004). Il fatto che esista una stretta correlazione tra infiammazione, produzione di IFN- γ ed espressione di IDO non significa comunque, che tale citochina sia essenziale per l'espressione dell'enzima. IDO, infatti, può essere indotto in cellule dendritiche dall'antigene 4 associato ai linfociti T citotossici (CTLA-4), in modo dipendente o indipendente dalla sintesi autocrina di IFN- γ dipendente da NF- κ B (Mellor e Munn, 2004; Grohamann et al., 2003). L'espressione di IDO può essere inoltre modulata, in maniera dipendente dal tipo cellulare e dall'ambiente citochinico, da altre molecole come IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , PGE₂, CD40, il soppressore del *signalling* 3 delle citochine (SOCS3), la proteina codificante l'adattatore BAR (Bin1) e DAP12.

Altri due mediatori dell'infiammazione, l'ossido d'azoto (NO) ed il perossinitrito, sembrano invece antagonizzare l'attività di IDO mediante diversi meccanismi. L'NO, prodotto da cellule infiammatorie per proteggere l'ospite nel corso di infezioni sostenute causate da parassiti, virus o batteri, antagonizza il consumo di triptofano sia inibendo direttamente l'attività di IDO, sia interferendo con l'induzione dell'enzima (Thomas et al., 1994; Hara et al., 2008). Il perossinitrito, che si genera dall'interazione dell'NO con l'anione superossido nel corso delle risposte infiammatorie, è capace di inibire l'attivazione e la proliferazione T cellulare (Mahidhara et al., 2003; Van der Veen et al., 2004;) ed è in grado di inibire l'attività di IDO.

Complessivamente, tutti questi dati mettono in evidenza come l'espressione di IDO sia il risultato dell'integrazione di una molteplicità di segnali intra ed extra-cellulari,

ancora non completamente delineati, molti dei quali implicati nella regolazione delle risposte infiammatorie.

4. *Popolazioni cellulari esprimenti IDO*

IDO è espresso, in maniera costitutiva o inducibile, nel citoplasma di cellule della placenta, del polmone, del piccolo e grande intestino, del colon, della milza, del fegato, del rene, dello stomaco e del cervello. Può essere indotto dall'IFN- γ nelle cellule della *lineage* mieloide (cellule dendritiche, monociti, macrofagi e eosinofili), nelle cellule epiteliali, nei fibroblasti, nelle cellule endoteliali e in alcune linee tumorali (Honig et al., 2004; Musso et al., 1994; Munn et al., 2002). Per quanto riguarda l'espressione di IDO da parte di cellule del sistema immunitario o implicate nella regolazione delle risposte immunitarie, ciò che si è osservato è che mentre monociti umani esprimono livelli bassi, quasi impercettibili, della proteina, macrofagi derivati, *in vitro*, da monociti, sovraesprimono IDO dopo esposizione all'IFN- γ . Inoltre, DC ottenute *in vitro* da monociti esprimono costitutivamente la proteina anche se funzionalmente inattiva e necessitano dell'esposizione all'IFN- γ per mostrare la presenza di una forma funzionalmente attiva dell'enzima (Jurgens et al., 2009).

In vitro, sia nei macrofagi sia nelle DC, l'espressione di IDO è comunque limitata ad una specifica sottopopolazione di cellule non aderenti che coesprime CD123 (catena α del recettore per IL-3) ed il recettore chemochinico CCR6. Non tutte le cellule CD123⁺CCR6⁺ esprimono comunque IDO e non è ancora stato identificato un marker specifico che consenta di isolare *in vitro* sottopopolazioni di DC IDO⁺ (Terness et al., 2005).

Studi più recenti hanno inoltre messo in luce che anche *in vivo* solo una piccola frazione di DC esprime IDO. Nel topo solo le cellule dendritiche CD8 α ⁺ esprimono la

proteina a seguito dell'esposizione ad IFN- γ e studi di immunistochemica hanno evidenziato come anche il trattamento con CTLA4-Ig aumenti l'espressione di IDO solo in alcune sottopopolazioni di DC murine localizzate a livello splenico. Tali cellule, definite DC plasmacitoidi (pDCs), presentano una positività oltre che per CD8 α , anche per CD19, un marker tipico del differenziamento B cellulare (Miwa et al., 2005). Alcuni studi hanno suggerito un'origine B linfoide per questa sottopopolazione cellulare dal momento che cellule pro-B CD19⁺ possono generare DC *in vitro* (Bjorck e Kincade, 1998).

Cellule staminali emopoietiche CD34⁺ derivate da midollo osseo di volontari sani non hanno mostrato l'espressione dell'mRNA per IDO; le stesse cellule, in seguito ad esposizione ad IFN- γ , esprimono l'mRNA per IDO, ma non la proteina (Kurz et al., 2009). L'osservazione che cellule CD34⁺ stimulate con IFN- γ esprimano l'mRNA per IDO ma non la proteina, conferma l'esistenza di un meccanismo regolatorio post-trascrizionale per l'espressione della proteina in cellule staminali emopoietiche.

Recentemente è stato dimostrato che l'espressione di IDO può essere indotta tramite esposizione a IFN- γ anche nelle cellule mesenchimali midollari (MSCs), già note per la loro bassa immunogenicità e per la loro capacità di inibire la risposta T-cellulare allogenica. In tali cellule, che non esprimono la proteina in assenza di IFN- γ , l'espressione di IDO risulta inoltre direttamente correlata alla quantità di citochina utilizzata nei saggi *in vitro* (Jones et al., 2007). Si sospetta che la deplezione di triptofano, mediata dall'attività dell'enzima, possa agire come meccanismo effettore dell'inibizione T cellulare esercitata da parte delle MSCs con un meccanismo analogo a quello proposto per spiegare l'effetto immunoregolatorio dell'enzima anche in altri contesti.

IDO può essere espresso costitutivamente anche su cellule neoplastiche in una grande varietà di tumori solidi (Uyttenhove et al., 2003). È stata osservata l'espressione di IDO in casi di carcinoma prostatico, colon-rettale, pancreatico, endometriale e ovarico e in molti altri tipi di tumore. Sebbene questi dati rivelino chiaramente l'espressione della proteina in diversi tumori solidi, meno chiara è l'evidenza dell'espressione della proteina in casi di neoplasie ematologiche.

Nonostante la scoperta di IDO2 sia molto recente, alcuni studi hanno già permesso di osservare che nel topo la proteina IDO2 è espressa in modo predominante nel rene, seguito dall'epididimo, i testicoli e il fegato (Ball et al., 2009), le ovaie e l'utero (Weiser, unpublished). Anche la placenta murina contiene un'abbondante quantità di trascritto di IDO2.

Sebbene alcuni tessuti esprimano entrambe le proteine IDO, studi di immunohistochimica hanno dimostrato che IDO e IDO2 sono espresse in tipi cellulari distinti suggerendo che esse non siano funzionalmente ridondanti. Ad esempio, in modelli murini, IDO è stata trovata nella testa dell'epididimo, mentre IDO2 è espressa nella coda dello spermatozoo (Ball et al., 2009). Inoltre le due proteine vengono indotte da stimoli differenti. Ad esempio, IDO è indotto sistematicamente nelle cellule endoteliali durante le infezioni da malaria e questa induzione è dipendente dalla presenza di IFN- γ (Hansen et al., 2000), mentre l'mRNA di IDO2 nelle stesse condizioni viene down-regolato (Ball et al., 2009). D'altra parte alcune citochine sono regolatori positivi dell'espressione di IDO2 in alcuni tipi cellulari, e si osserva l'induzione dell'mRNA di IDO2 in linee cellulari pre-dendritiche stimulate a maturare (Metz et al., 2007).

I trascritti murini di IDO e IDO2 che contengono solo l'esone 1B hanno un pattern di espressione molto più ampio che quelli codificanti la proteina nella sua lunghezza

intera (Weiser, unpublished). Ad esempio, i trascritti di IDO2 che contengono l'esone 1B, ma non l'esone 1A, si trovano nel cervello, nel cuore e nelle cellule dendritiche della milza. La varietà di trascritti possibili esistenti di IDO e IDO2 indica che la valutazione dell'espressione dell'mRNA non è un metodo attendibile per valutare la presenza funzionale di IDO e IDO2, ma che dovrebbe essere integrato con la valutazione della presenza della proteina e con la misurazione dell'attività funzionale.

5. *Funzione biologica di IDO*

Una volta espresso e attivato, IDO depleta l'L-triptofano dal microambiente tissutale circostante e promuove la formazione dei metaboliti della via delle chinurenine. La capacità di IDO di privare le cellule di questo aminoacido essenziale e di promuovere la formazione di chinurenine bioattive è il motivo per cui IDO ha un ruolo biologico nel controllo della risposta immunitaria.

Inizialmente si è pensato che IDO rappresentasse un meccanismo effettore della risposta immunitaria innata (Taylor e Feng, 1991). D'altra parte, come la maggior parte degli altri elementi della risposta immunitaria, è stato dimostrato che IDO sia chiaramente modulato anche dal sistema immunitario adattivo. Infatti, gli induttori di IDO TNF- α , IFN- α , IFN- β e IFN- γ , possono essere prodotti da cellule dell'immunità acquisita, come ad esempio linfociti T, o possono essere prodotte durante infezioni batteriche o virali nella fase della risposta immunitaria adattiva anti-microbica distruttiva di tipo 1.

I primi studi su IDO avevano messo in evidenza come l'induzione dell'espressione della proteina, ottenuta mediante esposizione all'IFN- γ , fosse in grado di inibire, *in vitro*, la replicazione di agenti infettivi quali chlamydia pneumoniae, toxoplasma gondii, micobatteri, streptococchi di gruppo B, citomegalovirus e i virus dell'herpes

simplex, ed avevano pertanto portato alla conclusione che IDO potesse assumere un ruolo importante nell'ambito dei meccanismi di difesa nei confronti di alcuni agenti infettivi sensibili alla deplezione di triptofano. A conferma di tale ipotesi l'aggiunta di triptofano esogeno sino alle concentrazioni fisiologiche consentiva di ripristinare la normale replicazione di tali microrganismi (MacKenzie et al., 2007; Bodaghi et al., 1999; Adams et al., 2004; Schmidt et al., 2009).

Anche *in vivo* l'espressione di IDO aumenta in risposta a vari agenti infettivi, suggerendo che IDO rappresenta, *in vivo*, un meccanismo della risposta anti-microbica.

E' ormai assodato che IDO abbia un ruolo fondamentale nelle due fasi principali di controllo della risposta immunitaria: da una parte contribuisce alla soppressione inappropriata delle risposte durante la crescita tumorale; dall'altra è coinvolto nel tentativo di controllo di risposte eccessive nell'immunopatologia associata alle infezioni, all'autoimmunità, all'aborto mediato dal sistema immunitario e al rigetto di trapianti.

1. IDO come induttore di tolleranza

L'inibizione delle risposte T causata da IDO può essere mediata da cellule di diverso tipo e natura. Uno dei primi tessuti in cui è stata osservata e studiata l'espressione di IDO è la placenta. L'espressione di IDO da parte del trofoblasto della placenta di derivazione paterna, nell'interfaccia materno-fetale, contribuisce significativamente al successo di gravidanze semi-allogene (Mellor et al., 2004). Già nel 1953 Medawar propose tre possibili meccanismi per spiegare il mancato rigetto del feto nonostante l'immunità materna verso gli antigeni paterni fetali: 1) l'esistenza di una barriera fisica tra la madre ed il feto, 2) l'immatùrità antigenica del feto e 3) la tolleranza (o

soppressione delle risposte immunitarie materne) verso gli antigeni fetali. Studi successivi hanno smentito la possibilità che i primi due meccanismi potessero assumere un ruolo nel prevenire il rigetto del feto (Sedlmayr, 2007) ed hanno confermato l'esistenza di uno stato di tolleranza locale nei confronti degli antigeni fetali. Nel 1998 Munn, dimostrando che la placenta murina è protetta dal rigetto grazie ad un meccanismo dipendente dall'espressione di IDO, ha messo in luce l'importanza che l'espressione di tale enzima assume nel garantire il mantenimento della tolleranza verso gli alloantigeni fetali nel corso della gravidanza. Inibitori di IDO, quali l'1-metil-triptofano (1-MT), sono infatti in grado di indurre il rigetto di feti allogenici, ma non di feti singenici. Inoltre, tale fenomeno sembra mediato dai linfociti T dal momento che non si osserva in topi knock out per il gene RAG1, necessario per la maturazione linfocitaria.

Lavori successivi dello stesso gruppo hanno suggerito che il rigetto ottenuto con l'1-MT, sia accompagnato da un'anomala infiammazione nell'interfaccia materno-fetale, caratterizzata da un'attivazione del complemento dipendente dall'attivazione delle cellule T ed indipendente dalla produzione di anticorpi (Mellor et al., 2001). Nel 2004, una serie di studi immunoistochimici e funzionali hanno suggerito che IDO possa essere coinvolto nei meccanismi che regolano le risposte immunitarie materne, al livello placentare, anche nella specie umana, con un meccanismo analogo a quello descritto nel topo (Kudo et al., 2004).

Nelle cellule del polmone IDO inibisce la risposta Th2 in modelli sperimentali di asma (Hayashi et al., 2004). *In vivo*, quindi, l'interazione delle cellule T con le cellule epiteliali, può essere controllata a livello locale da IDO, per ridurre o prevenire la distruzione immuno-mediata dell'epitelio. D'altra parte, alcuni patogeni intracellulari, che non richiedono l'L-triptofano per sopravvivere, possono essere avvantaggiati da

questo meccanismo, dato che la deplezione del triptofano causata dall'espressione di IDO inibisce la lisi da parte dei linfociti T citotossici. Questo scenario è simile a quello che si verifica quando cellule tumorali esprimono IDO e sopprimono le risposte T contro di loro. In questo contesto l'espressione di IDO è controllata dal gene oncosoppressore Bin1 (Muller et al., 2005).

Inoltre, l'immunosoppressione mediata da IDO può migliorare il quadro clinico di alcune patologie, mentre l'inibizione della funzione di IDO può provocare peggioramenti nella prognosi. Infatti, il blocco farmacologico dell'enzima causa un notevole aumento dell'infiammazione e della severità dei sintomi di alcune malattie in cui è già stata compromessa la tolleranza al *self*, come modelli di artrite indotta dal collagene (Seo et al., 2004), modelli sperimentali di colite (Gurtner et al., 2003), EAE (encefalomielite autoimmune sperimentale) (Kwidzinski et al., 2005) e asma allergica (Xu et al., 2008). E' stato osservato che topi trattati con inibitori di IDO diventavano refrattari nell'acquisire tolleranza. Per esempio, bloccando IDO con l'inibitore 1-MT veniva prevenuta l'induzione della tolleranza che normalmente si instaura quando antigeni esterni sono introdotti nella camera anteriore dell'occhio (Chen et al., 2006). Sulla base di questi dati, si è ipotizzato che IDO possa assumere un ruolo fisiologico nella regolazione delle risposte immunitarie a livello delle mucose, dove l'incontro con batteri non patogeni o antigeni esogeni non dannosi è frequente ed è, quindi, necessario il mantenimento di uno stato di tolleranza nei confronti di questi antigeni non *self* per evitare l'avvio di risposte immunitarie persistenti che sarebbero estremamente pericolose per l'ospite.

Si è osservato anche che l'over-espressione ectopica del gene di IDO, ottenuta mediante trasferimento genico, è in grado di causare soppressione delle risposte immunitarie riducendo il rigetto dei trapianti (Alexander et al., 2002) per esempio nel

caso di trapianti corneali (Beutelspacher et al., 2006) e polmonari (Meloni et al., 2009).

Tutti questi risultati portano a considerare che IDO *in vivo* funzioni come un meccanismo molecolare di tolleranza periferica.

Tuttavia, l'espressione di IDO non sembra essere critica per il mantenimento costitutivo della tolleranza al *self* in condizioni di omeostasi. A dimostrarlo è il fatto che topi knock-out per IDO non sviluppano malattie autoimmuni o disordini linfoproliferativi (Ueno et al., 2007) e che topi trattati sistematicamente per più di 28 giorni con inibitori di IDO non mostrano lo sviluppo di malattie autoimmunitarie spontanee.

Queste evidenze spingono ad attribuire a IDO un ruolo importante nell'acquisizione della tolleranza, ma anche a sottolineare che l'enzima sia selettivamente coinvolto nella regolazione solo di alcuni tipi di risposte immunitarie.

L'incapacità dei topi IDO^{-/-} di sopprimere una risposta T cellulare potenzialmente letale verso antigeni esogeni, anche se trattati con CTLA4-Ig, rivela un difetto nel controllo dell'immunità acquisita. Sulla base di tali osservazioni, si pensa che IDO sia importante nell'indurre o mantenere una tolleranza verso neoantigeni.

Nonostante IDO possa essere espresso da diverse popolazioni cellulari, nella maggior parte dei contesti sembra che sia fondamentale l'espressione di IDO da parte delle cellule dendritiche (DC). Le DC sono i principali iniziatori, modulatori e controllori delle risposte dell'immunità acquisita (Shortmann e Liu, 2002). Le DC esprimono IDO e sopprimono la proliferazione delle cellule T attraverso la deplezione locale di triptofano o attraverso la sintesi dei metaboliti apoptotici delle chinurenine (Mellor et al., 2004). L'espressione di IDO in cellule dendritiche nei linfonodi drenanti il tumore è stata correlata con la soppressione della risposta delle cellule T e una prognosi

sfavorevole (Munn et al., 2004). Inoltre, l'inibizione di IDO aumenta l'immunità anti-tumorale in combinazione con altri agenti anti-tumorali (Hou et al., 2007).

2. IDO come meccanismo contro-regolatorio

IDO sembra assumere un ruolo importante anche come meccanismo contro-regolatorio, in risposta ad uno stato di infiammazione, per limitare un'eccessiva attivazione immunitaria che potrebbe risultare dannosa per l'ospite stesso. La contro-regolazione si differenzia dalla tolleranza per il fatto di essere un evento secondario, suscitato solo in risposta ad un'attivazione immunitaria.

Quasi tutte le strategie immunoterapiche di successo nella terapia dei tumori, mirano a suscitare attivazione immunologica ed infiammazione, limitando il più possibile l'instaurarsi di fenomeni contro-regolatori. Diverse prove sono a sostegno di un ruolo di IDO nei meccanismi di contro-regolazione. Innanzitutto, l'espressione di IDO è indotta dall'IFN- γ e dall'IFN- α (Dai e Gupta, 1990); in secondo luogo, durante le risposte infiammatorie locali aumenta l'espressione della proteina da parte delle APC professionali del polmone e dell'intestino. Inoltre l'inibizione di IDO peggiora in modo significativo lo stato infiammatorio in queste sedi. L'espressione di IDO può, agendo come meccanismo contro-regolatorio, antagonizzare pertanto gli effetti terapeutici ricercati con gli approcci immunoterapici.

Recentemente, è stato scoperto che oligodesossinucleotidi contenenti sequenze CpG demetilate (CpG ODNs), noti per essere dei potenti agenti adiuvanti, agiscono anche come stimolatori dell'espressione di IDO in una notevole varietà di tessuti attraverso l'induzione di IFN- γ , IFN- α ed altre citochine pro-infiammatorie (Mellor et al., 2005) ed il trattamento di topi con alte dosi CpG ODNs per endovena induce una up-regolazione di IDO a livello splenico nella popolazione di DC plasmacitoidi, mediato

dalla produzione di grandi quantità di IFN- α . Quest'evidenza potrebbe avere rilevanza da un punto di vista pratico in quanto, nonostante i CpG ODNs siano immunostimolanti particolarmente forti, essi sono in grado, in alcune condizioni, di indurre un effetto contro-regolatorio mediato da IDO.

Un altro agente capace di indurre un effetto contro-regolatorio è stato individuato nella molecola co-stimolatoria 4-1BB (anche conosciuta come CD137), appartenente alla superfamiglia dei recettori del TNF con potenti effetti attivatori sulla risposta T cellulare in molti modelli di cancro murino (Nam et al., 2005). Inaspettatamente, si è visto come questa molecola sia capace di indurre IDO *in vivo* (Choi et al., 2006). Il trattamento di topi con agonisti di anticorpi specifici per il 4-1BB, ha dimostrato la riduzione della severità di sintomi in diverse malattie autoimmunitarie, come ad esempio l'artrite autoimmune (Seo et al., 2004). In tutti i casi l'effetto era riconducibile ad un'induzione contro-regolatoria di IDO, mediata dalla produzione di elevate concentrazioni di IFN- γ . Questo porta a concludere che la capacità anti-tumorale di questa molecola è limitata dall'effetto controregolatorio IDO-mediato che essa può avere in alcune circostanze.

6. Meccanismi di soppressione della risposta T cellulare mediati da IDO

Nonostante le numerose evidenze raccolte a favore del ruolo di IDO nell'induzione e nel mantenimento di uno stato di tolleranza nei confronti di antigeni tumorali, gli esatti meccanismi molecolari attraverso i quali l'attività di tale enzima sia in grado di indurre tale effetto restano ampiamente sconosciuti. Sono stati descritti diversi effetti derivanti dall'espressione di IDO che hanno portato alla formulazione di almeno tre differenti modalità attraverso le quali esso può avere un effetto immunosoppressivo.

Tali meccanismi, che probabilmente possono agire anche contemporaneamente, comprendono: un'azione diretta sui linfociti T, effetti indiretti mediati dalle APC ed un effetto bystander (Mellor e Munn, 2004).

1. Effetti diretti sui linfociti T

L'ipotesi più semplice tra quelle avanzate per spiegare l'effetto immunomodulante di IDO è che la deplezione di triptofano, conseguente all'espressione della proteina, arresti le cellule T nella fase G1 del ciclo cellulare, impedendone l'espansione clonale e rendendole più sensibili a segnali proapoptotici (Munn et al. 1999). In una serie di studi condotti su modelli murini, Munn (2002) hanno dimostrato che i linfociti T, attivati *in vitro* in un mezzo privo di triptofano, pur progredendo nel ciclo cellulare dalla fase G0 alla fase G1, non entrano nella fase S. Inoltre tali linfociti risultano maggiormente suscettibili all'apoptosi mediata dall'attivazione di Fas (Fallarino et al., 2002). Resta ancora da chiarire come la deplezione di triptofano sia in grado di sortire tali effetti. Sembra, infatti, alquanto improbabile che gli effetti della deprivazione del triptofano sulla progressione nel ciclo cellulare possano essere interamente dovuti ad un'inibizione della sintesi proteica. Infatti, *in vitro*, isoleucina e leucina, anch'essi amminoacidi essenziali, sono in grado di indurre tale effetto solo a concentrazioni molto più basse (50 nM) rispetto a quelle del triptofano (circa 1 μ M). Tale osservazione assume una particolare rilevanza se si tiene presente che il triptofano rappresenta circa l'1% della totalità degli amminoacidi presenti nelle proteine cellulari, mentre isoleucina e leucina rappresentano circa il 10% (Choi et al., 2000). Alcuni autori inoltre hanno avanzato dei dubbi sull'esistenza di tale meccanismo, poichè non si è osservata alcuna inibizione della proliferazione T-cellulare nemmeno con una completa deplezione di triptofano (Harding et al., 2003). Pertanto si è

ipotizzata l'esistenza di un qualche meccanismo alternativo come l'accumulo di una grande quantità di prodotti del catabolismo del triptofano, attraverso il quale l'attività di IDO possa avere un effetto tossico sui linfociti T e determinare in tali cellule un arresto del ciclo cellulare (Terness et al., 2002).

Per entrambi i meccanismi proposti gli effetti potrebbero essere osservati soltanto *in vitro* poiché il livello di deplezione di triptofano necessario per inibire la proliferazione T cellulare risulta essere molto più basso di quello presente nel plasma. Pertanto, per poter immaginare che tali meccanismi possano avere un ruolo rilevante anche *in vivo*, occorre assumere che il microambiente tissutale in cui avviene la presentazione dell'antigene non sia in equilibrio con il sangue, e la concentrazione locale di triptofano, o dei suoi metaboliti, sia significativamente diversa da quella plasmatica.

Tali modelli costituiscono ovviamente dei modelli di immunosoppressione locale, piuttosto che di una vera e propria forma di tolleranza sistemica, e non consentono di spiegare lo stato generalizzato di tolleranza che spesso si osserva nei confronti degli antigeni tumorali. Se IDO ha un qualche ruolo nell'induzione o nel mantenimento di tale tolleranza, esso deve necessariamente agire attraverso un meccanismo ad ampio raggio, e non soltanto attraverso effetti locali, legati ad una variazione della concentrazione di triptofano o dei suoi metaboliti tossici. Munn (Sharma et al., 2007) ha pertanto proposto che tale fenomeno possa essere ottenuto attraverso una conversione del fenotipo di cellule T, arrestate in G1, a cellule T con fenotipo regolatorio indotto dall'attività dell'enzima. Sembra, infatti, che le DC IDO⁺ possano favorire uno stato generale di tolleranza, favorendo lo sviluppo di Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, secernenti IL-10.

Sebbene non siano noti gli eventuali meccanismi attraverso i quali i linfociti T possano percepire la presenza di metaboliti tossici del triptofano, è comunque noto che la deplezione di questo amminoacido può essere percepita da tali cellule attraverso due pathway di trasduzione del segnale, entrambi capaci di arrestare la sintesi proteica. Il primo pathway prevede l'attivazione, da parte della deplezione di un qualsiasi amminoacido, della chinasi GCN2 che fosforila il fattore di inizio della traduzione e2 α . Il secondo pathway, quello di mTOR (mammalian target of rapamycin) che viene inibito dalla deplezione di aminoacidi essenziali, è necessario per dare inizio alla traduzione (Schmidt et al., 1998). La mancanza locale di triptofano causa un aumento dei livelli di tRNA nelle cellule T vicine, attivando la chinasi GCN2 stress-sensibile [58]. Sebbene il meccanismo esatto con cui questo pathway è in grado di modulare la risposta immunitaria non è conosciuto, è noto che cellule T murine knock-out per GCN2 sono resistenti all'inibizione della proliferazione cellulare indotta da IDO e non acquisiscono lo stato di anergia indotto dall'enzima (Munn et al., 2005). GCN2 può causare un arresto proliferativo delle cellule T che si bloccano in fase G1 del ciclo cellulare, renderle più suscettibili all'apoptosi mediata da Fas e indurre in esse uno stato di anergia (Fig. 4).

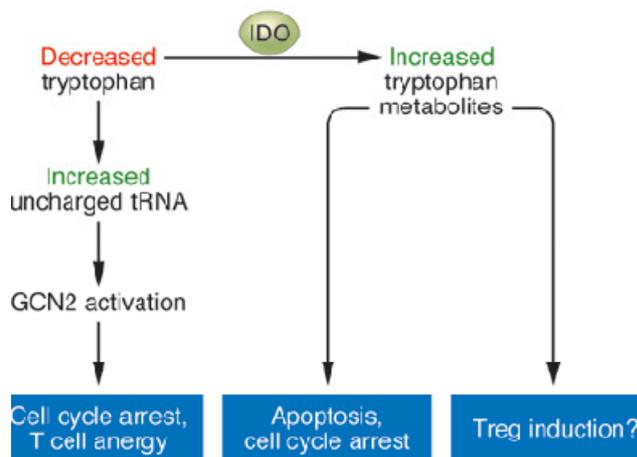


Fig. 4. Destino delle cellule T in presenza di poco triptofano o di un incremento dei suoi metaboliti.

2. Effetti indiretti mediati dalle APC IDO⁺

Un'ipotesi alternativa è che IDO possa alterare le proprietà biologiche delle APC che esprimono la proteina diminuendone la capacità di presentare l'antigene, aumentandone l'espressione di ligandi soppressivi (B7H1 o il ligando di CD95) o favorendo il rilascio di citochine immunoregolatriche quali IL-10 o TGF- β (Mellor e Munn, 2004). Anche in questo caso, l'espressione di IDO, avrebbe un effetto immunomodulante favorendo l'instaurarsi di una tolleranza verso gli antigeni presentati dalle stesse APC IDO⁺.

3. Effetto bystander

Gli studi *in vitro* ed *in vivo* hanno mostrato come l'effetto soppressivo di IDO sia dominante e l'espressione della proteina possa inibire la risposta T-cellulare anche nei confronti di antigeni presentati da APC non immunosoppressive (IDO⁻) vicine. Infatti, quando due popolazioni di DCs IDO⁺ e IDO⁻ vengono coltivate assieme, le DCs IDO⁺ sopprimono in modo dominante la proliferazione T cellulare antigene-specifica con intensità dipendente dai livelli di espressione di IDO. Tale inibizione è mediata da IDO in quanto può essere rimossa con l'aggiunta di 1-MT (Munn et al., 2004).

L'effetto soppressorio *bystander* è però soltanto locale e potrebbe essere dovuto sia agli effetti dell'attività dell'enzima sul microambiente (deplezione di triptofano, accumulo di metaboliti tossici, presenza di citochine regolatorie) sia ad un effetto diretto delle cellule esprimenti IDO, che potrebbero indurre, in APC IDO⁻, l'espressione di fattori immunomodulanti.

4. *Implicazioni cliniche*

Le evidenze sopra riportate suggeriscono che IDO sia un enzima importante nel regolare la risposta immunitaria in diverse condizioni sia fisiologiche che patologiche, sia *in vitro* che *in vivo*. Il sempre più grande e dimostrato ruolo immunosoppressorio attribuito ad IDO ha portato a considerare se l'espressione di IDO potesse essere rilevante in clinica come fattore prognostico.

Okamoto e colleghi hanno dimostrato che, nell'uomo, l'espressione di IDO da parte di cellule tumorali di carcinoma ovarico è correlata ad un *outcome* clinico negativo (Okamoto et al., 2005). L'associazione dell'espressione di IDO con prognosi negative è stata evidenziata anche in altri tumori, ad esempio nel carcinoma endometriale (Ino et al., 2006) e colon-rettale (Brandacher et al., 2006). Resta ancora da chiarire, tuttavia, se questa correlazione sia imputabile all'effetto immunosoppressorio dell'enzima e non, piuttosto, ad una più generale alterazione biologica del tumore associata all'espressione di IDO.

Inoltre, è stato studiato se la presenza di cellule che esprimono IDO nei linfonodi drenanti il tumore avesse un ruolo come fattore prognostico. A tale scopo, sono state analizzate biopsie linfonodali di pazienti affetti da melanoma. L'analisi immunoistochimica dei campioni ha evidenziato che la presenza di popolazioni cellulari esprimenti IDO è associata ad una cattiva prognosi (Weinlich et al., 2007). Gli stessi risultati ottenuti da questo lavoro sono stati successivamente confermati da un recente studio che correla l'espressione dell'mRNA di IDO con una prognosi negativa in casi di melanoma.

Inoltre, *in vivo*, IDO rappresenta il target ideale per un intervento terapeutico. L'inibizione dell'attività inappropriata di IDO durante la crescita tumorale potrebbe attenuare la capacità del tumore di evadere l'immunosorveglianza e promuovere la

sua eliminazione. Infatti, farmaci che inibiscono IDO possono agire come adiuvanti efficaci nell'immunoterapia contro i tumori in modelli murini (Muller et al., 2005). Da un punto di vista pratico, la rottura della tolleranza verso antigeni tumorali, richiede, probabilmente, una combinazione di più interventi quali l'immunizzazione con antigeni tumorali, la rimozione dei Tregs, l'inibizione di CTLA-4 e l'aumento dell'espressione di molecole costimolatorie.

I potenziali vantaggi derivanti dall'utilizzo in ambito terapeutico di inibitori di IDO consistono nella possibilità di: 1) aumentare la risposta immunitaria agendo contemporaneamente su di un secondo *pathway* immunoregolatorio indipendente da IDO; 2) rimuovere l'immunosoppressione locale all'interno del tumore; 3) prevenire l'instaurarsi di un nuovo stato di tolleranza una volta che questo sia stato rotto con altre terapie (Röhrig et al., 2010). Pertanto, gli inibitori di IDO potrebbero essere utilizzati come adiuvanti associati a strategie di vaccinazione per aumentare l'immunogenicità del vaccino. Da un punto di vista teorico, la vaccinazione con antigeni tumorali potrebbe non essere strettamente necessaria dal momento che radio e chemioterapia comportano il rilascio di grandi quantità di antigeni da parte delle cellule tumorali uccise. Spesso, però, ciò non è sufficiente a rompere la tolleranza verso gli antigeni tumorali, probabilmente a causa di un rapido reinstaurarsi dei meccanismi che ripristinano e mantengono la tolleranza dopo ogni ciclo di terapia. In linea di principio, pertanto, la chemioterapia può generare un microambiente nel quale gli inibitori di IDO potrebbero avere un effetto benefico su tumori già sviluppatasi, prevenendo il reinstaurarsi di uno stato di tolleranza nei loro confronti. A sostegno di tale ipotesi è stato dimostrato come l'1-MT abbia un effetto sinergico con la ciclofosfamide nel trattamento di tumori murini mammari. Tale effetto non si

osserva in topi immunodeficienti indicando come l'1-MT agisca in modo indiretto aumentando l'entità della risposta immunitaria dell'ospite (Hou et al., 2007).

Occorre sottolineare che l'1-MT non ha effetti diretti sulla attivazione o sulla proliferazione dei linfociti T da soli o stimolati da APC IDO⁻. Non agisce dunque come fattore di crescita né nei confronti dei linfociti, né nei confronti delle DC. Pertanto, tutti gli effetti osservati *in vitro* ed *in vivo*, a seguito dell'aggiunta o somministrazione di tale farmaco, sono completamente attribuibili alla sua capacità di inibire in modo competitivo l'attività dell'enzima.

Nonostante l'utilizzo dell'1-MT sembri molto promettente nel garantire una rottura della tolleranza verso gli antigeni tumorali, è importante tenere ben presente che, sebbene IDO possa assumere almeno in alcuni istotipi tumorali un ruolo importante nell'induzione e nel mantenimento della tolleranza, esso non rappresenta certamente l'unico meccanismo che prende parte a tale processo (Liut et al., 2009). Inoltre, in tumori già sviluppati, una volta raggiunta una tolleranza verso gli antigeni tumorali, il ruolo di IDO può diventare secondario e la semplice inibizione dell'enzima può non essere sufficiente a rompere la tolleranza evidenziando l'esistenza di altri meccanismi in grado di mantenerla.

Al contrario, strategie che aumentino l'attività di IDO durante malattie autoimmuni o infiammatorie potrebbero portare benefici inibendo l'attività indesiderata delle cellule T. D'altra parte, studi recenti hanno mostrato che l'inibizione dell'attivazione T-cellulare da parte delle cellule esprimenti IDO può avvenire sia per la deprivazione del triptofano, che per la produzione dei metaboliti inibitori sintetizzati lungo la via delle chinurenine (Fallarino et al., 2003). Perciò le strategie terapeutiche devono tenere in considerazione l'esistenza e la diversità di questi due meccanismi.

Infine, nei disordini neurologici caratterizzati da aumentati livelli della neurotossina eccitatoria acido quinolinico, c'è un elevato interesse nell'utilizzare inibitori dell'enzima chinurenina-3 mono-ossigenasi al fine di bloccare la produzione di acido quinolinico e di aumentare la produzione di acido chinurenico che, essendo un antagonista dell'acido quinolinico, diminuirebbe la tossicità provocata da quest'ultimo.

III. Le cellule dendritiche

1. Le cellule dendritiche (DC)

Le cellule dendritiche (DC) hanno un ruolo critico nell'induzione e nella regolazione delle risposte sia dell'immunità innata che acquisita. Sono note per la loro capacità unica di presentare gli antigeni e per la loro abilità nell'attivare i linfociti T naïve (McLellan, 1995; Banchereau et al., 2000). Le DC immature risiedono nei tessuti periferici, dove catturano e processano gli antigeni per la loro presentazione su molecole HLA. Gli agenti microbici, gli stimoli infiammatori o gli stimoli derivati dalle cellule T inducono una serie di cambiamenti morfologici, fenotipici e funzionali che vengono comunemente raggruppati sotto il nome di "processo maturativo" e che servono per rendere le DC capaci di attivare efficacemente i linfociti T attraverso l'interazione con le molecole di costimolazione (Cella et al., 1996; Engering et al., 1997). Le DC immature non sono capaci di generare un *signalling* co-stimolatorio, ma inducono una risposta tollerogena e causano anergia delle cellule T (Jonuleit et al., 1996). Attratte dalle chemochine linfoidi, le DC mature migrano nell'area delle cellule T nei linfonodi, dove danno inizio alla risposta immunitaria (Randolph et al., 2005). Esistono vari sottotipi di DC umane. Le DC umane, infatti, possono essere identificate in base (1) alla localizzazione (tessuti periferici, tessuti linfoidi, sangue), (2) alla sorgente (derivate *in vitro* da monociti o da cellule CD34⁺) e dal fenotipo (ad esempio Lin⁻HLA-DR⁺CD11c^{+/-}). Viene usata anche una classificazione funzionale (DC infiammatorie, tollerogeniche, migratorie...), ma è più comune utilizzarla per le DC murine.

Inizialmente le cellule dendritiche sono state identificate come cellule interstiziali HLA-DR⁺ nel rene (Williams et al., 1980). Successivamente popolazioni diverse di DC sono state descritte nelle tonsille (Prickett et al., 1992), nel timo (Inaba et al., 1983), nel fegato (Prickett et al., 1988), nell'interstizio di organi non linfoidi (Hart et al., 1989) e nel midollo osseo (Egner et al., 1993).

Dato che le DC, *in vivo*, sono una popolazione rara, la capacità di differenziarle *in vitro* ha permesso di studiarle adeguatamente. D'altra parte ovviamente ci sono delle differenze tra le DC ottenute *in vivo* e quelle ottenute *in vitro* (Osugi et al., 2005). Molti gruppi hanno cercato di sviluppare anticorpi che rendessero più facile lo studio e l'isolamento delle diverse popolazioni di cellule dendritiche umane. Purtroppo l'identificazione e la generazione di nuovi anticorpi utili allo scopo è un processo lento e, ancora oggi, ci sono pochi anticorpi che danno un contributo reale all'identificazione delle varie sottopopolazioni. Per identificare le DC si usano pannelli di marcatori. Tutte le DC esprimono HLA-DR e sono Lin⁻, ovvero non esprimono nessuno dei marcatori di *lineage* (CD3, CD14, CD19, CD20, CD56). Le CD1c⁺-DC sono caratterizzate dall'espressione di CD1c e CD11c (MacDonald et al., 2002), le DC plasmacitoidi (pDC) dall'espressione di CD123, CD303 e CD304 (Dzionek et al., 2000; Olweus et al., 1997; Blomberg et al., 2003), le CD141⁺-DC dall'espressione di CD141 (MacDonald et al., 2002), le CMRF-44⁺-DC dall'espressione di CMRF-44 e CMRF-56 (Lopez et al., 2003; Vuckovic et al., 2003), le CD83⁺-DC dall'espressione di CD83, le cellule di Langerans (LC) dall'espressione di CD1a e CD207 (Caux et al., 1996; Valladeau et al., 2000), le DC dei tessuti linfoidi e delle mucose dall'espressione di CD209 e CD103 (Ochoa et al., 2008; Del Rio et al., 2010).

In tabella 1 sono riassunti i biomarcatori comunemente usati per identificare le popolazioni.

Popolazione di DC	Anticorpo o miscela di anticorpi
Tutte le DC	HLA-DR, Lin ⁻
CD1c ⁺ -DC	CD1c, CD11c
pDC	CD123, CD303, CD304
CD141 ⁺ -DC	CD141
CMRF44 ⁺ -DC	CMRF-44, CMRF-56
CD83 ⁺ -DC	CD83
LC	CD1a, CD207
DC mucose e tessuti linfoidei	CD209, CD103

Tab. 1. Principali sottotipi di DC

D'altra parte, anche se il fenotipo non dovrebbe cambiare, è noto che la biologia delle DC può cambiare drasticamente.

Un altro modo per identificare i subset di DC è quello di individuarle per tessuto di appartenenza o sorgente cellulare di derivazione. Secondo questa classificazione esistono DC monocitoidi che esprimono CD14 e possono o meno esprimere CD16 (Ziegler-Heitbrock, 2007; Geissmann et al., 2003), DC del sangue a cui appartengono 5 diverse sottopopolazioni: le DC esprimenti il CD34, le DC esprimenti il CD141, le DC esprimenti il CD16 (Randolph et al., 2002), le DC mieloidi (CD1c⁺CD11c⁺CD13⁺CD33⁺) (O'Doherty et al., 1994) e le DC plasmacitoidi (CD4⁺CD123⁺⁺CD303⁺CD304⁺). Inoltre esistono DC appartenenti a tessuti linfoidei e non linfoidei. Alla prima classe appartengono le cellule di Langerans (LC) (Romani et al., 2010) e le cellule del derma (DC del derma) (Lenz et al., 1993); alla seconda le DC

delle tonsille (suddivisibili in 5 sottopopolazioni) (Summers et al., 2001), le DC dei linfonodi (CD103⁺), le DC del timo (CD123⁺⁺) (Res et al., 1999) e le DC della milza (suddivisibili in 4 sottopopolazioni) (McIlroy et al., 2001). Le più comuni risorse per studiare le DC sono le cellule derivate *in vitro* da precursori CD14⁺ o CD34⁺. Le DC derivate dai monociti CD14⁺, possono differenziarsi sia spontaneamente (Ho et al., 2002) che in presenza di citochine (Sallusto e Lanzavecchia, 1994); le DC derivate dalle cellule CD34⁺ di midollo osseo, cordone ombelicale o di sangue periferico dopo mobilizzazione si differenziano unicamente in presenza di citochine (Caux et al., 1996). *In vitro* le DC possono essere pulsate, fuse o trasformate con antigeni di diversa natura.

2. *DC e induzione della tolleranza. il ruolo diIDO*

Numerose evidenze hanno rilevato la capacità delle stesse DC di indurre un fenomeno di tolleranza, piuttosto che di attivazione, in risposta alla presentazione di antigeni sulla loro superficie cellulare (Steinman et al., 2003). Le DC assumono, quindi, un ruolo chiave nelle risposte immunitarie, in quanto sono capaci di indurre attivazione della risposta o tolleranza a seconda delle circostanze.

I due possibili meccanismi di azione delle DC richiedono l'integrazione di diversi segnali prodotti dall'immunità innata e acquisita. L'informazione può essere passiva. l'assenza di segnali che indicano infezione o danno causano ad una presentazione tollerogena dell'antigene da parte delle DC immature.

L'immunità innata può promuovere attivazione immunitaria tramite il legame dei recettori di tipo toll sulla superficie delle DC o tramite la secrezione di citochine infiammatorie, e può promuovere tolleranza attraverso la creazione di un *milieu* locale immunosoppressivo, caratterizzato dalla presenza di citochine anti-

infiammatorie, o attraverso segnali tollerogenici per le DC. L'immunità specifica può indurre attivazione attraverso i linfociti CD4⁺ T helper che supportano la risposta effettrice T cellulare, e può indurre tolleranza tramite specifici segnali rilasciati da sottopopolazioni di linfociti T definiti regolatori, quali CD4⁺CD25⁺ e TR1.

Le DC immature e le DC plasmacitoidi sono in grado di indurre tolleranza attraverso il differenziamento di linfociti T naïve in Treg. Le proprietà tollerogeniche di queste DC possono essere aumentate da diversi mediatori e da alcune popolazioni di DC (CD1c⁺) che possono secernere citochine regolatorie come l'IL-10 in presenza di specifici stimoli. In alcuni contesti non propriamente fisiologici, come ad esempio nel sito di trapianto, sono state individuate popolazioni tollerogeniche di DC che esprimono ILT-3, ILT-4 o IDO (Chang et al., 2002).

Moltissimi studi finora condotti inducono a concludere che soltanto alcuni tipi di DC esprimano normalmente IDO *in vivo*. Quest'ipotesi fu proposta, inizialmente, in seguito a risultati ottenuti da studi su modelli murini condotti da Grohmann e colleghi. Il suo gruppo dimostrò che *in vitro* l'attività di IDO segregava con una popolazione di DC CD8α⁺ in seguito ad esposizione ad IFN-γ. Successivi studi hanno dimostrato che l'induzione di IDO poteva verificarsi anche nella frazione CD8α⁻, in conseguenza ad esposizione a CTLA-4-Ig o ai Tregs (Grohmann et al., 2001).

Il trattamento con la proteina di fusione CTLA-4-Ig ha rivelato che, *in vivo*, ad up-regolare i livelli di IDO è una popolazione di APC murine a livello splenico. Tali DC erano positive per i markers B220 (proprio di un fenotipo plasmacitoide), per CD11c e per CD8α. Questi markers, tuttavia, non sono sufficienti per individuare una popolazione di DC IDO-competente, dato che l'espressione di queste molecole può subire variazioni durante i processi di maturazione ed attivazione delle DC (Martín et al., 2002). L'induzione di IDO mediata dalla proteina di fusione CTLA-4-Ig sembra

coinvolgere il legame della stessa con la molecola B7 presente sulle DC. Tale interazione indurrebbe l'attività dell'enzima tramite un *pathway* indipendente dall'IFN- γ . Diversi sono i segnali conosciuti capaci di indurre l'espressione di IDO sulle cellule dendritiche, quali IFN- γ , LPS, CTLA-4, CD28, IL-10 ed estrogeni.

Un interessante studio ha descritto, recentemente, la capacità della prostaglandina E₂ (PGE₂), noto promotore carcinogenico, di up-regolare IDO su DC generate *in vitro* (Von Bergwelt-Baildon et al., 2006). La regolazione di IDO da parte della PGE₂ avviene sia a livello trascrizionale che traduzionale. La PGE₂ è in grado di up-regolare l'mRNA di IDO ma non è sufficiente ad indurre l'espressione della proteina sulle DC immature, la quale richiede l'integrazione di segnali di maturazione (come TNF- α e il CD40L). Inoltre, in altri lavori, la PGE₂ si è anche rivelata capace di promuovere la presentazione antigenica da parte delle DC e la loro migrazione (Luft et al. 2002). È stato osservato che DC maturate in presenza di PGE₂ non solo esprimono IDO, ma esprimono anche CD25 sulla propria membrana e ne secernono la forma solubile. La conseguenza di tali eventi è l'inibizione della risposta T cellulare, prevalentemente mediata dalla deplezione di triptofano.

Secondo il modello proposto da Munn (Mellor e Munn, 2004), l'espressione di IDO da parte delle DC non sarebbe comunque legata al loro stato di maturazione. Sono infatti state isolate dai TDLNs, DC murine CD19⁺IDO⁺ che esprimono in modo uniforme alti livelli di MHC II e molecole costimolatorie (CD80/CD86) proprie di un fenotipo maturo. Poiché alcune DC mature mantengono espressione di IDO e proprietà tollerogeniche, maturazione ed espressione di IDO possono, probabilmente, essere due eventi indipendenti l'uno dall'altro. Esisterebbero pertanto due *pathways* alternativi di maturazione delle DC esprimenti IDO: da un lato segnali pro-infiammatori quali CD40L o citochine pro-infiammatorie indurrebbero, oltre alla maturazione, la

diminuita espressione di IDO, dall'altro segnali tollerogenici quali l'interazione di CTLA-4 con CD80/CD86 favorirebbero il differenziamento di DC mature esprimenti IDO, in grado di sopprimere la risposta T-cellulare.

In conclusione, il punto fondamentale che emerge dagli studi sopra citati è che non tutte le DC hanno la capacità di esprimere la forma funzionale di IDO e che quindi l'attività immunosoppressiva dell'enzima sembra essere ristretta soltanto ad una piccola popolazione di DC IDO-competente. D'altra parte, moltissimi altri meccanismi sono coinvolti nella regolazione di IDO: questi, non essendo mutualmente esclusivi, operano probabilmente in combinazione tra loro, a seconda dei segnali provenienti dal microambiente e dei sottotipi di DC coinvolte.

3. IDO nelle DC dei linfonodi drenanti il tumore

L'espressione costitutiva di IDO è stata osservata in una popolazione di APC presenti a livello dei linfonodi drenanti il tumore (TDLNs) sia nel topo che nell'uomo (Munn et al., 2004). È stato ipotizzato che l'espressione di IDO sulle DC possa assumere un ruolo importante nella biologia di alcuni tumori.

Complessivamente, i dati sinora raccolti, suggeriscono che il reclutamento di APC IDO⁺ a livello dei TDLNs possa rappresentare un potente meccanismo di induzione di uno stato di tolleranza verso gli antigeni tumorali. Non è comunque ancora chiaro se la presenza di APC IDO⁺ nei TDLNs sia dovuto ad un reclutamento preferenziale in questa sede di tale popolazione cellulare o ad una aumentata regolazione dell'espressione di IDO nelle APC già presenti a livello linfonodale.

Nei linfonodi il cross-priming di antigeni tumorali avviene sia da parte di APC immunogeniche che di APC IDO⁺. Sebbene quest'ultime rappresentino una piccolissima percentuale delle APC linfonodali, si è visto come siano in grado di creare

un ambiente locale immunosoppressivo e di inibire la risposta T cellulare sia *in vivo* che *in vitro*.

In uno studio su modelli murini, è stata individuata, nei linfonodi drenanti il tumore, una popolazione di DC immunoregulatoria capace di sopprimere la risposta T cellulare *in vitro* e di creare uno stato di anergia T cellulare antigene-specifica, in seguito ad un trasferimento adottivo *in vivo*.

Nei TDLNs l'attività immunosoppressoria mediata da IDO segrega con una popolazione di DC plasmacitoidi esprimenti B220 e CD19, un marker tipico del differenziamento B cellulare. La presenza di queste pDC non è ristretta ai soli linfonodi drenanti il tumore: esse sono state trovate anche nei linfonodi normali e nella milza, ma in questi siti non esprimono costitutivamente IDO né hanno attività soppressoria spontanea. Questa popolazione di pDC CD19⁺ sembra inoltre esprimere i markers CD123 e CCR6, descritti anche nelle DC umane e nei macrofagi: il CCR6 è stato riscontrato in una buona parte delle pDC murine (Ayehunie et al., 2009), mentre il CD123 sembra essere espresso soltanto dalla frazione pDC CD19⁺. Si è ipotizzato che alcuni fattori presenti nei TDLNs possano pre-attivare, attraverso segnali del microambiente quali citochine o attraverso l'attività dei Tregs, le pDC inducendo in queste l'espressione di IDO e determinando uno stato di immunosoppressione locale.

In conclusione, il dato fondamentale che emerge dagli studi condotti sinora è che non tutte le DC sono in grado di esprimere IDO come proteina funzionale e che pertanto tutti gli effetti biologici derivanti dall'espressione di IDO sono mediati da una piccola sottopopolazione di DC che nel topo esprime CD19 e CD11c, stimata attorno allo 0.3-0.5% delle APC presenti a livello linfonodale. Si pensa pertanto che la soppressione mediata dalle pDC IDO⁺ sia dominante sull'attività delle altre APC IDO⁻.

Restano ancora da chiarire, invece, le caratteristiche di alcune DC umane rinvenute a livello dei linfonodi drenanti il tumore: esse sembrano riflettere la controparte murina CD19⁺, ma sono necessari ulteriori studi per una miglior caratterizzazione.

4. DC IDO⁺ e la capacità di sopprimere la risposta T cellulare

Nonostante non si sia potuta confermare l'esistenza di DC umane esprimenti costitutivamente IDO, resta da accertare se le DC che producono l'enzima in seguito a trattamento con IFN- γ siano capaci di inibire la risposta dei linfociti T. A tal scopo, DC umane sono state indotte ad esprimere un'alta quantità di IDO, mediante esposizione a IFN- γ (Jürgens et al., 2009). Inaspettatamente, le DC IDO⁺ non si sono rivelate capaci di inibire la risposta T-cellulare, se non marginalmente. Vacca e colleghi (2005), in un recente studio, hanno dimostrato che DC maturate con CD40L sono refrattarie ad esprimere IDO attraverso l'induzione mediata dalla proteina CTLA-4-Ig e sono incapaci di sopprimere la risposta linfocitaria. Una possibile spiegazione a questi risultati può essere individuata nell'azione regolatoria del potenziale redox. Come precedentemente descritto, l'azione di IDO produce metaboliti del triptofano capaci di inibire la risposta T cellulare (Terness et al., 2002). Tali metaboliti sono attivi dal punto di vista redox e la loro azione biologica dipende dalla natura ossidante o riducente del microambiente. È stato dimostrato che le DC generano sostanze redox attive (Angelini et al., 2002) e questo porta ad ipotizzare che i metaboliti del triptofano, indotti dalle DC IDO⁺, acquisiscano proprietà immunosoppressive solo se rilasciati in un microambiente con opportune caratteristiche redox.

I risultati di questi studi mirati a comprendere l'attività delle DC umane IDO⁺, hanno portato ad ipotizzare la presenza di diverse popolazioni di DC con caratteristiche diverse, così riassumibili: 1) DC IDO⁺, ma incapaci di metabolizzare il triptofano

(Munn et al., 2004); 2) DC IDO⁺ capaci di metabolizzare il triptofano, ma non di sopprimere la risposta T-cellulare (Terness et al., 2005); 3) DC IDO⁺ in grado di metabolizzare il triptofano e di inibire la risposta T-cellulare (Hwu et al., 2000).

Sono, comunque, necessari ulteriori studi per comprendere meglio la ragione dell'esistenza di queste diverse popolazioni di DC umane IDO⁺ e delle loro differenti proprietà funzionali.

IV. I linfociti T regolatori

1. *I linfociti T regolatori (Treg)*

I linfociti T soppressori furono originariamente identificati come una sottopopolazione di cellule T, diversa dai linfociti T helper e citotossici, la cui funzione era quella di inibire le risposte immunitarie (Gershon et al., 1972). Studi condotti negli anni '70 dimostrarono che, se si trasferivano in animali non precedentemente esposti a un dato antigene, linfociti T di topi resi tolleranti a quell'antigene, gli animali riceventi diventavano non responsivi a quell'antigene. Attualmente si ritiene che non esista una popolazione di linfociti T ben definita che svolga unicamente la funzione di sopprimere le risposte immunitarie; è invece probabile che molti linfociti T possano, di volta in volta, comportarsi da soppressori di risposte immunitarie a seconda delle circostanze.

I linfociti T regolatori (Treg) svolgono un ruolo chiave nel mantenimento della tolleranza immunitaria, sia verso antigeni autologhi, che verso antigeni allogenici. Alcuni Treg esercitano la propria azione soppressiva mediante contatto diretto cellula-cellula, altri producono citochine con funzioni immunoregolatorie, come IL-10 e TGF- β (Fehérvari e Sakaguchi, 2004).

La popolazione definita Treg sembra anche essere una componente chiave nell'acquisizione della tolleranza verso vari tipi di tumore ed è, per questo, oggetto di numerose ricerche. L'incremento dell'attività dei Treg facilita la crescita tumorale

(Nishikawa et al., 2005), mentre la loro deplezione permette la normale risposta antitumorale da parte del sistema immunitario. Restano ancora tuttavia da comprendere meglio le specifiche caratteristiche e il meccanismo di azione di queste cellule. se l'attività inibitoria sul sistema immunitario dovesse essere confermata, i Treg potrebbero rappresentare un potenziale impiego in clinica prezioso, ad esempio, nella cura delle malattie autoimmuni e nella prevenzione del rigetto di trapianto.

Come prima accennato, l'attività immunosoppressoria dei Treg gioca un ruolo importante nell'inibire la risposta T-cellulare verso antigeni esogeni.

È stata identificata nel topo una popolazione di cellule regolatorie CD4⁺ che esprimono costitutivamente la catena α del recettore dell'IL2 (CD25) e che mostrano una forte attività soppressiva sia *in vitro* che *in vivo* (Sakaguchi, 2000). Questi Treg murini sono anergici se stimolati *in vitro* con un anticorpo diretto contro il CD3, proliferano se stimolati con IL-2 esogena e sopprimono l'attivazione e la proliferazione di altri linfociti T, tramite un meccanismo che richiede il contatto cellulare. Inoltre, esprimono costitutivamente anche il CTLA-4, un regolatore negativo dell'attivazione T cellulare, indispensabile per la soppressione della risposta *in vivo* (Read et al. 2000). Considerando le potenti capacità soppressive dei Treg murini, si è cercato di verificare la presenza di una simile popolazione cellulare anche nell'uomo.

I risultati ottenuti dimostrano che i Treg sono presenti nel sangue umano periferico; rappresentano circa il 3% delle cellule totali presenti nel sangue e circa il 13% dei linfociti CD4⁺. La maggior parte di essi esprime, oltre alle molecole CD4 e CD25, anche i marker 45RO, HLA-DR, CTLA-4, e il fattore citoplasmatico Foxp3. L'espressione di quest'ultimo sui Treg è accompagnato da una down-regolazione di un marker di superficie, il CD127 (Banham, 2006). I Treg mostrano una ridotta espressione del CD40L, un up-regolazione del CTLA-4 in seguito a stimolazione

mediata dal TCR e producono citochine soltanto se attivati da APC allogeniche. Le citochine prodotte sono rappresentate principalmente da IL-10, TGF- β e da bassi livelli di IFN- γ . Essi non secernono nè IL-4, nè IL-2. Tali linfociti, inoltre, non mostrano proliferazione in risposta ad allo-antigeni.

Dati recenti dimostrano la loro diretta e potente attività di soppressione delle risposte dei linfociti CD4⁺, sia naïve che di memoria, attraverso un meccanismo indipendente dalle APC (Thornton e Shevach, 2000). *In vivo* tale capacità inibitoria risulta essere proprietà soltanto della popolazione che esprime costitutivamente il CD25. Inoltre, i lavori finora pubblicati suggeriscono che l'espressione della molecola CTLA-4 sia indispensabile per la funzione regolatoria di queste cellule (Thornton e Shevach, 1998).

Riassumendo, esiste nell'uomo una popolazione di Treg CD4⁺CD25⁺, isolata dal sangue periferico che, analogamente a quella rinvenuta in modelli murini, è capace di inibire la proliferazione e l'attivazione di altri linfociti T. Tale proprietà rende queste cellule un possibile importante strumento utilizzabile in clinica.

2. *Ruolo di IDO nell'induzione di Treg*

Come detto in precedenza, i Treg rappresentano una classe di linfociti nota per la capacità immunosoppressiva sulle altre cellule T. Recenti studi hanno dimostrato il coinvolgimento di IDO come possibile meccanismo effettore di tale attività. Grohmann e colleghi hanno mostrato la capacità dei Treg di indurre, *in vitro*, l'espressione di alti livelli della forma funzionale di IDO su DC murine (Fallarino et al., 2003). Tale fenomeno sembra verificarsi in seguito al legame tra il CTLA-4 espresso sulla superficie dei Treg con le molecole CD80 e CD86 sulle DC. l'interazione trasduce un

segnale nelle DC che up-regola l'espressione della proteina funzionale sulla superficie di queste cellule (Mellor et al., 2004). La capacità dell'interazione tra il CTLA-4 e le molecole CD80 e CD86 di indurre IDO è stata riscontrata anche in DC umane di derivazione monocitaria (Munn et al., 2004).

Questi risultati portano a ipotizzare il ruolo preminente del CTLA-4 espresso sui Treg nell'induzione di IDO, che rappresenta a sua volta il meccanismo effettore tramite cui i Treg esercitano la loro attività inibitoria.

La centralità del ruolo del CTLA-4 nell'induzione di IDO proviene da recenti studi su scimmie infettate con il SIV (virus dell'immunodeficienza nelle scimmie). Primati infettati con il SIV mostrano un elevato numero di Treg CTLA-4⁺ e alti livelli di IDO nella sua forma funzionale. Quando gli animali, invece, vengono trattati con uno specifico anticorpo bloccante diretto contro il CTLA-4, essi mostrano una sostanziale riduzione nei tessuti dell'mRNA di IDO e dei metaboliti di IDO nel plasma (Hryniewicz et al., 2006). Questi risultati supportano l'ipotesi che l'espressione dell'enzima sulle APC sia up-regolata dal CTLA-4 presente sui Treg. Tali evidenze potrebbero anche spiegare l'aumentata espressione di IDO nei linfonodi drenanti il tumore precedentemente descritta: la presenza di numerosi Treg nei TDLN favorirebbe l'induzione di IDO mediata dal CTLA-4 espresso sui Treg.

È comunque improbabile che l'azione immunosoppressoria delle DC IDO⁺ richieda il diretto contatto tra queste e i linfociti T. E' ipotizzabile, quindi, la presenza di un possibile meccanismo secondario che supporti indirettamente l'inibizione della risposta immunitaria. Sebbene la natura di questo meccanismo non sia conosciuta, una possibilità potrebbe essere rappresentata dalla generazione di Treg, promossa dalle stesse DC. Studi recenti hanno indicato che l'espressione di IDO da parte delle DC potrebbe promuovere *in vitro* la differenziazione di nuovi Treg da cellule T-naïve

CD4⁺ (Curti et al., 2007). Resta ancora da dimostrare se questo *pathway* agisca anche *in vivo* ed abbia un ruolo nell'immunologia dei tumori. Se questo fosse confermato, IDO e i Treg rappresenterebbero un potente sistema a *feedback* positivo, in cui i Treg indurrebbero l'espressione di IDO che, a sua volta, favorirebbe lo sviluppo di nuovi Treg.

V. La leucemia mieloide acuta

1. *La leucemia mieloide acuta*

Le leucemie mieloidi sono malattie neoplastiche del sistema emopoietico, caratterizzate da un'abnorme produzione di cellule mature o immature delle linee di differenziamento mieloide: granulomonocitaria, piastrinica ed eritrocitaria. Esse vengono a loro volta distinte in acute o croniche, in base al decorso e alla durata della malattia in assenza di trattamento. Mentre nelle forme croniche le cellule neoplastiche mantengono la capacità di differenziare e maturare, nelle forme acute la maturazione delle cellule leucemiche risulta abortita e determina il conseguente abnorme accumulo di cellule blastiche mieloidi e la difettiva produzione di granulociti, monociti, piastrine ed eritrociti.

Le leucemie acute mieloidi (LAM) hanno origine da una cellula staminale pluripotente o multipotente che ha già intrapreso un differenziamento per la mielopoiesi. La trasformazione neoplastica altera i meccanismi che regolano proliferazione e differenziamento, impedendo la maturazione delle cellule leucemiche. Ne consegue un accumulo di cellule blastiche che proliferano autonomamente dapprima nel midollo osseo e nel sangue periferico, ed in seguito in altri organi o tessuti.

Le LAM possono insorgere a qualsiasi età, ma la loro frequenza aumenta considerevolmente con l'età, con un'età mediana compresa tra i 60 ed i 65 anni ed un'incidenza attorno a 12 casi ogni 100000 abitanti, anche se la frequenza della malattia varia considerevolmente nelle diverse aree geografiche. Diversi sono i

possibili fattori che si suppone possano avere un ruolo nell'eziologia di tale forma di leucemia. Tra i più importanti vi sono fattori genetici, l'esposizione a radiazioni ionizzanti, ad agenti chimici quali benzene ed ossido d'etilene ed il trattamento con farmaci alchilanti.

Il quadro clinico con cui esordiscono le LAM può essere estremamente variabile e comprende: anemia, piastrinopenia e leucopenia (dovute ad un'insufficiente e difettiva produzione di cellule ematiche mature), splenomegalia, epatomegalia e linfadenopatia (per un'infiltrazione da parte dei blasti leucemici di tessuti ed organi non emopoietici) e sintomi generali quali febbre, dolori ossei e muscolari, calo ponderale, astenia (dovuti alla liberazione di citochine da parte delle cellule leucemiche stesse).

Le LAM sono un gruppo eterogeneo di malattie neoplastiche che, in accordo con lo schema Franco-Americano-Britannico (FAB), vengono classificate in otto (M0-M7) maggiori citotipi, secondo le caratteristiche morfologiche, citochimiche ed immunofenotipiche dei blasti (Tabella2). La classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità prende in considerazione, oltre agli aspetti morfologici, quelli molecolari, citogenetici e clinici, che possono assumere un importante significato prognostico.

Classificazione FAB delle LAM	
M0	Leucemia minimamente differenziata
M1	Leucemia mieloblastica senza maturazione
M2	Leucemia mieloblastica con maturazione
M3	Leucemia promielocitica ipergranulare
M4	Leucemia mielomonocitica
M5	Leucemia monolitica
M6	Eritroleucemia
M7	Leucemia megacarioblastica

Tab. 2. Classificazione FAB

La percentuale di guarigione o di sopravvivenza a lungo termine è complessivamente attorno al 25%, ma prognosi e decorso sono fortemente influenzati da una serie di fattori tra loro indipendenti. L'età all'esordio viene considerato uno dei più importanti fattori prognostici, dal momento che l'età superiore ai 60 anni si associa ad una prognosi peggiore, principalmente per la ridotta capacità del paziente di sopravvivere alla terapia di induzione necessaria per ottenere una remissione completa (Tura e Baccarani, 2003). Le anomalie citogenetiche individuate al momento della diagnosi costituiscono un altro importante fattore prognostico: pazienti con traslocazione dei cromosomi 8 e 21 (t(8;21)), inversione del cromosoma 16 (inv(16)) e traslocazione dei cromosomi 15 e 17 (t(15;17)) hanno prognosi estremamente favorevole, mentre altre alterazioni cromosomiche quali la delezione del braccio lungo del cromosoma 5 (del(5q) ed anomalie del braccio corto del cromosoma 12 (12p), sono associate ad una prognosi più sfavorevole. Anche la presenza all'esordio di un numero di blasti circolanti superiore a 30.000/mm³, leucocitosi, o elevata espressione di PgP, sono considerati fattori prognostici negativi.

La terapia delle LAM si basa sulla somministrazione di agenti citotossici con l'obiettivo di eradicare il clone leucemico. In genere si ricorre a schemi di polichemioterapia d'induzione e successivamente di consolidamento, basati sull'impiego combinato di citosina arabinoside ed antracicline. La prima fase permette di ottenere la scomparsa delle cellule leucemiche e di normalizzare il quadro ematologico periferico e midollare; la seconda fase consente di ottenere una definitiva guarigione. Il 60-70% dei pazienti trattati con questo tipo di terapia ottiene una remissione stabile, ma un 15-20% è resistente o ricade molto rapidamente, ed una percentuale simile muore per complicazioni prima di andare in remissione o durante il consolidamento. Per coloro che ottengono una remissione stabile sono possibili quattro principali opzioni. 1) non

procedere con alcuna ulteriore terapia; 2) la prosecuzione della polichemioterapia; 3) il trapianto di cellule staminali autologhe; 4) il trapianto di cellule staminali eterologhe. In assenza di terapia la percentuale di sopravvivenza a 5 anni è molto bassa (10-20%). Tale percentuale può essere aumentata (10-30%) proseguendo con la polichemioterapia, ma a costo di un notevole peggioramento della qualità della vita del paziente. Il trapianto di midollo osseo allogenico si è rivelato estremamente efficace nel ridurre il rischio di ricaduta in pazienti in prima remissione completa (sopravvivenza a 5 anni: 30-60%). Tuttavia, sono candidati a tale tipo di terapia soltanto pazienti con meno di 55 anni d'età e con donatore compatibile. Il trapianto autologo, pur presentando minori percentuali di successo, rappresenta una valida alternativa per pazienti d'età inferiore ai 60 anni che abbiano raggiunto la remissione completa.

Un caso a parte è rappresentato dalla leucemia promielocitica (LAP) M3, la cui alterazione citogenetica patognomica è la traslocazione dei cromosomi 15 e 17 (t(15;17)), che dà origine al trascritto di fusione PML-RAR α codificante per una forma chimerica del recettore per l'acido trans-retinoico (ATRA), caratterizzata da una scarsa affinità per il proprio ligando, indispensabile per indurre il differenziamento dei promielociti. La somministrazione dell'ATRA ad alte dosi permette di ripristinare il segnale mediato dal recettore e di ottenere la maturazione dei promielociti leucemici ed ha consentito di ottenere in combinazione con idarubicina, percentuali di remissione completa attorno al 90%.

Nonostante i numerosi studi condotti negli ultimi decenni abbiano permesso di approfondire le nostre conoscenze riguardo alle LAM, la sopravvivenza complessiva dei pazienti affetti da questo tipo di neoplasie resta attorno al 25% (Tura e Baccarani, 2003). Una più approfondita comprensione dei meccanismi molecolari alla base del

processo di trasformazione e di progressione neoplastica sarà probabilmente indispensabile per lo sviluppo di terapie innovative, maggiormente efficaci e meno tossiche per il paziente.

2. *L'espressione di IDO in cellule tumorali*

Recenti studi suggeriscono che l'espressione di IDO da parte delle stesse cellule tumorali possa assumere un ruolo importante nell'ambito del processo di *tumor-escape*. Nel 2003 Uyttenhove ha dimostrato l'espressione di IDO, funzionalmente attiva, non solo in linee di tumori umani, ma anche in cellule primarie di tumori provenienti da pazienti. In alcuni dei tumori analizzati (in particolare nel carcinoma della prostata, del colon-retto, del pancreas, della cervice e dell'endometrio) l'espressione di IDO è stata osservata in tutti i campioni analizzati, mentre in altri è stata rinvenuta solo in una percentuale più o meno ampia. In tutti i casi analizzati, la maggior parte delle cellule stromali sono risultate negative per l'espressione di IDO, il che ha portato ad ipotizzare che l'espressione della proteina da parte delle cellule tumorali *in vivo* non sia indotta dall'esposizione all'IFN- γ , in quanto in tal caso anche le cellule stromali avrebbero dovuto mostrare un aumento dell'espressione di IDO.

Al fine di stabilire se l'espressione costitutiva di IDO da parte delle cellule tumorali ne impedisse il rigetto mediato da cellule T, è stata utilizzata una linea tumorale murina non esprimente IDO, la P815B. Tale linea è stata dapprima transfettata con il gene per IDO e successivamente iniettata intraperitonealmente in topi precedentemente immunizzati con un antigene proprio di quella linea tumorale. L'espressione di IDO in tali cellule ha permesso loro di resistere al rigetto che si osservava, invece, iniettando in topi immunizzati cellule P815B transfettate con il plasmide vuoto. È stato inoltre escluso che l'espressione di IDO da parte delle cellule tumorali potesse influenzare

direttamente la loro tumorigenicità dal momento che cellule P815B IDO⁺ e IDO⁻ davano origine a tumori che si sviluppavano con la stessa cinetica in topi irradiati. I risultati ottenuti da Uyttenhove suggerivano, dunque, che la progressione del tumore in topi immunizzati potesse essere attribuibile all'abilità delle cellule tumorali esprimenti IDO di prevenire il rigetto immunologico, grazie ad un meccanismo mediato dall'attività dell'enzima. A conferma di tale ipotesi, topi immunizzati, trattati con 1-MT, rigettavano le cellule P815B IDO⁺ in maniera molto più efficiente di quanto non facessero topi non trattati con l'inibitore dell'enzima, anche se il trattamento con tale sostanza non consentiva, comunque, di prevenire completamente la crescita tumorale *in vivo* (Burke et al., 1995).

E' possibile che l'attività di IDO nelle cellule tumorali non faccia parte di una via metabolica costitutiva, ma piuttosto sia indotta da attacchi immunitari caratterizzati da un'abbondante produzione di IFN- γ , o altre citochine. La capacità del tumore di indurre un'immunosoppressione mediata da IDO rifletterebbe, pertanto, un processo stocastico di acquisizione di mutazioni influenzato dalla pressione selettiva del sistema immunitario dell'ospite, in accordo con il modello di *immunoediting*.

Sebbene IDO possa essere frequentemente coinvolto nell'induzione della tolleranza verso antigeni tumorali, certamente la sua espressione non costituisce l'unico meccanismo responsabile della capacità del tumore di evadere la risposta immunitaria, dal momento che topi knock-out per IDO risultano ancora suscettibili allo sviluppo di tumori e non si osservano regressioni complete delle lesioni tumorali IDO⁺ in topi trattati soltanto con 1-MT (Uyttenhove et al., 2003).

Si è visto, inoltre, che una volta ottenuta una tolleranza verso gli antigeni tumorali, questa può essere mantenuta anche eliminando l'attività di IDO, il che induce ad ipotizzare l'esistenza di altri meccanismi in grado di garantire un mantenimento della

tolleranza una volta che questa si sia instaurata. Questi dati sono di particolare importanza poiché mettono in evidenza come nell'ambito di un tumore già sviluppatosi, la semplice inibizione di IDO potrebbe non essere sufficiente a rompere la tolleranza verso gli antigeni tumorali (Munn, 2006).

Per quanto riguarda l'espressione di IDO in blasti di LAM, il nostro gruppo è stato il primo a dimostrare che una quota di blasti di pazienti affetti da LAM esprime IDO in maniera costitutiva in forma attiva, essendo in grado di metabolizzare il triptofano in chinurenine e di inibire la risposta T-linfocitaria. Inoltre il nostro gruppo ha dimostrato che l'esposizione a IFN- γ di blasti inizialmente IDO⁻, causa l'up-regolazione di IDO (Curti et al., 2007) e che l'espressione di IDO correla con la presenza *in vivo* e l'induzione *in vitro* di linfociti Treg (Curti et al., 2007). Pertanto, anche nella leucemia acuta mieloide, IDO ha un ruolo immunosoppressivo e può essere considerato al centro di un nuovo *pathway* di *escape* da parte delle cellule leucemiche.

3. *Le cellule dendritiche leucemiche*

I blasti di leucemia mieloide acuta esprimono raramente le molecole co-stimolatorie CD80 e CD86 e non differenziano spontaneamente in cellule dendritiche. La capacità dei blasti di LAM di differenziare *in vitro* è descritta da diversi anni (Sachs et al., 1978), mentre la capacità di differenziare *in vivo* in presenza di GM-CSF e IL-3 è stata descritta solo nei topi. L'osservazione di pazienti ricaduti, in cui era stato effettuato un trapianto di cellule staminali allogeniche, ha mostrato che, *in vivo*, il differenziamento avviene durante gli stadi iniziali della ricaduta. Recentemente, il differenziamento in senso dendritico di blasti di LAM è stato ottenuto *in vitro* in presenza di GM-CSF e IL-4 (Choudhury et al., 1998). È stato dimostrato che l'espressione delle molecole di

classe HLA, delle molecole costimolatorie e di ICAM-1 viene aumentata dalla combinazione di GM-CSF e IL-4 con Flt-3L e TNF- α . Coltivando i blasti per 14 giorni con varie combinazioni di citochine, incluso il GM-CSF, il TNF- α , l'SCF, il Flt3-L, l'IL-3 e l'IL-4, si ottengono delle DC in grado di presentare l'antigene (Harrison et al., 2001; Woiciechowsky et al., 2001). Queste AML-DC ottenute dalla coltura in presenza di citochine possono essere maturate coltivandole per altri 2 giorni con un cocktail di citochine infiammatorie (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e PGE₂) o aggiungendo il CD40L (Cignetti et al., 2004). Metodi alternativi per maturare le AML-DC sono rappresentati dall'irradiazione con onde gamma dei blasti in coltura o con l'utilizzo di adenovirus per il trasferimento di TNF- α . Entrambi questi metodi inducono l'espressione del CD80 e del CD86 e aumentano la capacità proliferativa delle cellule T. E' stato anche ottimizzato un procedimento breve per il differenziamento dei blasti di LAM in AML-DC e che prevede 5-7 giorni di coltura dei blasti in presenza di GM-CSF e IL-4 o IL-13 (Mohty et al., unpublished).

In saggi di migrazione *in vitro* le AML-DC mature mostrano una potente capacità migratoria verso le chemochine associate ai linfonodi, SDF-1 e MIP-3 β , suggerendo che, anche *in vivo*, esse siano in grado di migrare verso i linfonodi (Westers et al., 2003). Le AML-DC sono potenti induttori di una risposta T in test di allo-reattività. In particolare, le AML-DC sono in grado di indurre una risposta Th1 attraverso cui stimolano una popolazione di CD8⁺ citotossici. Dopo una co-coltura di AML-DC e linfociti T, infatti, nel terreno di coltura si può trovare IFN- γ , ma non IL-4 o IL-10, e i T linfociti si dimostrano in grado di riconoscere e lisare blasti autologhi (Harrison et al., 2001). Da notare che questa popolazione di linfociti T citotossici mantiene una piccola capacità citotossica anche in presenza delle cellule sane autologhe dopo remissione (Choudhury et al., 1999).

La capacità di differenziare in AML-DC è FAB-indipendente. Si è visto che blasti che esprimono il recettore per il TNF- α , o che esprimono il marcatore CD14, possono essere più facilmente indotti al differenziamento *in vitro* attraverso la coltura con citochine, ma la mancata espressione di queste molecole non si traduce per forza nell'incapacità a differenziare. Il differenziamento di blasti di LAM, inoltre, può avvenire sia in casi a cariotipo favorevole che sfavorevole, sia in casi di nuova diagnosi e non trattati, che in casi di ricaduta e resistenti alla chemioterapia. I casi resistenti alla chemioterapia possono essere sensibili all'immunoterapia con anticorpi coniugati.

Ci sono buone ragioni per utilizzare le cellule dendritiche derivate da blasti in immunoterapia. I blasti esprimono antigeni tumorali capaci di indurre una risposta T ad alta avidità, come bcr-abl, WT-1, PR3, PML-RAR- α e PRAME. Sono state osservate risposte indotte da WT-1 e PR3 ed è stata provata la presenza di anticorpi specifici anti-WT-1 nel 15-25% dei pazienti con LAM. Sfortunatamente questi antigeni non sono espressi uniformemente in tutti i pazienti con LAM e nemmeno in tutti i pazienti affetti dallo stesso sottotipo di LAM. La capacità unica dei blasti di differenziare in cellule dendritiche, sotto opportune condizioni, fornisce l'opportunità di generare cellule presentanti l'antigene (APC) con la potenziale possibilità di presentare un ampio range di antigeni, anche non ancora identificati, specifici per ogni sottotipo di leucemia. La natura leucemica delle AML-DC è stata confermata dall'ibridazione *in situ* che mostra la presenza delle anomalie cromosomiche di origine e da saggi di PCR che rilevano l'espressione di antigeni associati alla leucemia, come WT-1 o PRIME.

D'altra parte, però, i sottotipi di DC circolanti, sia mieloidi che plasmacitoidi, di pazienti con LAM mantengono le stesse alterazioni nel cariotipo dei blasti, che possono alterare le proprietà delle DC. Le AML-DC plasmacitoidi mostrano uno squilibrio nelle

quantità e una compromissione nelle capacità di maturare, di stimolare la proliferazione dei linfociti T e di secernere TNF- α in risposta a stimolazione con microbi (Mohty et al., 2001). Inoltre, il lavoro di Mohty mostra come le AML-DC plasmacitoidi non vengano stimulate dall'attivazione del CD40 e presentino una bassa espressione delle molecole di adesione e dell'HLA-DR. Le AML-DC mieloidi, invece, mantengono la capacità di maturare, ma si sono dimostrate in grado solo di indurre una popolazione di linfociti T regolatori, sia *in vitro* che *in vivo* (Steinbrink et al., 2009).

Si deve anche tenere presente che il numero di AML-DC da iniettare necessario a evocare una risposta immunitaria anti-leucemica non è ancora stato stabilito e probabilmente dipende dalla densità antigenica, dall'avidità per il TCR, dalla condizione del sistema immunitario del paziente e dalla quantità di cellule leucemiche residue. Di conseguenza, nel disegno di studi clinici bisogna tenere in grande considerazione l'eventualità di sviluppare metodi di immuno-monitoraggio che siano un reale specchio dell'efficacia clinica. Inoltre, si deve evitare il rischio di iniettare insieme alle AML-DC anche cellule leucemiche residue che non si siano differenziate e che potrebbero potenzialmente causare la ricaduta della malattia. Per farlo è necessario irradiare le cellule prima dell'iniezione. È stato infatti dimostrato che blasti e AML-DC irradiati non sono più in grado di proliferare, ma che le AML-DC, anche se irradiate, mantengono la capacità di indurre i linfociti T a proliferare. Si è osservato che l'efficacia della terapia correla con la presenza di linfociti T specifici (Van Driessche et al., 2009).

I programmi clinici di vaccinazione con AML-DC dipendono dalla possibilità di generare un grande numero di AML-DC in assenza di siero fetale bovino, dato che l'utilizzo di siero fetale bovino comporta il rischio che vengano presentati antigeni

irrilevanti contenuti nel siero, che possono causare complicazioni anafilattiche (Mackensen et al., 2000). A questo problema si può ovviare utilizzando i terreni *serum-free* di nuova generazione, o il siero umano autologo. Entrambi questi metodi testati *in vitro* hanno dato buoni risultati. D'altra parte questi sieri alternativi contengono vari fattori di crescita identificati e non identificati, e fattori soppressivi di derivazione tumorale che possono alterare i processi di differenziamento e di maturazione, rendendo perciò impossibile standardizzare le condizioni di coltura.

Materiali e Metodi

1. *Cellule*

Tutti i campioni umani utilizzati sono stati ottenuti dopo consenso informato, secondo le linee guida istituzionali. Le cellule di donatori sani sono state ottenute durante la preparazione di prodotti per la trasfusione. I blasti leucemici sono stati ottenuti da pazienti affetti da LAM; i campioni, provenienti da sangue periferico e da sangue midollare, sono stati raccolti al momento della diagnosi.

2. *Separazione di cellule mononucleate da sangue periferico*

Al fine di recuperare le cellule mononucleate (MNC), i campioni sono stati diluiti (rapporto 1:2 per il sangue periferico ed 1:3 per quello midollare) in soluzione fisiologica e successivamente stratificati su gradiente di concentrazione (Lymphoprep; 1.077 g/ml; Nycomed Pharma, Oslo, Norway). Dopo centrifugazione a 2000 rpm per 20 minuti, l'anello di cellule mononucleate è stato prelevato e le cellule sono state lavate due volte con PBS. Le cellule recuperate sono state contate in camera di Neubauer con acido acetico 3%.

3. *Separazione immunomagnetica*

Le popolazioni cellulari di interesse sono state ottenute utilizzando un sistema di separazione su colonna mediante biglie immunomagnetiche (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), secondo le istruzioni della ditta. Tale sistema di separazione consente di ottenere buoni recuperi (>85%) e un eccellente livello di purificazione (98%).

Il sistema di separazione Miltenyi può essere basato sia sulla selezione positiva che sulla selezione per deplezione di una frazione di cellule presenti in una popolazione eterogenea. La purificazione viene eseguita in un campo magnetico all'interno del

quale viene direttamente posta la colonna di separazione. Quest'ultima è costituita da un supporto in plastica dentro al quale si trova la matrice, attraverso cui vengono fatte passare le cellule marcate, previa idratazione con un'apposita soluzione tampone (utilizzata anche per tutti i passaggi di separazione), costituita da PBS, BSA (*Bovine Serum Albumine*) allo 0.5% ed EDTA alla concentrazione finale di 5 mM. La marcatura delle cellule, risospese nella soluzione tampone, viene fatta mediante incubazione con microbiglie coniugate con l'anticorpo di interesse, in grado di riconoscere contemporaneamente, in modo selettivo, le cellule e di consentirne il successivo legame alla matrice della colonna, al momento del passaggio attraverso il campo magnetico. Al termine dell'incubazione di 15' a 4° C, le cellule vengono lavate con la soluzione tampone al fine di rimuovere i reagenti in eccesso, e risospese alla concentrazione di 10^8 cellule in 500 μ l. A questo punto le cellule sono fatte passare attraverso la colonna di selezione dalla quale viene eluita la frazione negativa che può essere utilizzata per una successiva separazione. Il recupero delle cellule ottenute per selezione positiva, rimaste legate alla matrice, si ottiene rimuovendo la colonna dal magnete ed esercitando, attraverso un apposito stantuffo, una pressione sufficiente a consentirne il distacco.

La peculiarità che distingue il sistema Miltenyi dagli altri sistemi di separazione immunomagnetica, è data dalle caratteristiche proprietà delle microbiglie: le piccole dimensioni (circa 50 nm di diametro) e la particolare composizione (ossido di ferro e polisaccaridi) che le rende totalmente biodegradabili. Questo evita, in seguito alla separazione, di dover procedere al loro distacco ed impedisce qualsiasi interferenza con la vitalità e la funzione delle cellule target, immediatamente utilizzabili dopo la separazione per i saggi colturali.

4. Citofluorimetria

La purezza delle popolazioni cellulari recuperate è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica con sistema FACSCanto™II (BD Biosciences) e software FACSDiva.

La citofluorimetria a flusso è una tecnica estremamente versatile, che consente la valutazione automatica di numerosi parametri fisici e chimici della cellula; questo la rende una delle metodiche d'elezione per la caratterizzazione e l'identificazione degli elementi cellulari presenti in una sospensione eterogenea di cellule.

L'analisi delle caratteristiche fisiche della cellula si basa principalmente sulla valutazione di due parametri. 1) FSC (forward scatter), che fornisce informazioni sul volume cellulare; 2) SSC (side scatter), il cui valore è indicativo della granulosità delle cellule analizzate.

L'analisi citofluorimetrica si presta inoltre alla caratterizzazione immunofenotipica delle cellule, attraverso l'utilizzo di anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi, che riconoscono specifici antigeni di membrana (CD, cluster of differentiation) o molecole intracellulari. Il pattern immunofenotipico è di notevole importanza in campo ematologico nella discriminazione di sottopopolazioni cellulari distinte e con un diverso grado di differenziamento.

In particolare, in questo studio, la citofluorimetria è stata utilizzata per la caratterizzazione immunofenotipica delle dendritiche normali, leucemiche e dei linfociti T regolatori. Per l'identificazione di specifici antigeni di superficie dei tre tipi cellulari, sono stati utilizzati tre colori di fluorescenza. Gli anticorpi impiegati (Becton Dickinson) sono coniugati con PE (Ficoeritrina), con FITC (isotiocianato di fluorescina) o con APC (alloficocianina).

Una marcatura intracellulare è stata effettuata per l'identificazione del fattore di trascrizione FOXP3, marker specifico dei linfociti T regolatori.

Brevemente, sono state preparate due soluzioni costituite da buffer e PBS:

- FOXP3 Fix/Perm Buffer (4X);
- FOXP3 Perm Buffer (10X)

1 ml della soluzione Fix/Perm 1X è stato aggiunto ad ogni tubo contenente le cellule; dopo 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente al buio, è stato rimosso il surnatante. Dopo 2 lavaggi con buffer, 1 ml di FOXP3 Perm Buffer 1X è stato addizionato.

Le cellule sono state incubate a temperatura ambiente al buio per 15 minuti. Rimosso il surnatante, 10 µl dell'anticorpo umano diretto contro FOXP3 coniugato con PE sono stati aggiunti ad ogni tubo.

Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente al buio, le cellule sono state lavate 2 volte, risospese in 1 ml di Buffer ed analizzate al citofluorimetro.

Per valutare la presenza di un clone CD8⁺ produttore IFN-γ e specifico per l'antigene WT-1, sono state effettuate marcature per citofluorimetria in accordo con le istruzioni delle case produttrici. Brevemente, per valutare la produzione di IFN-γ intracellulare dopo aver incubato i linfociti per un'over-night con brefeldina (2 µg/ml, Sigma-Aldrich), è stata effettuata una marcatura extracellulare per il CD8 e successivamente è stata eseguita una marcatura intracellulare utilizzando il reagente "fix and perm" e mettendo l'anticorpo anti-IFN-γ (Becton Dickinson, Buccinasco, Milano) in incubazione al buio per 30 minuti. Dopo aver lavato le cellule, esse sono state acquisite al citofluorimetro. Per la valutazione del clone CD8⁺ specifico per WT-1, dopo aver lavato le cellule con BSA 1% in PBS è stata effettuata una marcatura extracellulare con pentameri (ProImmune, Oxford) specifici per il clone CD8⁺ in grado di riconoscere il peptide WT-1A. Dopo aver lavato le cellule 2 volte sono stati aggiunti gli anticorpi anti-CD8 e anti-CD19 ed è stata effettuata una seconda

marcatura extracellulare. Dopo aver lavato nuovamente le cellule, i campioni sono stati analizzati al citofluorimetro.

5. Generazione di mo-DC da monociti sani e da precursori CD34⁺ e di AML-DC da blasti leucemici

Le mo-DC sono state ottenute da 15 campioni di monociti di soggetti sani e da 15 campioni di cellule CD34⁺. Le AML-DC sono state generate da 12 campioni di blasti di pazienti affetti da LAM. Brevemente, i monociti sono stati coltivati per 5 giorni in terreno RPMI 1640 (Whittaker Bioproducts, Cambrex) addizionato al 10% con FBS (Gibco, Invitrogen), penicillina/streptomicina (50 U/ml), L-glutammina (2mM), con ulteriore aggiunta del fattore stimolante la formazione di colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF 50ng/ml, Endogen, Woburn, MA, USA) e di IL-4 (800U/ml, Endogen, Woburn, MA, USA). Le cellule CD34⁺ sono state coltivate in terreno IMDM (Lonza) addizionato al 10% con FBS, penicillina/streptomicina (50 U/ml), L-glutammina (2mM) per 7 giorni in presenza di GM-CFS (50 ng/ml) e TNF- α (10 ng/ml). In parte sono state utilizzate per i saggi funzionali e in parte sono state coltivate per altri 7 giorni in presenza di GM-CSF (50ng/ml) e IL-4 (800 U/ml). I blasti sono stati coltivati per 6 giorni in terreno RPMI 1640 addizionato al 10% con FBS, penicillina/streptomicina (50 U/ml), L-glutammina (2mM), con ulteriore aggiunta di GM-CSF (50 ng/ml), di IL-4 (800 U/ml) e di TNF- α (10 ng/ml). Dopo coltura, la vitalità delle cellule è stata valutata mediante trypan blue.

6. Maturazione delle mo-DC e delle AML-DC

Le mo-DC sono state maturate per 48 ore con diversi stimoli maturativi: il ligando di CD40 (CD40L, Biolegend, San Diego, CA, USA), il lipopolisaccaride (LPS, Sigma-

Aldrich, St. Louise, MO) da solo o in combinazione con interferone gamma (IFN- γ , Endogen), o il cocktail di citochine (Endogen, USA): TNF- α (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL1- β (10 ng/ml) e PGE2 (1 μ g/ml).

Le AML-DC sono state maturate con il sopra descritto cocktail di citochine.

7. *Reazioni di PCR qualitativa*

L'integrità dei cDNA amplificati mediante la reazione di retrotrascrizione è stata valutata amplificando un gene *housekeeping*, la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), che essendo espresso in tutte le cellule mononucleate, fornisce un controllo della reazione di retrotrascrizione.

Inoltre è stata messa a punto la reazione di PCR per l'amplificazione di INDO, allo scopo di effettuare una valutazione qualitativa della presenza del trascritto nei campioni.

Per le reazioni di amplificazione di GAPDH e INDO, è stata preparata una mix di reazione composta da: PCR Reaction Buffer (1 x, contenente MgCl₂ 1.5 mM), dNTP mix (0.2 mM), primer senso (400 μ M), primer antisenso (400 μ M), 0,25 μ l di Taq DNA Polymerase (1,25 U), 2 μ l di cDNA in un volume finale di 50 μ l. I primers sono riportati in Tabella 3.

GENE	PRIMER	SEQUENZA PRIMER 5'-3'	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
GAPDH	FOREWARD	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT	351 bps
	REVERSE	TGGCAGGTTTTTCTAGACGGC	
INDO	FOREWARD	ATGTGTGGGGCAAAGGTCATGG	318 bps
	REVERSE	AAGTGTCCCGTTCTTGCAITTC	

Tab. 3. Sequenze primer per GAPDH e INDO

Il programma di amplificazione utilizzato è riassunto in tabella 4.

1 ciclo	Denaturazione	94°C	2 min
35 cicli	Denaturazione	96°C	20 sec
	Appaiamento	57°C	30 sec
	Estensione	72°C	35 sec
1 ciclo	Estensione	72°C	7 min
		4°C	Forever

Tab. 4. Programma di amplificazione

E' stata anche messa a punto la reazione di PCR per l'amplificazione di INDO-L (IDO2), allo scopo di effettuare una valutazione qualitativa della presenza del trascritto nei campioni.

I primers sono riportati in Tabella 5.

GENE	PRIMER	SEQUENZA PRIMER 5'-3'	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
INDO-L	FOREWARD	CATAGCAAGGAAAGTGGTGAC	371 bps
	REVERSE	CTAACCACGTGGGTGAAGGATTG	

Tab. 5. Sequenze primer per INDO-L

Il programma di amplificazione utilizzato è riassunto in tabella 6.

1 ciclo	Denaturazione	95°C	5 min
35 cicli	Denaturazione	95°C	30 sec
	Appaiamento	59°C	1 min
	Estensione	72°C	1 min
1 ciclo	Estensione	72°C	7 min
		4°C	Forever

Tab. 6. Programma di amplificazione

I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% in presenza di etidio bromuro.

8. Reazioni di PCR quantitativa

Al fine di quantificare il livello di espressione dell'mRNA del gene INDO, sui campioni è stata eseguita un'amplificazione in real-time PCR con ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems).

Il saggio allestito, schematizzato nella figura a lato, si basa sull'impiego di una sonda oligonucleotidica, specifica per una sequenza interna al cDNA bersaglio, introdotta nella miscela di reazione per rivelarne l'amplificazione.

Tale sonda è marcata con un fluoroforo ed un quencher ravvicinati e, fintanto che la sonda è integra, non viene rilevato alcun segnale di fluorescenza in quanto la vicinanza del fluoroforo al quencher assicura una soppressione della fluorescenza grazie ad un trasferimento di energia di risonanza in fluorescenza (FRET). Durante la fase d'estensione, la sonda che si è ibridata al cDNA target prima dei primers, non può essere estesa dalla DNA polimerasi, in quanto la sua estremità 3' risulta bloccata, e viene pertanto tagliata dall'enzima che possiede anche attività nucleasica. Il taglio della sonda permette di separare il quencher dal fluoroforo la cui fluorescenza può, a questo punto, essere rilevata. All'aumentare della quantità di cDNA amplificato, aumenta la fluorescenza emessa. La fluorescenza, infatti, aumenta per l'accumulo progressivo ed esponenziale di reporter liberi. Lo strumento è in grado di rilevare l'intensità di fluorescenza ad ogni ciclo di reazione, permettendo così di monitorare, in tempo reale, l'aumento dell'amplificato.

La variazione della fluorescenza (ΔR_n) necessaria per determinare il numero di molecole contenute nel campione analizzato viene calcolata come $\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$. R_n^+

è la fluorescenza del campione analizzato normalizzata rispetto a ROX, un reporter passivo contenuto nella Universal Master Mix; Rn^- rappresenta la fluorescenza del bianco (NTC) anche essa normalizzata rispetto alla fluorescenza di ROX.

Nell'analisi dei dati si considera il ciclo soglia Ct (cycle threshold) come il ciclo nel quale si avverte il primo significativo aumento di fluorescenza, cioè il ciclo nel quale viene superato, per la prima volta, il valore di fluorescenza in condizioni basali. Il livello basale viene definito durante il ciclo iniziale, quando esistono piccoli cambiamenti del segnale fluorescente (il treshold è stato fissato a 0,1). Il valore del Ct è utilizzato per l'analisi cinetica poiché è proporzionale al numero di copie iniziali del template. Per ricavare il numero delle molecole iniziali si costruisce una curva a partire da campioni standard, ovvero a concentrazione nota della sequenza studiata.

Una caratteristica di questo sistema, inoltre, è la possibilità di eliminare eventuali contaminazioni nella fase iniziale di reazione grazie all'attivazione di AmpErase UNG (Uracil N-Glycosylase). Questo enzima riconosce e taglia tratti contenenti dUTP, quindi se nella mix è presente RNA, questo viene distrutto mentre il cDNA rimane inalterato.

La reazione di amplificazione è stata eseguita in 25 μ l di volume finale in una miscela di reazione così costituita: 12.5 μ l di Universal Master Mix (Taq polimerasi, dNTPs, AmpErase UNG, reporter passivo ROX, buffer Applied Biosystem 1x), primer senso (600 nM), primer antisenso (600 nM), sonda (200 nM), 5 μ l di cDNA.

Per ciascun campione è stata eseguita, separatamente, ma nella stessa piastra, l'amplificazione del cDNA di INDO il cui prodotto di amplificazione veniva riconosciuto da una sonda specifica marcata all'estremità 5' con il fluoroforo FAM (6-carboxy-fluorescein-phosphoramidite), e del cDNA del gene *housekeeping* ABL,

riconosciuto da una seconda sonda marcata anch'essa con FAM. Entrambe le sonde presentano all'estremità 3' il quencher TAMRA (5-carboxy-tetramethyl-rhodamine). La tabella 7 riporta le coppie di primers e la sonda specifici per il cDNA di INDO. I primers e la sonda impiegati nella reazione di amplificazione di ABL sono quelli forniti nel kit ABL Fusion Quant[®] Standards (IPSOGEN).

		SEQUENZA 5'-3'
PRIMER	FORWARD	GGTCATGGAGATGTCCGTAA
	REVERSE	ACCAATAGAGAGACCAGGAAGAA
PROBE		FAM-CTGTTCTTACTGCCAACTCTCCAAGAAACTG-TAMRA

Tab. 7. Primer di IDO per PCR quantitativa

Nella tabella 8 è riassunto il programma di amplificazione impiegato.

1 ciclo	50°C	2 min
1 ciclo	95°C	10 min
45 cicli	95°C	15 sec
	60°C	1 min

Tab. 8. Programma di amplificazione

Tutti i campioni sono stati analizzati in doppio e per ciascuno si è calcolato il valore medio del Ct (Crossing-threshold.)

Per allestire una curva di calibrazione sono state preparate diluizioni seriali del plasmide pIDO-short in base 10 (10^5 - 10^1 copie). Un'altra curva di calibrazione è stata ottenuta sulla base di diluizioni scalari in base 10 (10^5 - 10^3 copie) del plasmide contenente la sequenza bersaglio di ABL.

Il livello d'espressione di INDO e dello standard interno ABL è stato determinato, in ciascun campione, interpolando i valori medi di Ct ottenuti per INDO e ABL, nelle curve di calibrazione. Per ciascun campione è stato quindi calcolato il rapporto tra i valori medi di espressione di INDO e ABL che ha permesso di normalizzare il livello di espressione dell'mRNA di INDO rispetto a quello di ABL. Questo valore è stato arbitrariamente moltiplicato per 10^4 in modo da esprimere il risultato come numero di copie di INDO per 10^4 copie del gene ABL.

9. Western blotting

Le cellule sono state lisate, in ghiaccio, in tampone di lisi (20 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2,5 mM sodio pirofosfato, 1 mM β -glicerofosfato, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, aprotinina, 1 mM PMSF) ed il lisato totale è stato separato mediante SDS-PAGE al 10%. Dopo la corsa, il blotting è stato eseguito su membrana di nitrocellulosa per 90 minuti a temperatura ambiente ad amperaggio costante di 250 mA in tampone di trasferimento contenente metanolo.

Il corretto trasferimento è stato rilevato mediante colorazione della membrana con Rosso Ponceau. La membrana è stata quindi incubata per 30 minuti in blocking buffer (PBS/TWEEN 0.05% con 5% di latte) per saturare i siti aspecifici.

Per verificare la presenza della proteina IDO, la membrana è stata lasciata over night a 4°C in incubazione con l'Anticorpo primario di coniglio specifico per IDO (Alexis) diluito 1:2000 in blocking buffer. Successivamente, è stata eseguita l'incubazione della membrana a temperatura ambiente per 90 minuti con l'Anticorpo secondario specifico per il primario (anti-coniglio) e marcato con l'enzima perossidasi (diluito 1:5000 in blocking buffer).

Infine la membrana è stata bagnata con una soluzione di sviluppo contenente il substrato (luminolo) per la perossidasi (ChemiLucent detection Kit, Chemicon). Il metodo si basa sulla trasformazione del substrato che genera intermedi instabili eccitati; questi tornano allo stato fondamentale ed emettono radiazione luminosa raccolta da una lastra autoradiografica.

10. Immunocitochimica

Per effettuare l'analisi immunocitochimica, un quantitativo pari a circa 100000 cellule risospese in un volume finale di 100 μ l di PBS, sono state "spottate" su di un vetrino centrifugando (Cytospin, Shandon) per 7 minuti a 75 rpm/min. I vetrini sono quindi stati lasciati asciugare a temperatura ambiente per 24 ore e fissati con acetone per 10 minuti. Per rivelare la presenza della proteina IDO, i vetrini sono stati incubati con un anticorpo primario monoclonale murino anti-IDO (Chemicon, Temecula, CA) diluito 1:10, per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi con PBS, si è aggiunto l'anticorpo secondario rabbit antimouse (Santa Cruz Biotechnology), diluito 1:20, marcato con fosfatasi alcalina ed i vetrini sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo ulteriori tre lavaggi in PBS, si è aggiunto un terzo anticorpo diretto contro la fosfatasi alcalina APAAP (Sigma-Aldrich) diluito 1:50 e si è incubato nuovamente per 20 minuti a temperatura ambiente. Il trattamento con l'anticorpo secondario e l'APAAP è stato ripetuto per altre due volte, con tempi di incubazione di 10 minuti. Prima di procedere allo sviluppo, i vetrini sono stati lavati con PBS. Successivamente, si è quindi preparato un tampone di sviluppo costituito da dimetil-formamide e fucsina (il cromogeno), nel quale i vetrini sono stati mantenuti per 20 minuti in agitazione per evitare la precipitazione del cromogeno. Dopo alcuni

lavaggi in PBS, è stata eseguita una controcolorazione con ematossilina-eosina per 3 minuti. I campioni sono quindi stati osservati con microscopio ottico.

Come controllo positivo sono state impiegate cellule mesenchimali umane (hMSCs), derivanti da midollo osseo, stimulate per 72 ore con 1000 U/ml di IFN γ (Endogen, Woburn, MA) e come controllo negativo, le hMSCs non stimulate.

11. Valutazione dell'attività enzimatica diIDO

Per valutare se l'enzima IDO fosse funzionante, le mo-DC e le AML-DC sono state raccolte, lavate, risospese in Hanks buffer (composizione: CaCl₂ 1,26 mM, MgCl₂ 0,493 mM, MgSO₄ 0,407 mM, KCl 5,33, KH₂PO₄ 0,441 mM, NaHCO₃ 4,17 mM, NaCl 137,93 mM, Na₂HPO₄ 0,338 mM, D-Glucosio 5,56 mM) arricchito con 500 mM di L-triptofano in assenza e in presenza dell'inibitore 1MT (1mM), incubate per 4 ore a 37°C in ambiente umidificato al 5% di CO₂. Al termine del periodo di incubazione sono stati raccolti i surnatanti ed è stato aggiunto acido tricloroacetico al 30% in rapporto 2:1. La soluzione è stata vortexata e centrifugata a 8000 g per 5 minuti. Successivamente sono stati trasferiti 75 μ l di questa soluzione in una piastra da 96 pozzetti a fondo piatto e sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 75 μ l di reagente di Ehrlich (100 mg of p-dimetilbenzaldeide, 5 mL acido acetico glaciale; Sigma-Aldrich). Ogni campione è stato caricato in triplicato. E' stata misurata la densità ottica dei campioni usando un lettore di piastre Multiskan EX (M-Medical, Cornaredo, Milano) a 490 nm.

12. Test di proliferazione dei linfociti T

Al fine di valutare se l'espressione di IDO comporta una diminuzione della proliferazione T cellulare, mo-DC o AML-DC sono state utilizzate come stimolatori

per linfociti T CD3⁺ allogenici o autologhi (effettori) in un test di proliferazione MLR (*mixed lymphocyte reaction*).

Per il saggio di MLR allogenica, le DC, risospese in RPMI 1640, sono state irradiate a 3000 cGy e incubate alla concentrazione di 10⁴ cellule/pozzetto con linfociti allogenici T CD3⁺, alla concentrazione di 10⁵ cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti. Inoltre, per stabilire se l'inibizione di IDO consente di ripristinare la proliferazione T cellulare, è stato aggiunto alla coltura l'inibitore 1-MT (1 mM).

Per il saggio di MLR autologa, le DC, risospese in RPMI 1640 sono state pulstate con la tossina tetanica (1 µg/ml) per 24 ore, quindi lavate e maturate. Successivamente sono state irradiate a 3000 cGy e incubate alla concentrazione di 10⁴ cellule/pozzetto con linfociti allogenici T CD3⁺, alla concentrazione di 10⁵ cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti. Inoltre, per stabilire se l'inibizione di IDO consente di ripristinare la proliferazione T cellulare, è stato aggiunto alla coltura l'inibitore 1-MT (1 mM).

Dopo un'incubazione di 5 giorni a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂, è stato aggiunto 1µCi (0.037 MBq) per pozzetto, di [³H]timidina (Amersham Pharmacia Biotech). La processazione delle piastre di coltura, è stata effettuata, dopo 18 ore di incubazione con [³H]timidina, utilizzando un Filtermate cell Harvester (Packard Bioscience) e l'incorporazione di [³H]timidina è stata misurata come conta per minuto (cpm) con un TopCount NXT™ β counter (Packard Bioscience). La proliferazione T cellulare è stata calcolata per ciascuna condizione, in termini di indice di stimolazione (SI) come segue: cpm effettori in presenza di stimolatori / cpm effettori.

13. Induzione dei linfociti T regolatori

Allo scopo di valutare se le DC fossero in grado di generare linfociti T regolatori, queste sono state messe in coltura per 5-7 giorni in terreno RPMI 1640 al 10% FBS

con linfociti T autologhi o allogenici (1×10^6 /ml) in un rapporto 1:50 (DC:Ly), in assenza o in presenza dell'inibitore 1MT (1 mM). Al termine della coltura le cellule sono state raccolte ed è stata effettuata la valutazione del fenotipo al citofluorimetro. In alcuni casi i linfociti T regolatori sono stati purificati con metodo immunomagnetico mediante deplezione delle cellule $CD4^+CD127^-$ e successiva selezione positiva delle cellule $CD25^+$ e sono stati utilizzati per i saggi funzionali.

14. Valutazione della capacità soppressiva dei Treg

Per valutare se la popolazione $CD4^+CD25^+$ generata dalla co-coltura dei linfociti $CD3^+$ con DC IDO^+ possedesse la capacità soppressiva propria dei Treg, le cellule $CD4^+CD25^+$ generate sono state aggiunte in un saggio di MLR allogenica. In particolare, per verificare se le cellule $CD4^+CD25^+$ generate in presenza di DC esprimenti un'alta quantità di IDO e quelle generate in presenza di DC esprimenti una bassa quantità di IDO avessero una differente capacità soppressiva, le cellule $CD4^+CD25^+$ sono state aggiunte in diversi rapporti. Dopo un'incubazione di 5 giorni a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 , è stato addizionato $1\mu\text{Ci}$ (0.037 MBq) per pozzetto, di [^3H] timidina ed è stata processata la piastra come già descritto. La proliferazione T cellulare è stata calcolata per ciascuna condizione, in termini di indice di stimolazione (SI) come segue: (cpm effettori in presenza di stimolatori e regolatori) – (cpm effettori in presenza di regolatori) / cpm effettori.

15. Inibizione della risposta anti-leucemica $CD4^+$

Al fine di indurre una risposta $CD4^+$ specifica verso antigeni leucemici, blasti di LAM sono stati lisati mediante 3 cicli di 10 minuti l'uno di congelamento-scongelo (-80°C , $+37^\circ\text{C}$) seguiti da passaggio in siringa da insulina e l'omogenato ottenuto è stato

utilizzato per pulsare DC ottenute da monociti di donatori sani, con un rapporto DC:blasti di 1:2. Dopo un'incubazione di un'over-night, le DC sono state lavate e maturate.

La capacità endocitotica delle DC era stata precedentemente valutata con il metodo della PKH26 (Sigma-Aldrich). Brevemente, i blasti di LAM erano stati lavati in terreno privo di siero e di antibiotici e risospesi in diluente C (10^6 cellule in 200 μ l). Ai blasti era stato aggiunto v/v il colorante PKH26 diluito. Dopo 4 minuti di incubazione al buio, la reazione era stata bloccata mediante l'aggiunta di siero e la successiva incubazione per 4 minuti al buio. I blasti erano stati lisati e l'omogenato era stato aggiunto alla coltura delle DC in rapporto blasti:DC 2:1. Dopo un'over-night, le DC erano state analizzate al citofluorimetro.

Per ottenere una risposta $CD4^+$, linfociti $CD3^+$ autologhi sono stati coltivati con le DC pulstate con il lisato di blasti di LAM in rapporto 10:1 (Ly:DC). Durante la fase di priming 20U/ml di interleuchina 2 (IL-2; Proleukin, Novartis, Basel, Switzerland) sono state aggiunte a giorni alterni per 8 giorni. Dopo 8-10 giorni di co-coltura, le cellule sono state raccolte e i linfociti sono stati ri-stimolati con altre DC pulstate con il lisato di blasti dello stesso paziente. Dopo 48 ore dalla ristimolazione sono state aggiunte 20U/ml di IL-2. Al termine del terzo ciclo di ristimolazione, i linfociti T sono stati raccolti, separati e utilizzati in MLR in cui gli stimolatori erano rappresentati da DC pulstate o non pulstate con i blasti dello stesso paziente con cui erano stati stimolati, in assenza e in presenza di Treg ottenuti dalla co-coltura con AML-DC.

16. Inibizione della risposta anti-leucemica $CD8^+$

I blasti di pazienti affetti da LAM precedentemente selezionati per l'espressione di HLA-A0201 sono stati differenziati in cellule dendritiche e pulsati per 4 ore in terreno

completo con 10 µg/ml di peptide derivato dal tumore di Wilms (WT-1) ristretto per HLA-A0201 (PRIMM, Milano, Italia). Le AML-DC pulsate e non pulsate sono state messe in coltura per 7 giorni con linfociti CD3⁺ autologhi, in assenza e in presenza di Treg, in rapporto 1:10 (DC:Ly). A giorni alterni sono state aggiunte IL-15 (10 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN), IL-7 (5 ng/ml; Endogen) e IL-2 (20 U/ml). Dopo 24 ore di incubazione è stata valutata la produzione di IFN-γ intracellulare, mentre al termine della coltura è stata valutata la presenza di un clone CD8⁺ specifico per WT-1 (metodiche descritte sopra).

Risultati

I. L'espressione e la funzione di IDO in mo-DC

1. Il differenziamento da monocita a mo-DC

Utilizzando la metodica precedentemente descritta, abbiamo generato cellule dendritiche a partire da monociti di soggetti sani (mo-DC). L'avvenuto differenziamento in senso dendritico è stato confermato sia dall'osservazione al microscopio (Fig. 5), che dall'analisi fenotipica al citofluorimetro (Tab. 9).



Fig. 5. osservazione al microscopio ottico del differenziamento in senso dendritico

	HLA-DR	CD40	CD80	CD86	CD83	CD14
immature	96 ± 2,8	50 ± 8,4	54,1 ± 6,2	39,5 ± 4,7	4,5 ± 4,9	2,3 ± 2,1

Tab. 9. principali marcatori delle cellule dendritiche

Per verificare se i diversi stimoli maturativi inducessero preferenzialmente la presenza di una delle sottopopolazioni di DC conosciute, abbiamo effettuato al citofluorimetro la marcatura con i principali antigeni citati precedentemente. Gli stimoli maturativi

utilizzati sono stati i seguenti: il CD40L, che mima l'interazione di base con i linfociti T, l'LPS, che mima la presenza di batteri, LPS con l'aggiunta di IFN- γ , che mima una situazione di flogosi consistente e la combinazione di 4 citochine pro-infiammatorie (cocktail = IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE $_2$), che mima un quadro decisamente infiammatorio.

Dalla tabella 5 si evince che gli stimoli maturativi utilizzati, rispetto alle DC immature, non modulano in maniera significativa la presenza di DC CD11c⁺ o CD103⁺, mentre modulano la presenza di DC CD123⁺, CD209⁺, CD1a⁺. In particolare, le DC CD209⁺ e quelle CD1a⁺ diminuiscono progressivamente se le DC immature vengono trattate con CD40L, LPS, LPS+IFN- γ e cocktail di citochine, mentre la popolazione di DC CD123⁺ viene up-regolata in presenza di LPS o del cocktail di citochine e viene up-regolata ulteriormente in presenza di LPS+IFN- γ (Tabella 10).

	CD123	CD103	CD209	CD11c	CD1a
immature	5,1 ± 1,9	4,5 ± 1,7	85,6 ± 4,3	91,9 ± 5,2	84,5 ± 4,9
CD40L	5,5 ± 2,3	4,8 ± 2,1	72 ± 5,2	89,9 ± 2,7	65,2 ± 6,1
LPS	11,4 ± 2,4	7,4 ± 2,6	66,7 ± 4,2	76,3 ± 3,6	43 ± 3,6
LPS+IFNγ	20,5 ± 3,5	8,9 ± 1,8	58,7 ± 5,5	85,6 ± 4,2	41,8 ± 2,8
cocktail	12,5 ± 2,8	4,2 ± 1,9	59,5 ± 4,3	75,9 ± 4,8	38,2 ± 8,5

Tab. 10. confronto tra i principali marcatori delle sottopopolazioni di DC

2. *Up-regolazione diIDO durante la maturazione delle mo-DC*

Allo scopo di valutare se i diversi stimoli maturativi inducessero un differente livello di maturazione e influenzassero l'espressione di IDO, le mo-DC maturate con i 4 diversi

stimoli maturativi sono state valutate al citofluorimetro per l'espressione dei marcatori di maturazione e sono state utilizzate per quantificare l'espressione di IDO. Come si può vedere dalla tabella 11, il CD40L, up-regolando in maniera modesta l'espressione di molecole costimolatorie e marcatori di maturazione, induce una maturazione minore rispetto agli altri 3 stimoli, che invece maturano fortemente le cellule dendritiche.

	HLA-DR	CD40	CD80	CD86	CD83
immature	96 ± 2,8	50 ± 8,4	54,1 ± 6,2	39,5 ± 4,7	4,5 ± 4,9
CD40L	97,8 ± 1,3	66,3 ± 5	63 ± 2,2	46,7 ± 4,2	35,3 ± 9,7
LPS	99 ± 1,7	86,1 ± 5,3	88 ± 5,6	84,5 ± 6	58,8 ± 8,9
LPS+IFNγ	99,1 ± 1,5	87,8 ± 6,5	87,8 ± 6,4	85,8 ± 5,3	62 ± 5,7
cocktail	97,5 ± 6,7	86,3 ± 7,4	85,9 ± 7,2	94,3 ± 2,1	62,1 ± 5,9

Tabella 11. confronto tra gli stimoli maturativi nell'indurre la maturazione delle DC

Dalle DC immature e mature è stato estratto l'RNA ed è stato quantificato in real-time PCR quantitativa assoluta il trascritto di IDO normalizzato sul gene ABL. Come si può vedere dalla figura 6, la maturazione con qualunque stimolo up-regola la trascrizione di IDO, ma DC allo stesso livello di maturazione mostrano una differente espressione di IDO, dimostrando che maturazione e espressione di IDO non correlano fra loro. Infatti, se è vero che le DC maturate con il CD40L sono poco mature ed esprimono un basso livello di IDO ($p < 0,05$), è anche vero che DC maturate con LPS, LPS+IFN- γ e cocktail di citochine mostrano un livello di maturazione paragonabile tra loro, ma una diversa espressione di IDO: quelle maturate con LPS da solo inducono una minor espressione di IDO rispetto agli altri due stimoli ($p < 0,01$).

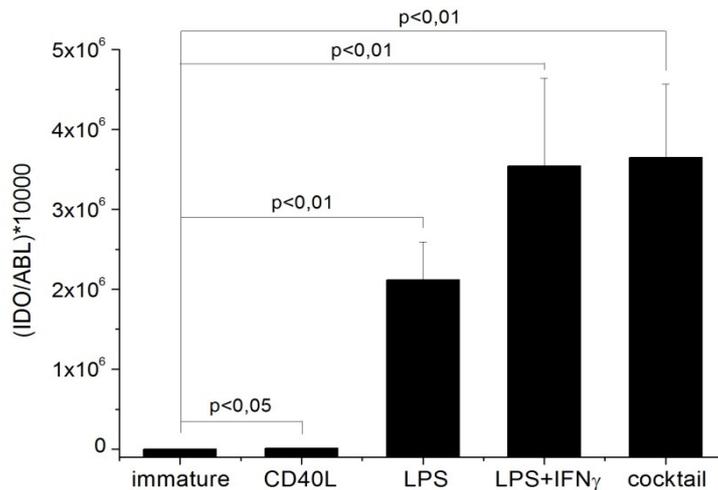


Fig 6. espressione dell'mRNA di IDO in DC immature e maturate con i diversi stimoli

Dopo aver valutato la presenza e quantificato l'espressione del trascritto di IDO, abbiamo valutato la sua espressione proteica mediante Western Immunoblot. La figura 7 mostra che l'espressione proteica correla con l'espressione del trascritto. Infatti, le DC immature (1) e le DC maturate con il CD40L (4) esprimono bassi livelli di IDO, le DC maturate con l'LPS da solo (5) esprimono un livello intermedio, mentre le DC maturate con LPS+IFN- γ (2) o con il cocktail di citochine (3) esprimono il livello massimo.

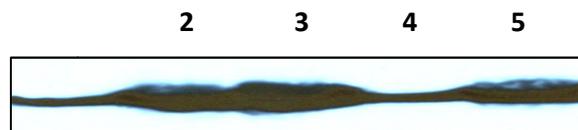


Fig. 7. Western Immunoblot delle DC immature e maturate con i diversi stimoli

Dimostrata l'espressione della proteina abbiamo valutato se questa fosse funzionalmente attiva. L'attività di IDO è stata quantificata mediante la misurazione dei livelli di chinurenine prodotte nel surnatante di coltura di cellule dendritiche

immature e cellule dendritiche maturate con i 4 diversi stimoli maturativi, in presenza di un eccesso di triptofano (500 μM). Dalla figura 8 si può vedere come anche il livello di chinurenine prodotte correla con l'espressione di IDO: nei surnatanti di DC immature e maturate con il CD40L si trova una minima quantità di chinurenine ($p < 0,05$), nei surnatanti di DC maturate con LPS se ne trova una quantità intermedia ($p < 0,03$), mentre in quelli di DC maturate con LPS+IFN- γ e con il cocktail di citochine se ne trova un'elevata quantità ($p < 0,01$).

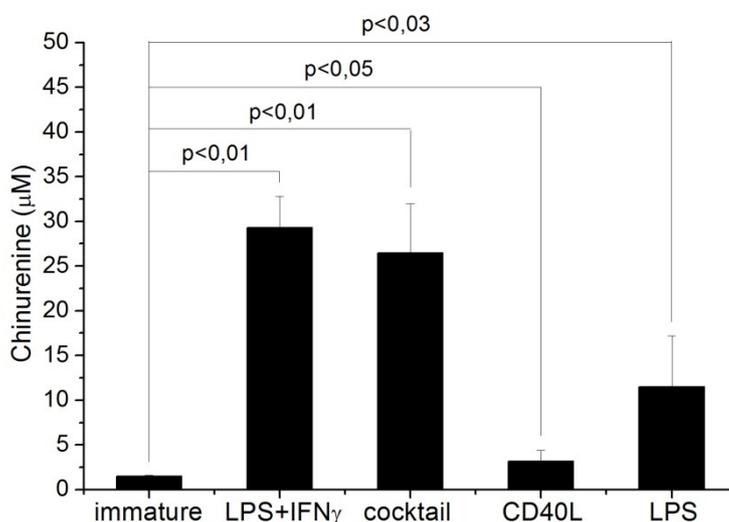


Fig. 8. concentrazione di chinurenine prodotte da DC immature e DC maturate con i vari stimoli

3. *IDO, espresso dalle mo-DC mature, inibisce la proliferazione di linfociti T allogenici e autologhi*

Dopo aver stabilito che lo stimolo che up-regola l'espressione di IDO durante la maturazione delle DC in minor misura è il CD40L, mentre quello che lo up-regola in maggior misura è il cocktail di citochine, le DC maturate con questi 2 stimoli sono state impiegate in test di MLR allo scopo di valutare se la bassa e l'alta espressione di

IDO da parte delle DC mature conferisse loro una diversa capacità di inibire la proliferazione T linfocitaria. In particolare, DC maturate con il CD40L e con il cocktail sono state utilizzate come stimolatori per linfociti T CD3⁺ alloigenici e autologhi. Per il saggio di MLR autologa, le DC immature sono state pulstate con tossoide tetanico per 24 ore e successivamente maturate con i 2 stimoli maturativi in studio. Sia il saggio alloigenico che quello autologo sono stati effettuati in assenza e in presenza dell'inibitore 1-MT in entrambe le sue isoforme, D e L.

Come si può osservare, sia la proliferazione di linfociti T alloigenici (fig. 9a) che quella di linfociti T autologhi (fig. 9b) risultano maggiormente incrementate quando viene aggiunto l'inibitore specifico 1-MT-L ($p < 0,01$), anche se un incremento significativo si osserva anche in presenza dell'isoforma D ($p < 0,02$). Questo risultato conferma l'ipotesi secondo la quale l'espressione di IDO da parte di DC mature sia in grado di inibire la proliferazione T cellulare sia alloigenica che autologa.

Confrontando le due popolazioni di DC, maturate con stimoli diversi, si può notare come l'1-MT-L sia più efficace nel ripristinare la proliferazione indotta dalla popolazione di DC che esprime più fortemente IDO. Dato che è stato proposto che l'isoforma L sia più specifica per IDO, mentre l'isoforma D per IDO2, questi dati inducono a pensare che l'espressione di IDO, ma non quella di IDO2 contribuisca all'immunoregolazione in modo dose-dipendente nell'inibire sia le risposte T alloigeniche, che autologhe.

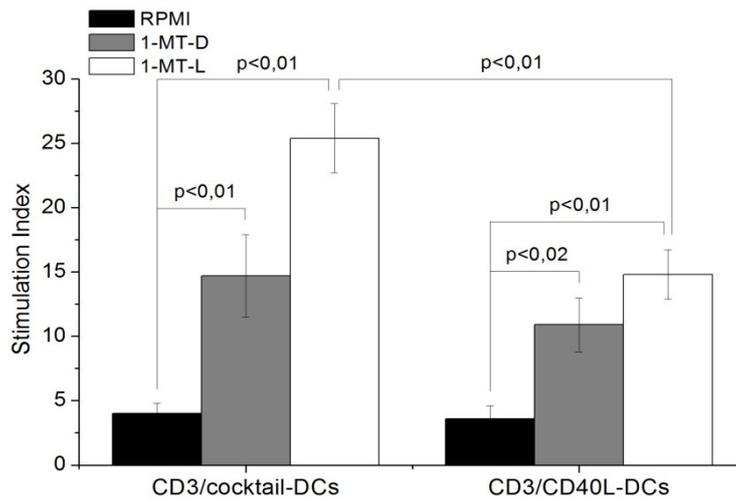


Fig. 9a. ripristino della proliferazione T allogenica inibita dall'espressione di IDO

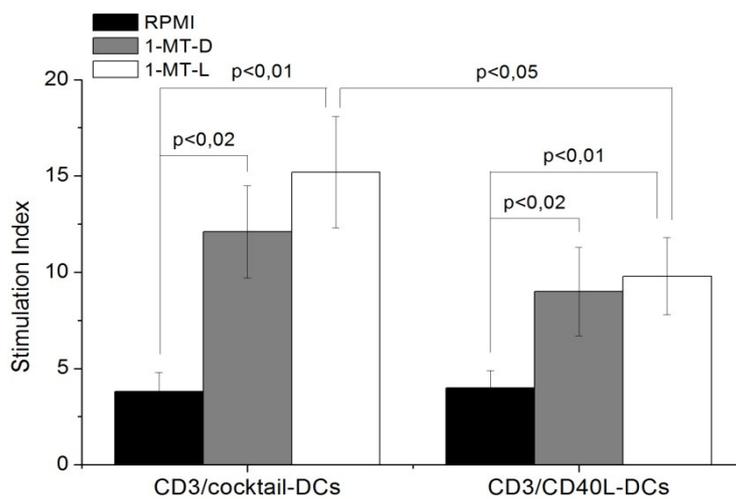


Fig. 9b. ripristino della proliferazione T autologa inibita dall'espressione di IDO

4. *Espressione di IDO2 in mo-DC mature*

Data la diversa capacità di ripristinare la proliferazione T linfocitaria sia allogenica che autologa delle 2 isoforme di 1-MT, e dati gli studi biochimici che indicano l'isoforma D come maggiormente specifica per IDO2, è stata valutata l'espressione di IDO2 nelle DC maturate con i diversi stimoli. In particolare, abbiamo indagato se la

maturazione indotta da stimoli di natura diversa modulasse anche l'espressione di IDO2, come si era già osservato per IDO. Dati preliminari ottenuti dal nostro laboratorio, che si è per ora limitato allo studio della presenza del trascritto di IDO2, indicano che le mo-DC mature esprimono l'mRNA di IDO2. La figura 10 mostra che il trascritto di IDO2 è presente nelle mo-DC utilizzate e che gli stimoli maturativi ne modulano l'espressione. In particolare, a parità di RNA estratto valutato con l'espressione del gene house-keeping GAPDH (Fig. 10a), la modulazione osservata per IDO2 segue lo stesso andamento di quella osservata per IDO (Fig. 10b): le DC immature (1) e quelle maturate con il CD40L (2) esprimono un livello di IDO2 molto basso, quelle maturate con LPS (3) un livello intermedio e quelle maturate con LPS+IFN- γ (4) o con il cocktail di citochine (5) un livello massimo.

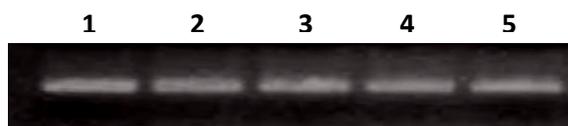


Fig. 10a. espressione dell'mRNA di GAPDH in mo-DC



Fig. 10b. espressione dell'mRNA di IDO2 in mo-DC

5. IDO aumenta la capacità delle DC mature di generare cellule CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ allogeniche e autologhe

Dalla letteratura, è noto che un possibile meccanismo tramite cui IDO possa esercitare la sua attività soppressiva sulla risposta immunitaria sia mediato dalla capacità delle

cellule che esprimono l'enzima di indurre la generazione di Treg [97]. Per investigare se l'espressione di IDO nelle DC mature conferisca loro la capacità di indurre Treg, abbiamo coltivato le DC maturate con il cocktail di citochine, esprimenti un'alta quantità di IDO, o le DC maturate con il CD40L, esprimenti una minima quantità di IDO, con linfociti CD3⁺ allogeni o autologhi per 5-7 giorni, in assenza o in presenza delle 2 isoforme di 1-MT. La co-coltura delle cellule T allogene (fig. 14a) o autologhe (fig. 14b) con le DC mature aumenta la percentuale di cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. La presenza dell'1-MT, soprattutto nell'isoforma L, inibisce la generazione di cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ sia allogene (fig. 11a) che autologhe (fig. 11b) dimostrando il diretto coinvolgimento di IDO nell'induzione di una popolazione di cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ da parte delle DC mature.

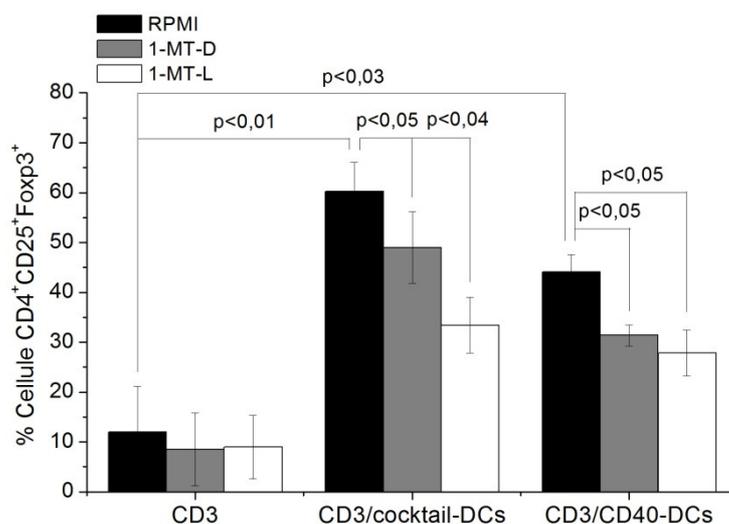


Fig. 11a. generazione di cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ allogene

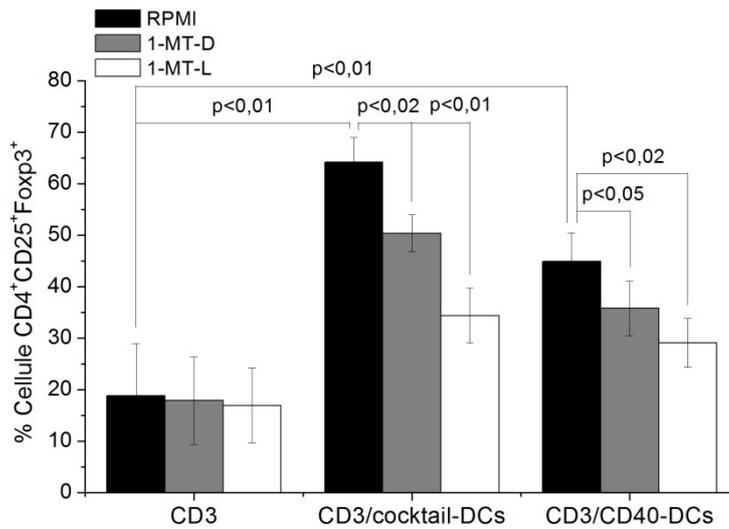


Fig. 11b. generazione di cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ autologhe

6. *Le cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ generate dalle mo-DC IDO⁺ sono linfociti T regolatori (Treg)*

Poiché l'espressione del marcatore Foxp3 non è altamente specifico nell'identificare una popolazione di T regolatori, per verificare la natura regolatoria delle cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ generate, tali cellule sono state inserite in un saggio di MLR in cui cellule mononucleate agissero da stimolatori e cellule CD4⁺CD25⁻ da effettori. Come mostra la figura 12, la proliferazione degli effettori viene inibita notevolmente dalla presenza delle cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ che quindi possono essere considerate Treg. In particolare, le cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ generate da DC che esprimono un'elevata quantità di IDO mostrano una capacità regolatoria maggiore di quelle generate da DC esprimenti una bassa quantità di IDO.

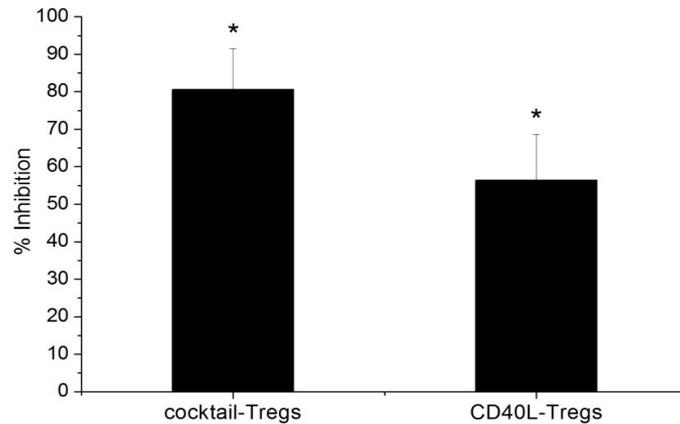


Fig. 12. capacità inibitoria dei Treg ottenuti con le DC maturate col cocktail e con il CD40L

Ci siamo inoltre chiesti se la diversa capacità regolatoria dei Treg ottenuti fosse indipendente dal numero di cellule regolatorie utilizzate. La figura 13 mostra che quando i Treg presenti sono pochi (rapporto 1:0,2 e 1:0,04 tra stimolatori e inibitori), quelli ottenuti in presenza di un'elevata quantità di IDO sono significativamente più efficaci nell'inibire la risposta T cellulare ($p < 0,01$) in confronto a quelli ottenuti in presenza di una bassa quantità di IDO. Quando invece i Treg sono in eccesso (rapporto 1:1 tra stimolatori e inibitori), essi mostrano la stessa efficienza nell'inibire la proliferazione, indipendentemente da come sono stati ottenuti.

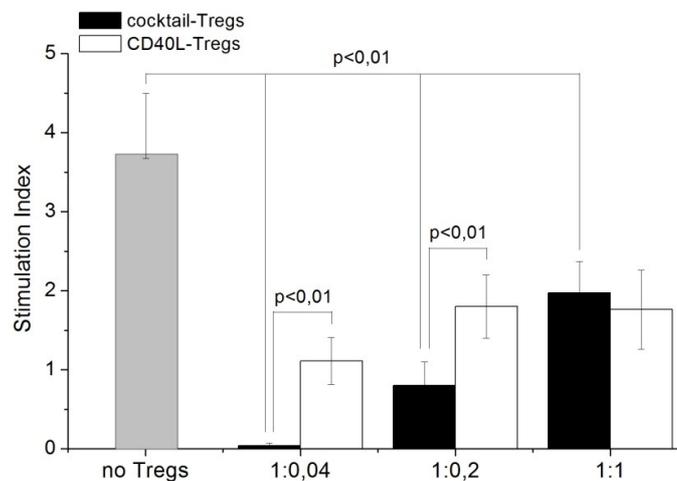


Fig. 13. inibizione della proliferazione da parte di Treg aggiunti in rapporti differenti

7. Ruolo della PGE₂ nell'up-regolazione di IDO nelle mo-DC mature

Il cocktail di citochine composto da IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE₂, utilizzato per maturare le DC, rappresenta lo stimolo maturativo di eccellenza nella pratica clinica dell'utilizzo delle DC come vaccino in immunoterapia. Di particolare importanza è la presenza della PGE₂ che, inducendo l'espressione del recettore per le chemochine CCR7, facilita la migrazione delle DC al linfonodo (Scandella et al., 2002; 2004). D'altra parte l'utilizzo della PGE₂ è potenzialmente dannoso in immunoterapia dato che è un forte induttore di IDO (Braun et al., 2005).

Date queste premesse sono stati verificati gli effetti di ognuno dei componenti del cocktail di citochine utilizzato, sia nell'indurre la maturazione delle DC, che nell'indurre l'espressione di IDO. Come si può vedere dalla tabella 12, l'assenza di TNF- α e di PGE₂ causa una minor espressione dei marcatori di maturazione e di costimolazione.

	HLA-DR	CD1a	CD40	CD80	CD86	CD83
immature	96 \pm 2,8	84,5 \pm 4,9	50 \pm 8,4	54,1 \pm 6,2	39,5 \pm 4,7	4,5 \pm 4,9
cocktail	97,5 \pm 6,7	38,2 \pm 8,5	86,3 \pm 7,4	85,9 \pm 7,2	94,3 \pm 2,1	62,1 \pm 5,9
no IL1β	98,2 \pm 3,2	44,6 \pm 2,9	78,9 \pm 5,4	76,2 \pm 2,1	79,5 \pm 4,2	56,4 \pm 4,6
no IL6	94,6 \pm 5,4	37,2 \pm 3,1	76,9 \pm 8,4	88,2 \pm 5,7	86,2 \pm 4	58,1 \pm 2,3
no TNFα	95,8 \pm 4,3	51,2 \pm 5,6	72,7 \pm 3,9	74,6 \pm 4,8	77,7 \pm 1,6	48,7 \pm 5,9
no PGE₂	96,7 \pm 3,8	55,9 \pm 6,2	69,8 \pm 8,2	70,5 \pm 5,4	48,9 \pm 7,5	38,3 \pm 6,4

Tabella 12. espressione dei principali marcatori di maturazione delle DC

Dall'analisi dell'espressione del trascritto, della proteina e della funzionalità di IDO è risultato che l'unica citochina che effettivamente è fondamentale per l'espressione e la

funzione di IDO è la PGE₂. Infatti la figura 14 mostra che, mentre in assenza di IL-1 β , IL-6 e TNF- α l'up-regolazione di IDO viene mantenuta ($p < 0,01$), in assenza di PGE₂ il livello del trascritto di IDO osservato è paragonabile a quello espresso dalle DC immature.

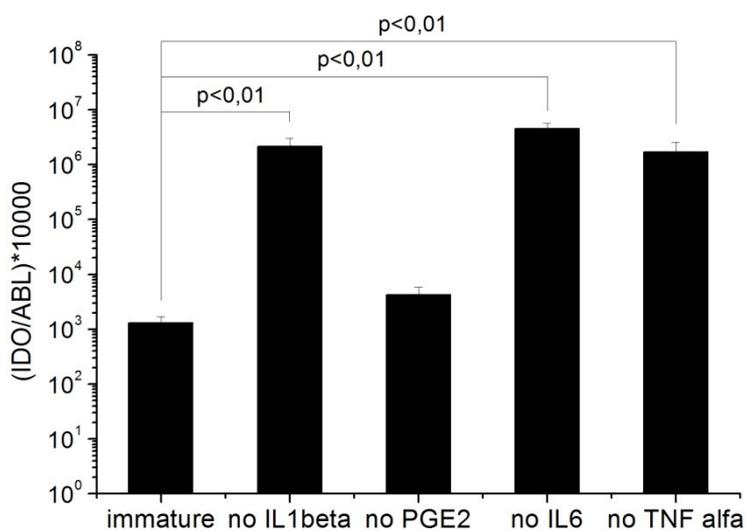


Fig. 14. espressione del trascritto di IDO in DC trattate con il cocktail di citochine modificato

In accordo con l'espressione del trascritto, l'espressione proteica di IDO resta up-regolata in assenza di IL-1 β (1), IL-6 (3) e TNF- α (4), ma viene fortemente down-regolata in assenza di PGE₂, al punto da non essere detectabile mediante Western Immunoblot (Fig. 15).

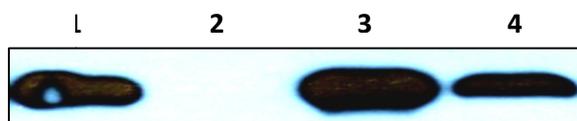


Fig. 15: espressione della proteina di IDO in assenza di IL-1 β (1), PGE₂ (2), IL-6 (3), TNF- α (4)

Anche la produzione di chinurenine segue lo stesso andamento: l'assenza di IL-1 β , IL-6 e TNF- α mantiene elevata la produzione di questi metaboliti del triptofano ($p < 0,01$), l'assenza di PGE₂ ne causa la mancata produzione (Fig. 16).

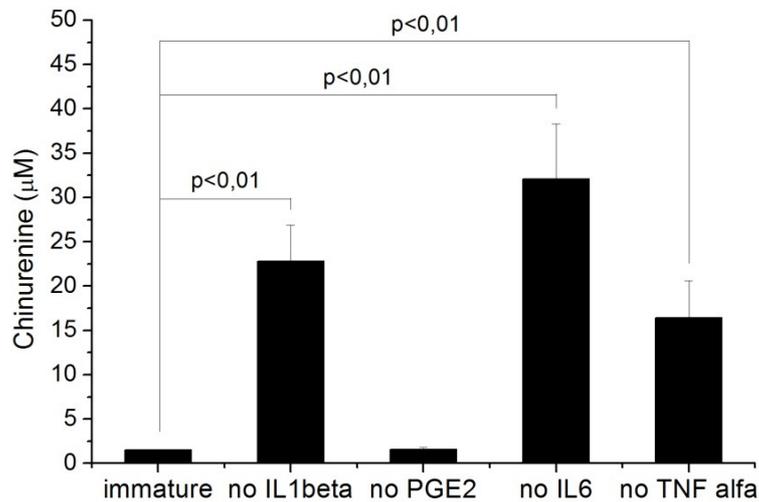


Fig. 16. produzione di chinurenine in DC trattate con il cocktail di citochine modificato

Anche i saggi funzionali *in vitro* di MLR e induzione di Treg hanno permesso di verificare che, in assenza di PGE₂ e conseguentemente in assenza di IDO, le DC non risentono più della presenza di 1-MT né nel ripristino della proliferazione sia allogenica (fig. 17a) che autologa (fig. 17b), nè nell'inibizione della generazione di una popolazione di Treg allogenica (fig. 18a) o autologa (fig. 18b).

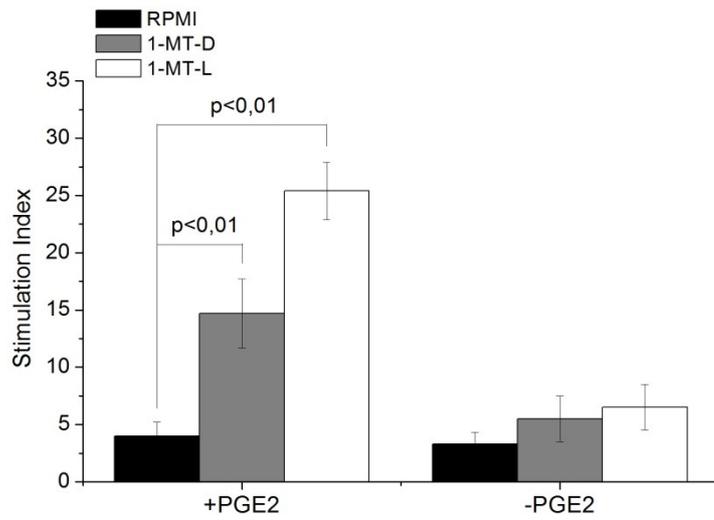


Fig. 17a. proliferazione allogenica indotta da DC maturate in presenza e assenza di PGE₂

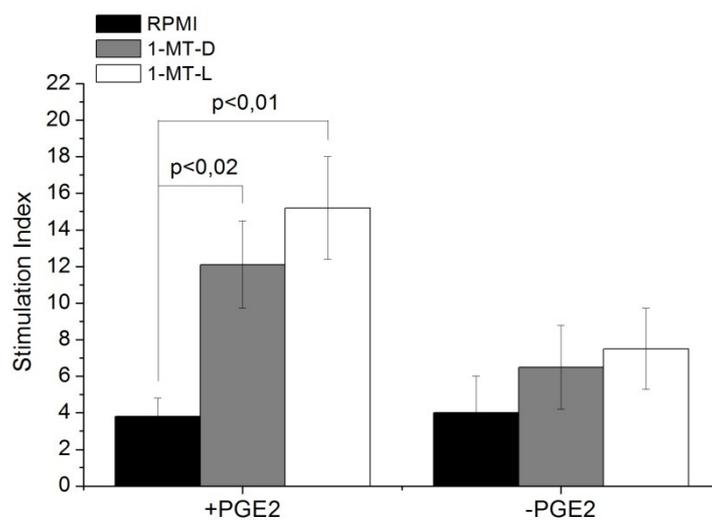


Fig. 17b. proliferazione autologa indotta da DC maturate in presenza e assenza di PGE₂

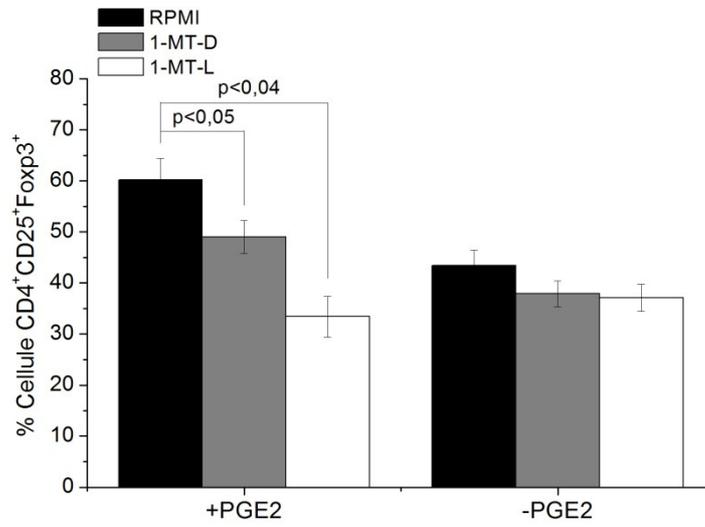


Fig. 18a. generazione di cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ allogeneiche in presenza e assenza di PGE₂

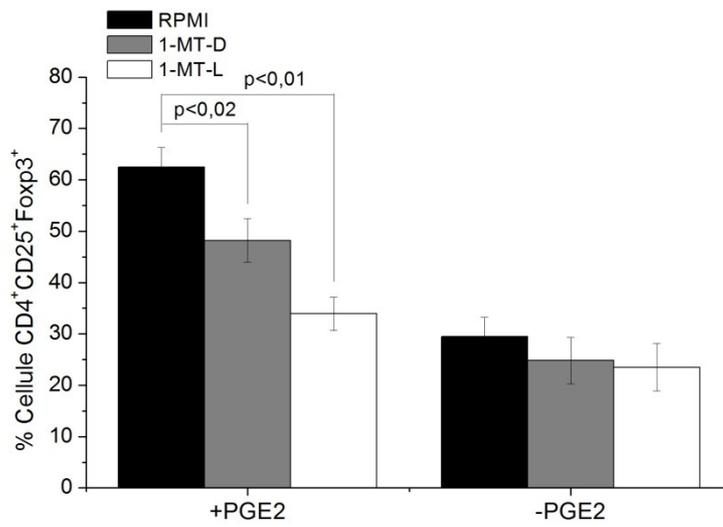


Fig. 18b. generazione di cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ autologhe in presenza e assenza di PGE₂

II. Espressione e funzione di IDO in DC derivate da CD34⁺

1. Il differenziamento da precursore CD34⁺ a DC

Utilizzando la metodica precedentemente descritta, sono state generate cellule dendritiche a partire da precursori ematopoietici CD34⁺ di soggetti sani e sono state valutate dopo 7 (7gg DC) e 14 giorni di coltura (14gg DC) e dopo maturazione con il cocktail di citochine già descritto (mDC) (sedicesimo giorno di coltura). L'avvenuto differenziamento in senso dendritico e la successiva maturazione sono stati confermati dall'analisi fenotipica (Tab. 13).

	CD14	CD1a	CD40	CD80	CD86	CD83
7gg DC	38,7 ± 8,5	8,8 ± 5,9	30,5 ± 9,7	27,6 ± 5,8	30,9 ± 4,3	9,5 ± 3,9
14gg DC	12 ± 6,7	29,3 ± 9,4	27,2 ± 7,4	31,3 ± 6,3	35,7 ± 3,7	21 ± 7,8
mDC	2,8 ± 3,2	11,6 ± 3,8	60,5 ± 8,6	62,5 ± 7,1	61,6 ± 4,8	47,8 ± 5,9

Tab. 13. espressione dei principali marcatori di DC in DC ottenute da cellule CD34⁺

Dopo aver verificato l'avvenuto differenziamento in DC dei precursori CD34⁺ e aver verificato l'avvenuta maturazione delle DC ottenute, sono state studiate l'espressione e la funzione di IDO nelle 3 popolazioni ottenute, ponendo come controllo negativo l'espressione e la funzione di IDO nei precursori CD34⁺.

Per caratterizzare al meglio IDO, nelle popolazioni ottenute sono state quindi valutate: l'espressione del trascritto di IDO (fig. 19), l'espressione della proteina di IDO (fig. 20),

la capacità di IDO di produrre chinurenine (fig. 21), la capacità di IDO di inibire la proliferazione T cellulare (fig. 22) e la capacità di IDO di generare Treg (fig. 23).

I nostri dati dimostrano che le DC ottenute dopo 7 giorni di coltura esprimono IDO sia a livello di trascritto ($p < 0,02$) che di proteina, che IDO è funzionalmente attivo ($p < 0,01$) e che è in grado di inibire la risposta T ($p < 0,01$) e di generare Treg ($p < 0,01$).

Le DC ottenute dopo 14 giorni perdono l'espressione di IDO e anche se mostrano un'aumentata sintesi di trascritto del gene in confronto ai loro precursori CD34⁺ ($p < 0,05$), la proteina non è detectabile in Western Immunoblot e sembra non essere funzionalmente attiva nei nostri saggi.

In seguito a maturazione, come avviene per le mo-DC, IDO viene fortemente up-regolato sia a livello di trascritto ($p < 0,01$) che di proteina, con conseguente capacità delle DC mature di produrre chinurenine ($p < 0,01$), inibire la risposta T ($p < 0,01$) e generare una popolazione di Treg ($p < 0,01$). In tutti gli esperimenti è stato utilizzato anche l'inibitore di IDO 1-MT nell'isoforma L, che abbiamo dimostrato essere quella più attiva nell'inibire IDO nelle mo-DC. L'uso dell'inibitore ha permesso di concludere che i fenomeni osservati sono diretta conseguenza dell'espressione di IDO.

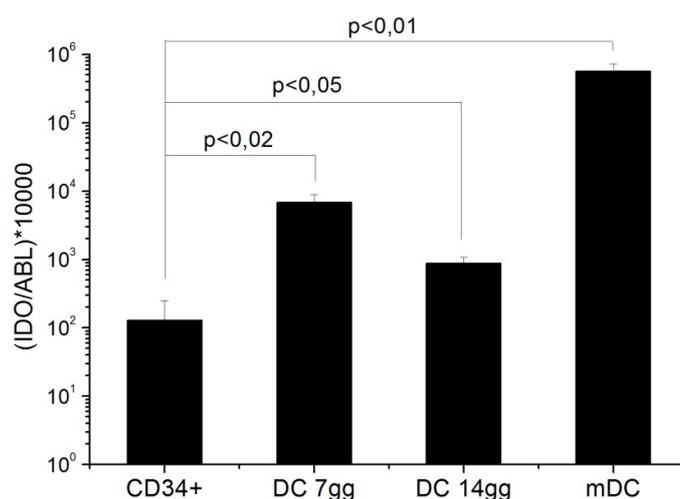


Fig. 19. espressione del trascritto di IDO durante differenziamento e maturazione di CD34⁺-DC



Fig. 20. espressione della proteina di IDO in cellule CD34⁺ (1), DC coltivate per 7gg (2), DC coltivate per 14gg (3), DC mature (4)

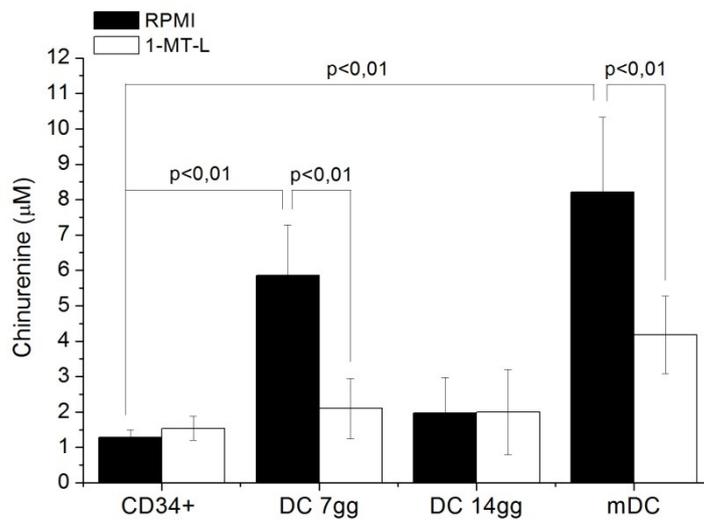


Fig. 21. produzione di chinurenine in cellule CD34⁺, DC coltivate per 7gg, DC coltivate per 14gg, mDC

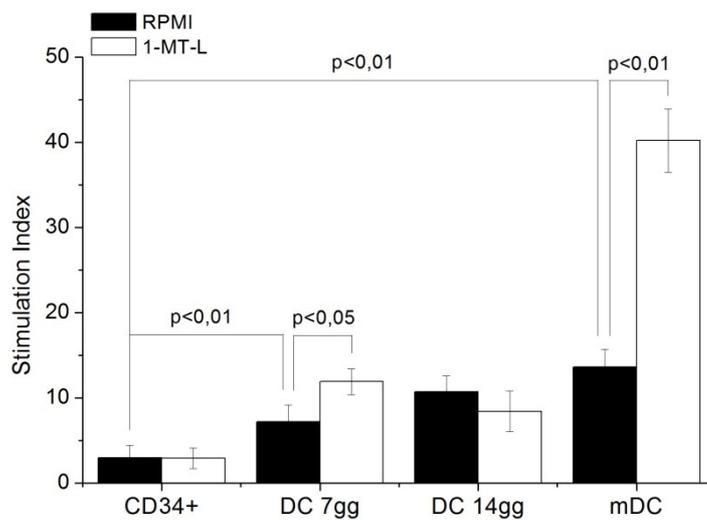


Fig. 22. ripristino della proliferazione inibita dall'espressione di IDO

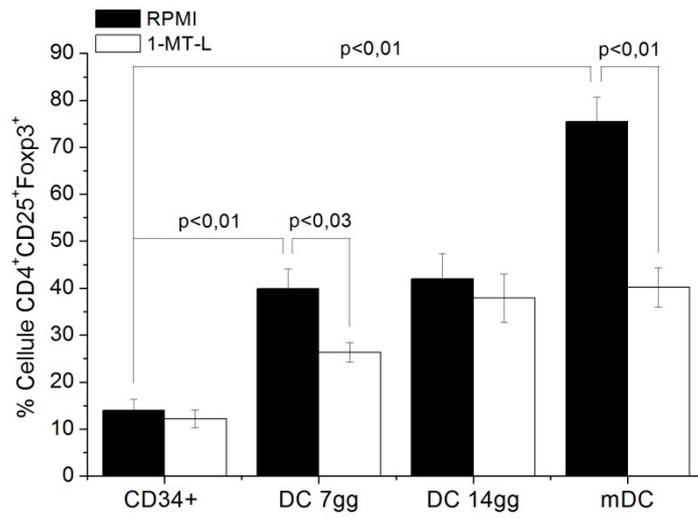


Fig. 23. generazione di cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

III. L'espressione e la funzione di IDO in AML-DC

1. Il differenziamento da blasto a AML-DC

Utilizzando la metodica precedentemente descritta, sono state generate cellule dendritiche a partire da blasti di LAM. L'avvenuto differenziamento in senso dendritico è stato confermato sia dall'osservazione del preparato citologico (Fig. 24), che dall'analisi fenotipica al citofluorimetro (Tab. 14).

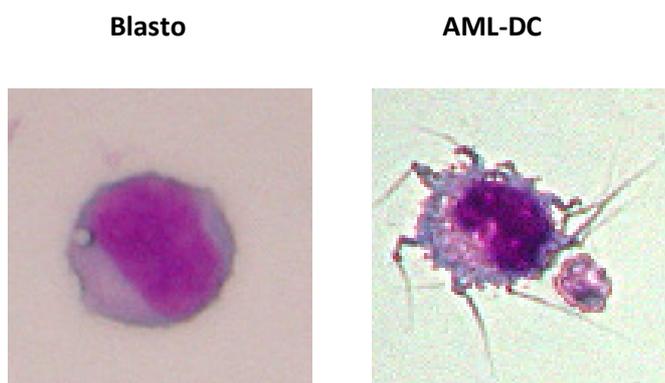


Fig. 24. preparato citologico

In particolare, le AML-DC esprimono i principali marcatori delle cellule dendritiche, quali HLA-DR, CD1a, CD40, CD80, CD86 e CD83.

	HLA-DR	CD40	CD80	CD86	CD83	CD1a
immature	84,2 ± 9,8	62,4 ± 5,7	59,1 ± 8,3	58,5 ± 6,1	20 ± 7,9	29,2 ± 6,1

Tab. 14. principali marcatori delle cellule dendritiche

Dall'analisi citogenetica molecolare delle cellule mediante FISH è stato osservato come le AML-DC ottenute mantengano le stesse alterazioni nel cariotipo dei blasti da cui derivano (Fig. 25).

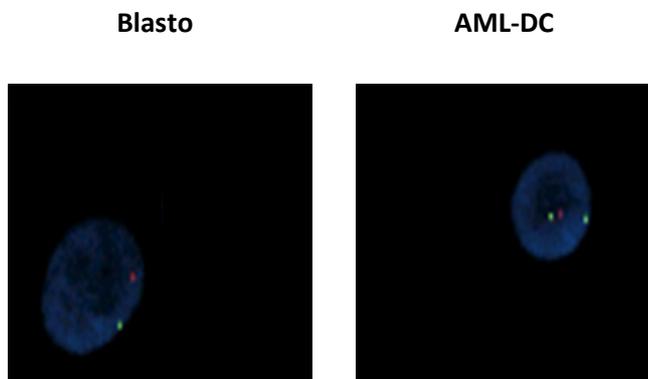


Fig.25. visualizzazione mediante FISH delle alterazioni genetiche in blasti e AML-DC

Al fine di valutare se le AML-DC ottenute possedessero la capacità stimolatoria propria delle DC ottenute da soggetti sani, sono stati effettuati saggi funzionali. Blasti leucemici e AML-DC sono stati utilizzati come stimolatori di linfociti T allogeici. I risultati riportati in figura 26 mostrano una maggior capacità stimolatoria delle AML-DC rispetto ai blasti da cui sono state generate. Quindi, tali dati portano a concludere che le AML-DC mantengono le alterazioni genetiche dei blasti da cui derivano, mostrando una più spiccata capacità stimolatoria rispetto agli stessi.

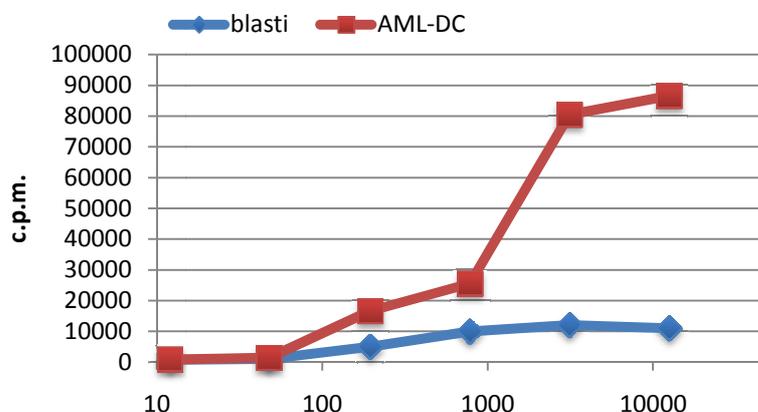


Fig. 26. capacità allostimolatoria di blasti e AML-DC

Le AML-DC così ottenute sono state successivamente maturate in presenza di GM-CSF, IL-4, IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂. L'avvenuta maturazione è stata valutata in citofluorimetria (fig. 27).

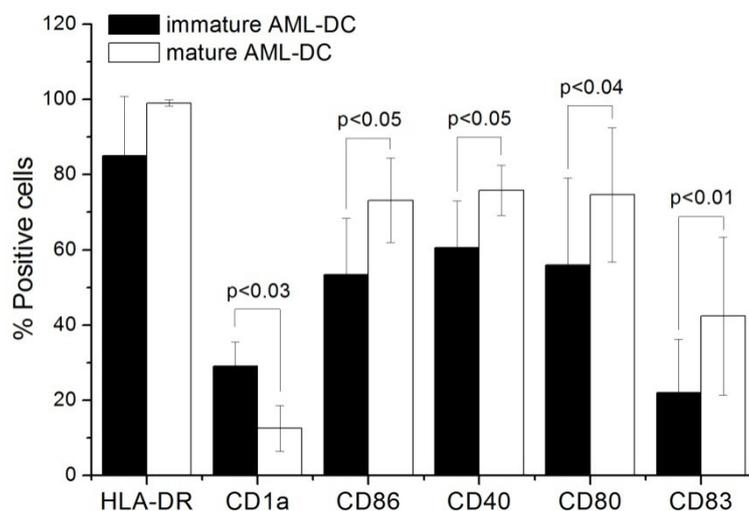


Fig. 27. espressione dei marcatori delle DC in AML-DC immature e mature

2. *Up-regolazione di IDO nelle AML-DC*

Come già dimostrato in un nostro precedente studio, esiste una frazione di blasti di LAM che esprime IDO in maniera costitutiva (Curti et al., 2007). Al fine di valutare se il differenziamento in senso dendritico e la successiva maturazione delle AML-DC ottenute alterasse tale espressione, è stata valutata l'espressione del trascritto di IDO in real-time PCR. Come mostrato dalla figura 28, durante il differenziamento in cellule dendritiche, nei blasti viene up-regolata la trascrizione di IDO ($p<0,03$). Tale aumento è ancora maggiore in seguito a maturazione delle AML-DC ($p<0,01$). Inoltre, mentre i diversi campioni di blasti presentano una marcata variabilità nell'espressione del trascritto di IDO, i diversi campioni di cellule dendritiche immature o mature presentano un'omogeneità di espressione molto maggiore.

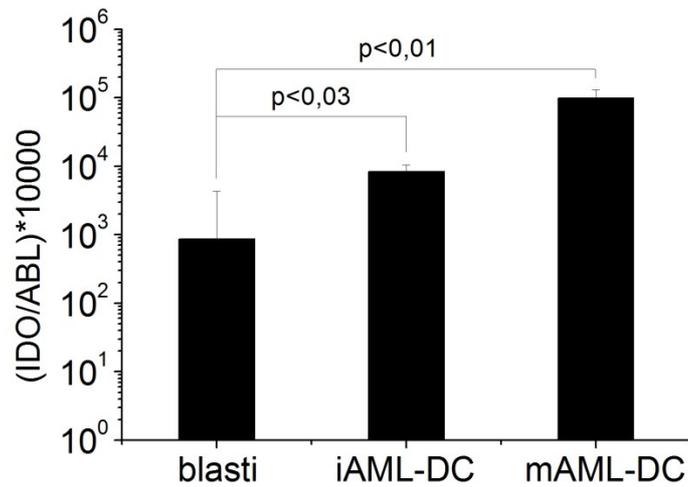


Fig. 28. espressione dell'mRNA di IDO in blasti, AML-DC immature (iAML-DC) e AML-DC mature (mAML-DC).

Dato che non tutti i blasti esprimono IDO in maniera costitutiva, ci si è chiesti se le AML-DC generate da blasti IDO⁻ e quelle generate da blasti IDO⁺ esprimessero livelli diversi di trascritto. La figura 28 dimostra che durante il differenziamento in senso dendritico l'espressione di IDO viene up-regolata indipendentemente dalla sua espressione nei blasti di partenza (t0).

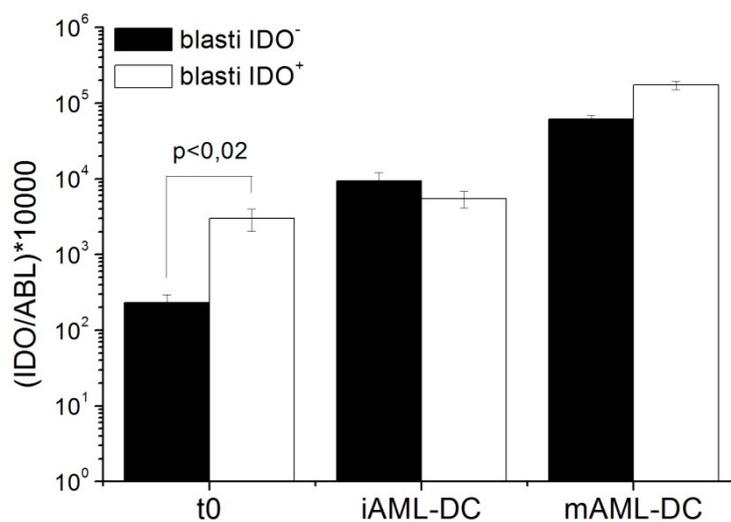


Fig. 29. espressione dell'mRNA di IDO in AML-DC differenziate da blasti IDO⁺ e IDO⁻

Durante il differenziamento in senso dendritico e la maturazione delle cellule dendritiche, all'aumento del trascritto di IDO segue l'aumento della sintesi della proteina stessa (fig. 30). Infatti i blasti che, in media, mostrano una bassa espressione del trascritto, possono non esprimere la proteina (1), le AML-DC immature esprimono sempre anche una discreta quantità di proteina (2) e le AML-DC mature esprimono un elevato livello sia di trascritto che di proteina (3).

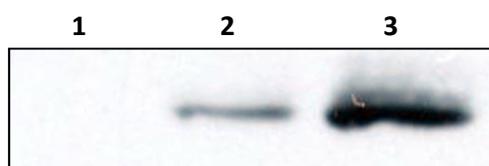


Fig. 30. espressione proteica di IDO in blasti, AML-DC immature e mature

Dimostrata l'espressione, è stato valutato se questa fosse funzionalmente attiva. L'attività di IDO è stata quantificata mediante la misurazione delle chinurenine prodotte nel surnatante di coltura di blasti, AML-DC immature e AML-DC mature in presenza di un eccesso di triptofano (500 μ M). Dalla figura 31 si può vedere come il livello di chinurenine prodotte aumenti sia durante il differenziamento ($p < 0,03$) che durante la maturazione delle AML-DC ($p < 0,01$). Inoltre, l'aggiunta dell'inibitore di IDO 1-MT-L induce una diminuzione nella produzione di chinurenine (blasti $p < 0,05$; AML-DC immature $p < 0,03$; AML-DC mature $p < 0,01$), confermando che esse sono il prodotto dell'attività enzimatica di IDO.

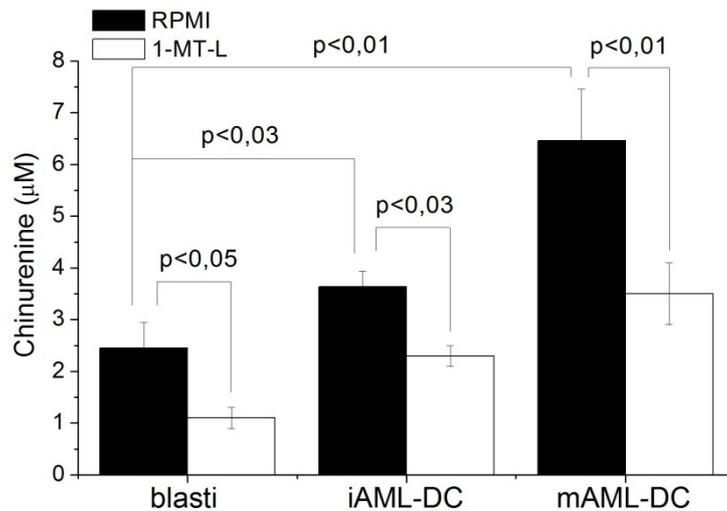


Fig.31. Determinazione della concentrazione di chinurenine in blasti e AML-DC

3. *IDO, espresso dalle AML-DC, inibisce l'alloproliferazione di linfociti T*

Allo scopo di valutare se l'espressione di IDO da parte di AML-DC conferisse loro la capacità di inibire la proliferazione T linfocitaria, blasti, AML-DC immature e mature sono state impiegate come stimolatori per linfociti T CD3⁺ allogenici in un test di MLR. Come si può osservare in figura 32, la proliferazione T cellulare risulta incrementata quando indotta dalle AML-DC immature, rispetto a quando indotta dai blasti (p<0,02), ed ancor più quando indotta dalle AML-DC mature (p<0,02). Inoltre, la proliferazione risulta incrementata quando l'inibitore specifico 1-MT-L è aggiunto alle colture in cui le cellule dendritiche, e non i blasti, agiscono da stimolatori, rispetto alla condizione in cui le cellule sono coltivate in un terreno privo di 1-MT. L'aggiunta al terreno di coltura dell'1-MT-L ha permesso di dimostrare come l'effetto inibitorio sia dovuto all'attività dell'enzima IDO che nei blasti utilizzati per il saggio non era espresso. Inoltre, il ripristino della proliferazione indotto dall'1-MT-L è risultato dose

dipendente. Il risultato conferma l'ipotesi secondo la quale l'espressione di IDO da parte di AML-DC sia in grado di inibire la proliferazione T cellulare.

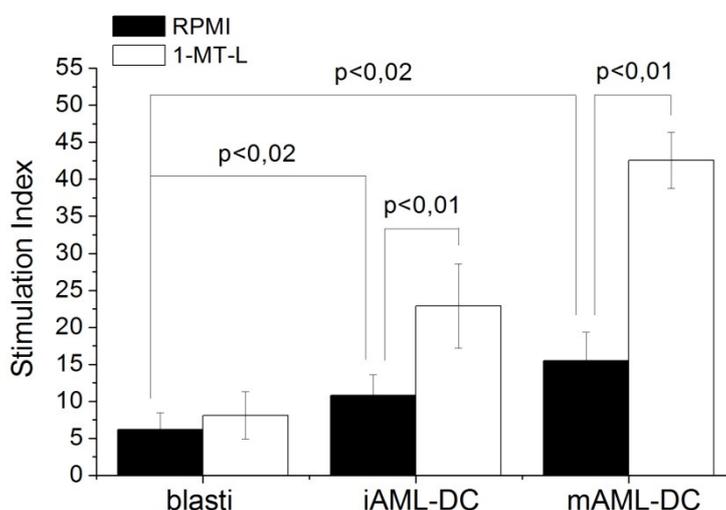


Fig. 32. ripristino della proliferazione inibita dall'espressione di IDO

4. *IDO aumenta la capacità delle AML-DC di generare T regolatori*

Nel nostro precedente studio abbiamo anche dimostrato che i blasti di LAM esprimenti IDO inducono *de novo* una popolazione di Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ funzionali. I Treg, come accennato precedentemente, giocano un ruolo chiave nell'acquisizione della tolleranza. L'incremento dell'attività dei Treg facilita la crescita tumorale, mentre la loro deplezione permette la normale risposta antitumorale da parte del sistema immunitario.

Per investigare se l'espressione di IDO nelle AML-DC conferisca loro la capacità di indurre Treg, le AML-DC mature, quelle maggiormente esprimenti IDO, sono state messe in coltura con linfociti CD3⁺ allogeici per 5-7 giorni, in assenza o in presenza di 1-MT-L. La co-coltura delle cellule T con le AML-DC aumenta la percentuale di

cellule CD4⁺CD25⁺ e la presenza dell'1-MT-L inibisce la generazione di cellule CD4⁺CD25⁺ (fig. 33).

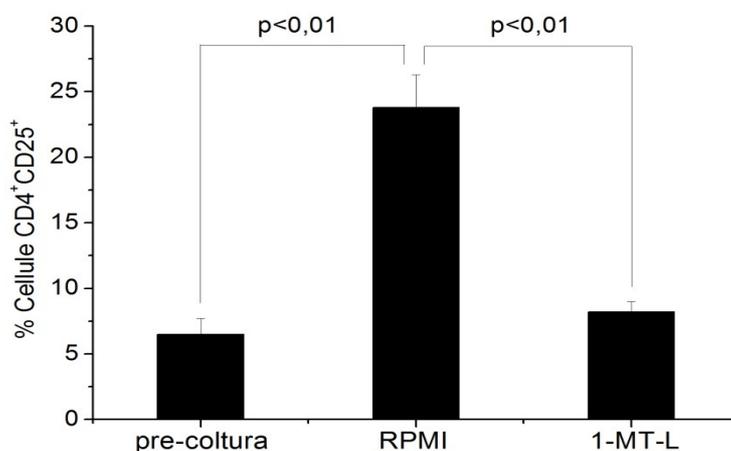


Fig. 33. generazione di cellule CD4⁺CD25⁺ in assenza e in presenza di 1-MT

Inoltre è stato valutato se le cellule CD4⁺CD25⁺ generate dalla co-coltura con AML-DC mature esprimessero Foxp3, un gene che regola lo sviluppo dei T regolatori. Le popolazioni CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁻ sono state isolate post-coltura, mediante separazione immunomagnetica; su queste è stata valutata l'espressione dell'mRNA di FOXP3 in PCR. Come mostrato dalla figura 17, a parità di RNA estratto, misurato dall'espressione del gene *house-keeping* β 2-microglobulina (Fig. 34a), soltanto il controllo positivo rappresentato da linfociti trattati con anticorpi anti-CD3 e anti CD28 (1) e la popolazione CD4⁺CD25⁺ generata (2) esprimono il trascritto per Foxp3 (Fig. 34b).

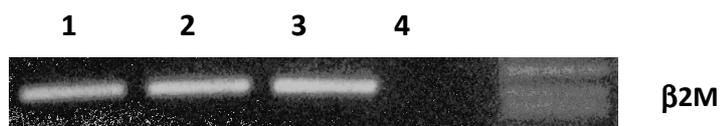


Fig. 34a. espressione di β 2-microglobulina in linfociti trattati con α CD3/ α CD28 (1), CD4⁺CD25⁺ (2) e CD4⁺CD25⁻ (3) ottenuti dalla co-coltura; controllo negativo (4).



Fig. 34b. espressione di Fcpx3 in linfociti trattati con α CD3/ α CD28 (1), nei CD4⁺CD25⁺ (2) e CD4⁺CD25⁻ (3) ottenuti dalla co-coltura; controllo negativo (4).

I dati molecolari sono stati confermati anche dall'analisi fenotipica. La figura 18 mostra, infatti, come i Treg esprimano il Fcpx3. L'aggiunta dell'1-MT-L ripristina la percentuale di cellule CD4⁺CD25⁺Fcpx3⁺ che si osserva prima della co-coltura (fig. 35).

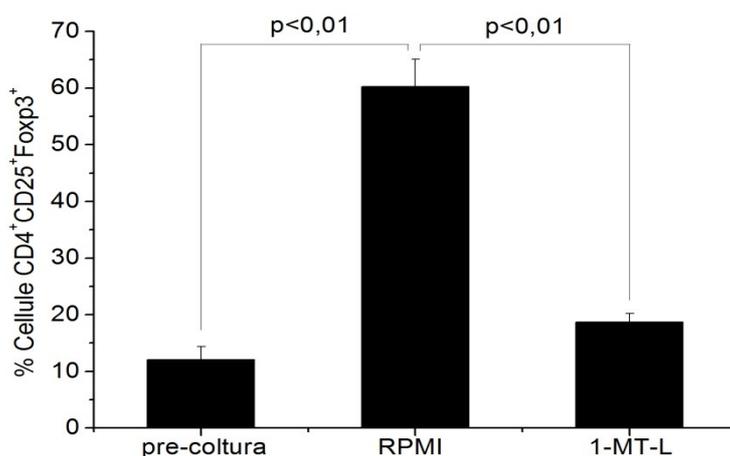


Fig. 35. generazione di cellule CD4⁺CD25⁺Fcpx3⁺

Questo risultato dimostra che IDO rappresenta il principale meccanismo di induzione di cellule CD4⁺CD25⁺Fcpx3⁺ da parte delle AML-DC mature.

Per verificare la natura regolatoria delle cellule CD4⁺CD25⁺Fcpx3⁺ generate, tali cellule sono state inserite in un saggio di MLR in cui cellule mononucleate agissero da stimolatori e cellule CD4⁺CD25⁻ da effettori. Come mostra la figura 36, la

proliferazione degli effettori viene inibita notevolmente dalla presenza delle cellule $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ($p<0,03$).

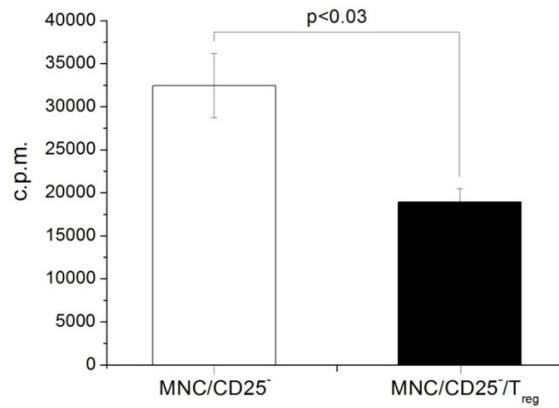


Fig. 36. inibizione della proliferazione da parte dei Treg generati

Inoltre, dato che è noto che i Treg sono in grado di inibire la maturazione di cellule dendritiche, per verificare se le cellule $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ generate possedessero anche questa capacità propria dei Treg, esse sono state aggiunte a una coltura di cellule dendritiche in maturazione (LPS, 1 μ g/ml). Come mostrato dalla figura 37, le cellule $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ generate inibiscono fortemente l'espressione dei marcatori di maturazione/attivazione delle cellule dendritiche CD40, CD80, CD86, CD83.

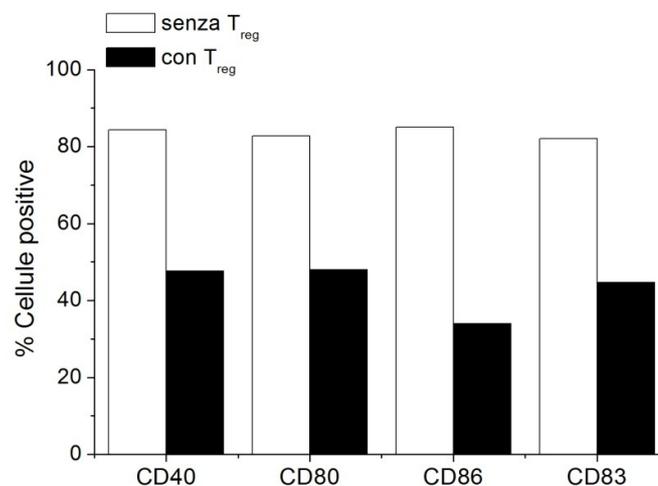


Fig. 37. inibizione della maturazione delle DC da parte dei Treg

Questi dati supportano l'ipotesi che le cellule $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ generate dalla co-coltura con AML-DC esprimenti IDO siano da considerarsi Treg, dato che dimostrano di avere attività immunosoppressiva, sia inibendo la proliferazione, che impedendo la completa maturazione di cellule dendritiche.

5. *Treg generati da AML-DC inibiscono la risposta $CD4^+$ anti-leucemica*

Per testare la capacità dei Treg indotti dalle AML-DC di inibire una risposta specifica anti-leucemica, abbiamo prima ottenuto una popolazione linfocitaria di donatori sani in grado di reagire in risposta ad antigeni leucemici.

Le cellule dendritiche di donatori sani sono state pulstate con blasti leucemici lisati, maturate e utilizzate per stimolare la risposta di linfociti $CD3^+$ autologhi. Come precedentemente descritto, i blasti sono stati colorati con il colorante rosso PKH, successivamente lisati e messi in coltura con le cellule dendritiche immature. Come mostrato in figura 38, le cellule dendritiche immature sono in grado di internalizzare e processare i blasti necrotizzati.

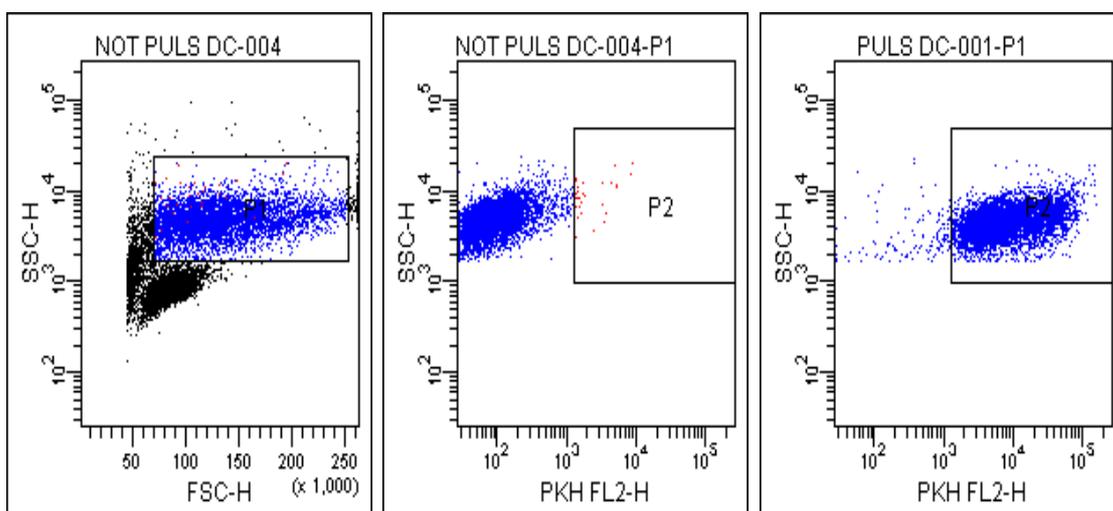


Fig. 38. capacità delle cellule dendritiche di presentare i blasti necrotizzati

Al termine della coltura (descritta nei materiali e metodi), la frazione di CD3⁺ in toto e le frazioni da essa purificate di CD4⁺ e CD8⁺ sono state testate in un'MLR secondaria in cui gli stimolatori erano costituiti da cellule dendritiche autologhe pulsate o non pulsate con i blasti necrotizzati dello stesso paziente con cui era stata fatta la stimolazione. La figura 39 mostra come solo i CD4⁺ ($p < 0,01$), e non i CD8⁺, proliferino in maniera specifica in risposta alle DC pulsate.

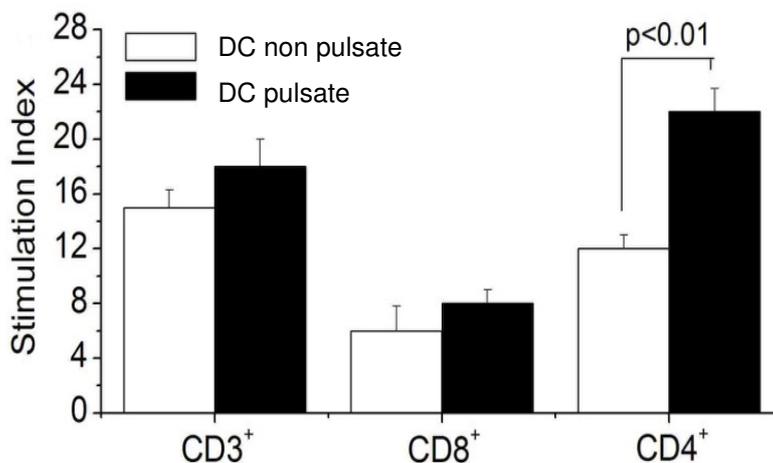


Fig. 39. proliferazione indotta dalle DC pulsate e non pulsate sui linfociti stimolati

Dopo aver verificato che la risposta veniva indotta principalmente a carico dei linfociti CD4⁺, nell'esperimento successivo, insieme a DC e CD4⁺ stimolati, sono stati aggiunti i Treg, ottenuti dalla co-coltura di CD3⁺ autologhi e AML-DC ottenute dai blasti dello stesso paziente con cui sono state pulsate le DC. Come mostrato dalla figura 40 i Treg ottenuti sono in grado di inibire la risposta CD4⁺ leucemia-specifica ($p < 0,01$).

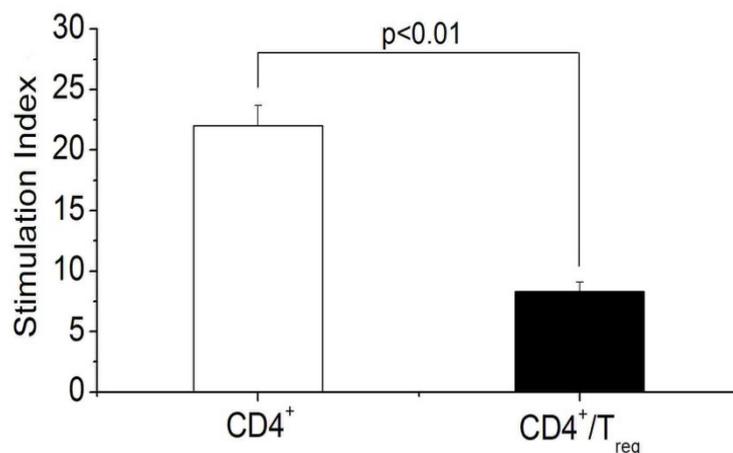


Fig. 40. inibizione da parte dei Treg della risposta CD4⁺ leucemia specifica

Questi dati dimostrano che i Treg generati dalle AML-DC sono in grado di inibire anche una risposta specifica. In particolare, in questo caso, sono in grado di inibire una risposta CD4⁺ leucemia-specifica.

6. *Treg generati da AML-DC inibiscono la risposta CD8⁺ anti-WT-1*

E' stato dimostrato che l'antigene per il tumore di Wilms (WT-1) sia over-espresso nella maggior parte dei pazienti con leucemia mieloide acuta e che quindi possa essere usato come antigene leucemico target grazie alla sua immunogenicità.

AML-DC sono state pulsate con il peptide WT-1 per rafforzarne l'espressione e sono state utilizzate per stimolare la risposta di linfociti CD3⁺ autologhi, con citochine in grado di polarizzare la risposta verso i linfociti CD8⁺. La coltura è stata condotta in assenza e in presenza di Treg autologhi ottenuti come precedentemente descritto. Al termine della coltura è stata valutata la produzione di IFN- γ da parte dei linfociti CD8⁺ e la presenza di un clone CD8⁺ specifico per WT-1. Come si può vedere dalla figura 41, le AML-DC sono in grado di indurre produzione di IFN- γ da parte dei linfociti CD8⁺ e questa produzione aumenta quando le AML-DC sono pulsate con l'antigene

leucemia-specifico WT-1. Inoltre i Treg indotti dalle AML-DC inibiscono fortemente la produzione di IFN- γ da parte dei linfociti CD8⁺.

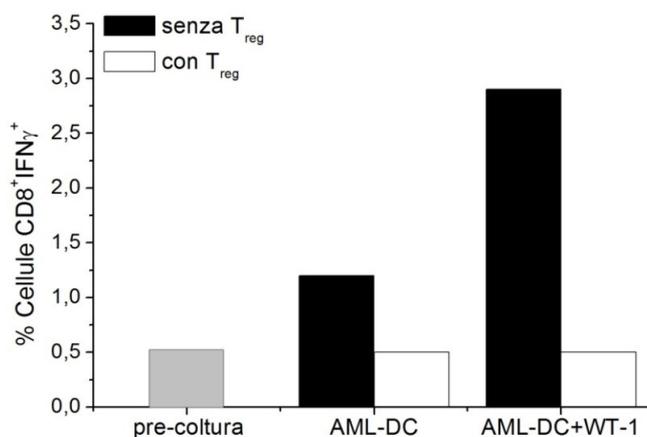


Fig. 41. secrezione di IFN- γ da parte dei CD8⁺ in assenza e in presenza di Treg

La figura 42 mostra, invece, la presenza di un clone CD8⁺ specifico per WT-1 formatosi in presenza di AML-DC e ancor più in presenza di AML-DC pulsate con WT-1. Anche in questo caso, l'aggiunta dei Treg inibisce la formazione del clone WT-1 specifico.

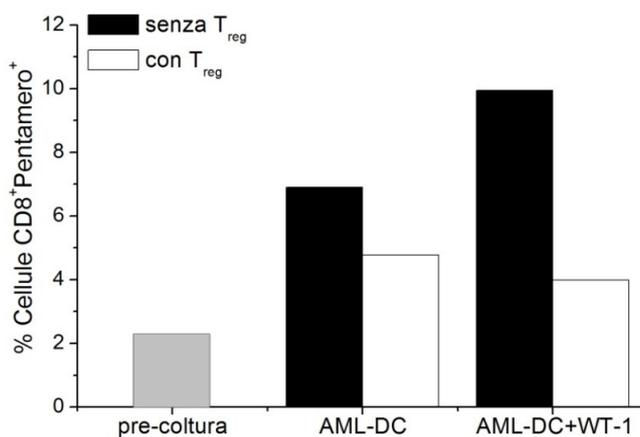


Fig. 25. induzione di un clone CD8⁺ WT-1 specifico in assenza e in presenza di Treg

Questi esperimenti permettono di concludere che i Treg indotti dalle AML-DC sono in grado di inibire anche una risposta CD8⁺ specifica verso un antigene leucemico.

Discussioni

L'enzima indoleamina 2,3-diossigenasi è stato ampiamente studiato per la sua capacità di indurre tolleranza.

Il nostro studio è servito per approfondire l'espressione e la funzione di IDO in cellule dendritiche (DC) di soggetti sani, ottenute *in vitro* da entrambi i precursori possibili (cellule CD14⁺ e cellule CD34⁺), e in cellule dendritiche di soggetti affetti da leucemia acuta mieloide (LAM). Le DC sono le cellule più efficaci nella processazione e presentazione degli antigeni (APC) e rivestono un ruolo cruciale sia nell'immunità innata, che in quella acquisita. *In vitro*, le DC possono essere generate per fini terapeutici in modo da ottenere cellule presentanti l'antigene in condizioni tollerogeniche o immunogeniche.

Il risvolto clinico di questo studio *in vitro* è rappresentato dal fatto che le cellule dendritiche, sia normali che leucemiche, possono essere usate in immunoterapia per indurre il sistema immunitario del paziente a diventare responsivo ad antigeni patogeni che non è in grado di riconoscere.

In questo studio abbiamo inizialmente studiato l'espressione di IDO in DC ottenute da monociti (mo-DC). Abbiamo confrontato l'efficacia di 4 diversi stimoli maturativi nell'indurre IDO nelle mo-DC e, di conseguenza, nell'indurre mo-DC con una possibile componente marcatamente tollerogenica. Abbiamo osservato, in linea con dati già pubblicati, che le mo-DC immature esprimono un basso livello di IDO, che non è in nessun modo funzionale. Durante la maturazione delle mo-DC, d'altra parte, IDO viene sempre up-regolato, sia a livello trascrizionale che proteico, e si osserva la funzionalità della proteina. È interessante notare che uno stimolo fisiologico come il CD40L che rappresenta l'interazione tra linfocita T e DC, in assenza di ulteriori stimoli, induce una modesta maturazione nelle mo-DC, come anche una modesta

espressione di IDO. Gli altri stimoli usati (LPS, LPS combinato con IFN- γ e cocktail di citochine), che rappresentano la presenza di batteri o di un quadro infiammatorio complesso, maturano fortemente le DC ed inducono anche una maggior espressione di IDO. Questo avviene, probabilmente, perché IDO possa funzionare da meccanismo in grado di controbilanciare la forte attivazione delle DC. Nonostante il livello di maturazione delle DC indotto da LPS, LPS combinato con IFN- γ e cocktail di citochine sia paragonabile tra loro, l'LPS da solo non è in grado di indurre una massiccia espressione di IDO, confermando il dato che, anche se IDO viene indotto dalla maturazione, il suo livello di espressione non correla con lo stato maturativo delle DC. Dato che le mo-DC usate negli studi clinici vengono maturate con il cocktail di citochine utilizzato in questo studio (IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE₂), abbiamo utilizzato questo stimolo come forte induttore di IDO, confrontandolo con il CD40L nel ruolo di debole induttore di IDO. Il nostro studio ha permesso di concludere che, indipendentemente dall'intensità di espressione di IDO, la sua presenza è condizione sufficiente a creare DC con una minor capacità di attivare una risposta T sia allogenica che autologa antigene-specifica. D'altra parte dall'intensità di espressione di IDO dipendono la quantità di Treg generati e la loro potenza nell'inibire risposte T cellulari.

L'uso dell'inibitore di IDO, 1-metil-triptofano (1-MT), in entrambe le sue isoforme, revertando gli effetti osservati, ha permesso di stabilire che essi fossero causati proprio dall'espressione di IDO.

Poiché recentemente è stata scoperta l'esistenza di un altro gene simile a quello che codifica per IDO, chiamato IDO2, ed è stata avanzata la teoria che l'isoforma D dell'inibitore 1-MT sia più specifica nell'inibire IDO2 che non nell'inibire IDO, abbiamo voluto valutare anche l'espressione di IDO2 e abbiamo concluso che gli

stimoli maturativi utilizzati nel nostro studio modulano IDO2 nello stesso modo in cui modulano IDO. Poiché nei nostri esperimenti l'isoforma D ha un effetto meno evidente nell'inibire IDO2, rispetto all'isoforma L nell'inibire IDO, possiamo avanzare l'ipotesi che le mo-DC mature esprimano sia IDO che IDO2, ma che IDO sia più attivo o più efficace di IDO2 nello svolgere la funzione di immunosoppressore.

I nostri dati, quindi, mostrano che, nonostante le DC maturate con il cocktail di citochine siano molto mature e quindi molto abili nella presentazione degli antigeni, l'elevata espressione di IDO (e di IDO2) ne limita il potenziale immunogenico.

Recentemente è stato proposto che sia la PGE₂ presente nel cocktail di citochine ad indurre l'espressione di IDO. La PGE₂, infatti, ha una duplice e opposta attività: da un lato causa un'alta espressione dei marcatori di maturazione, costimolazione e migrazione ai linfonodi, dall'altro può promuovere il rilascio di citochine regolatorie ed attirare i Treg. Per verificare se la PGE₂, tra le citochine presenti nel cocktail, fosse quella cruciale per l'espressione di IDO, abbiamo valutato IDO trattando le DC con le 4 combinazioni derivanti dall'utilizzo delle citochine componenti il cocktail meno una. Anche i nostri dati confermano che in assenza di PGE₂ non si osservano né l'espressione, né la funzionalità di IDO.

Nell'insieme, questi dati dimostrano che l'espressione di IDO in mo-DC mature può limitarne l'efficacia in immunoterapia sia inibendo la proliferazione di cloni di linfociti T reattivi contro un determinato antigene, che inducendo Treg in grado di inibire ulteriormente la risposta T cellulare. In particolare, la maturazione con il cocktail di citochine maggiormente utilizzato in ambito clinico, se da un lato genera DC con elevate capacità costimolatorie e in grado di migrare al linfonodo per iniziare la risposta T cellulare, dall'altro induce nelle DC un'elevata espressione di IDO che

riduce la loro immunogenicità e genera una numerosa popolazione di Treg molto potenti.

Ci siamo quindi chiesti se il cocktail di citochine avesse lo stesso effetto anche sulle DC di soggetti sani ottenuti da un'altra sorgente, quella midollare. Differenziando le cellule CD34⁺ abbiamo osservato un'iniziale up-regolazione di IDO in corrispondenza della fase della coltura in cui le cellule assumono un fenotipo monocito-macrofagico, seguita da una marcata down-regolazione in corrispondenza della fase della coltura in cui le cellule diventano simil mo-DC immature. In seguito a maturazione con il cocktail di citochine anche le DC differenziate da precursori CD34⁺ mostrano un'elevata espressione di IDO, che si è dimostrato efficace sia nella produzione di chinurenine, che nell'inibizione della risposta T e nella generazione di Treg.

Nell'insieme, i dati sulle DC ottenute da soggetti sani, permettono di concludere che indipendentemente dalla sorgente cellulare di partenza, le DC mature esprimono un'elevata quantità IDO funzionalmente attiva.

Dato che le cellule dendritiche leucemiche (AML-DC) rappresentano un altro esempio di DC, dopo aver dimostrato che una quota di blasti di pazienti di LAM esprimesse costitutivamente il gene e la proteina di IDO a livelli significativi, abbiamo voluto indagare se l'espressione di IDO venisse modificata in seguito al differenziamento dei blasti in senso dendritico.

In questo lavoro abbiamo dimostrato che, durante la generazione di AML-DC, l'espressione di IDO viene notevolmente up-regolata indipendentemente dal fatto che i blasti di partenza fossero IDO⁺ o IDO⁻. Come nelle DC ottenute da cellule di soggetti sani, anche nelle AML-DC l'espressione di IDO aumenta quando sono immature, ma

aumenta ancora più intensamente in seguito alla maturazione. Nelle AML-DC, a differenza delle mo-DC e delle DC al quattordicesimo giorno derivate da cellule CD34⁺, il livello di espressione di IDO è già funzionale anche quando sono immature.

D'altra parte, le cellule tumorali, anche quelle leucemiche, sono note per la capacità di creare un ambiente che inibisca l'azione del sistema immunitario. Tra i differenti meccanismi che le cellule tumorali usano per evadere la risposta immunitaria, si sta scoprendo che l'induzione di Treg rappresenta uno dei meccanismi più efficaci. In molti tumori solidi, infatti, si è osservato un aumentato numero di Treg rispetto ai soggetti sani ed è stato dimostrato che tali Treg sono in grado di inibire le risposte anti-tumorali. Tra le malattie ematologiche, un aumento nel numero di Treg è stato dimostrato nel linfoma di Hodgkin e non- Hodgkin, nella leucemia linfatica cronica (LLC), nella leucemia mieloide acuta (LAM), nel mieloma multiplo e nelle sindromi mielodisplastiche ad alto rischio. In particolare, il nostro precedente studio aveva dimostrato che i blasti di LAM esprimenti IDO erano in grado di indurre Treg *de novo*. In questo studio abbiamo dimostrato che le AML-DC sono in grado, tramite l'espressione di IDO, di espandere la popolazione di linfociti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, che agisce come una popolazione di Treg.

Le nostre osservazioni sulle AML-DC supportano l'ipotesi che IDO sia da considerare un meccanismo tollerogenico generale mediante il quale, sia le cellule normali che quelle maligne, sopprimano la risposta T cellulare.

Dato che le AML-DC sono utilizzabili in immunoterapia, i nostri risultati hanno delle implicazioni cliniche. L'inizio della risposta T cellulare dipende strettamente dallo sbilanciamento dell'equilibrio che esiste tra i diversi segnali, attivatori e inibitori, che sono presenti al momento dell'incontro tra la cellula T e la DC. Data l'elevata espressione di molecole di maturazione e costimolatorie, le AML-DC mature sono più

efficaci nel presentare gli antigeni rispetto ai blasti a alle AML-DC immature da cui derivano. In linea con questi risultati le AML-DC mature utilizzate nel nostro studio sono in grado di indurre cellule CD4⁺ ad iniziare una risposta generica anti-leucemica e cellule CD8⁺ ad iniziare una risposta anti-leucemica specifica contro l'antigene WT-1. D'altra parte, i nostri risultati dimostrano che le AML-DC mature, esprimendo IDO, inducono anche una potente popolazione di CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg, capace sia di sopprimere una risposta T allogeica, sia di inibire entrambe le risposte autologhe CD4⁺ e CD8⁺ nel riconoscimento di antigeni leucemici, incluso WT-1. Inoltre i nostri dati mostrano che i Treg ottenuti dalla co-coltura con AML-DC mature, sopprimono la maturazione di DC normali, che in seguito alla minor espressione di molecole di maturazione e di costimolazione saranno meno efficienti nel presentare gli antigeni. Nell'insieme, questi dati dimostrano che i Treg indotti dalle AML-DC esprimenti IDO possono giocare il loro ruolo nell'indurre tolleranza a differenti livelli durante l'induzione di una risposta anti-leucemica. In particolare, i Treg possono inibire il priming delle cellule T ostacolandone la proliferazione e quindi l'espansione clonale in risposta ad antigeni leucemici. Inoltre, i Treg possono inibire la capacità di *cross-priming* delle cellule T inibendo la completa maturazione di DC normali, e di conseguenza alterando la loro capacità di cellule presentanti l'antigene. Infatti, sebbene le AML-DC abbiano il potenziale per indurre popolazioni di cellule T specifiche per un ampio repertorio di antigeni leucemici, data la loro capacità di presentare numerosi antigeni leucemici e quindi di espandere cloni diversi, l'utilizzo di AML-DC come parte di un vaccino cellulare anti-leucemico deve tenere in considerazione la concomitante espansione di una popolazione soppressiva di Treg in grado di ridurre l'efficacia del vaccino.

In sintesi il nostro studio dimostra che: 1) DC mature di soggetti sani o leucemici esprimonoIDO sia a livello trascrizionale che proteico e che la funzione enzimatica diIDO è attiva; 2) DC esprimentiIDO hanno una minor capacità stimolatoria si di linfociti T allogenici che autologhi; 3) DC esprimentiIDO sono in grado di generare una popolazione di cellule $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ a funzione regolatoria; 4) Treg, indotti daIDO, sono in grado di sopprimere risposte allogeniche e autologhe antigene-specifiche e di inibire la presentazione antigenica di altre DC sopprimendone la maturazione. I nostri dati hanno implicazioni anche in clinica dato che dimostrano chiaramente la presenza di un nuovo meccanismo di tolleranza/*tumor-escape* di cui bisogna tenere conto nelle tecniche di immunoterapia che utilizzano DC mature come vaccino.

Bibliografia

1. Burnet. *The concept of immunological surveillance*. Prog. Exp. Tumor Res. 1970;13:1-27.
2. Dunn et al. *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nature Immunol. 2002;3:991-99.
3. Abbas, Lichtman, Pober. *Immunologia Cellulare e Molecolare*, 4^o ed., 218-241, Piccin, (2000).
4. Jiang, Chess. *An integrated view of suppressor T cells subsets in immunoregulation*. J. Clin. Invest. 2004;114:1198-1208.
5. O'Garra, Vieira. *Regulatory T cells and mechanisms of immune system control*. Nat. Med. 2004;10:801-805.
6. Sakaguchi et al. *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune disease*. J. Immunol. 1995;155:1151-1164.
7. Munn et al. *Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes*. J. Clin. Invest. 2004;114:280-290.
8. Pfefferkorn. *Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984;81(3):908-12.
9. Perkins, Stone. *Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1983;226(2):551-7.
10. Yasui et al. *Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986;83(17):6622-6.
11. Mellor, Munn. *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nature Rev. Immunol. 2004;4:762-773.
12. Sugimoto et al. *Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006;103(8):2611-6.
13. Thomas SR, Stocker R. *Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway*. Redox Rep. 1999;4(5):199-220.
14. Mellor AL, Munn DH. *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nature Rev. Immunol. 2004;4:762-773.
15. Thomas SR, Salahifar H, Mashima R, Hunt NH, Richardson DR, Stocker R. *Antioxidants inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase in IFN-gamma-activated human macrophages: posttranslational regulation by pyrrolidine dithiocarbamate*. J Immunol. 2001;166(10):6332-40.
16. Samelson-Jones BJ, Yeh SR. *Interactions between nitric oxide and indoleamine 2,3-dioxygenase*. Biochemistry. 2006;45(28):8527-38.
17. Murray MF. *The human indoleamine 2,3-dioxygenase gene and related human genes*. Curr. Drug. Metab. 2007;8(3):197-200.
18. Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin, CJ, Astelbauer F, Miu J et al. *Characterization of an indole amine 2,3-dioxygenase-like protein found in human and mice*. Gene. 2007;396(1):203-211.
19. Metz R, Duhadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, Prendergast GC. *Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan*. Cancer Res. 2007;67(15):7082-7087.
20. Yuasa HJ, Takubo M, Takahashi A, Hasegawa T, Noma H, Suzuki T. *Evolution of vertebrate indoleamine 2,3-dioxygenase*. J. Mol. Evol. 2007;65(6): 705-714.
21. Takikawa O. *Biochemical and medical aspect of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism*. Bioch. and Bioph. Res. Comm. 2005;338(1):12-19.
22. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. *Tolerance, DCs and tryptophan: Much ado about IDO*. Trend Immunology. 2003;24(5):242-248.
23. Thomas SR, Mohr D, Stocker R. *Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes*. J Biol. Chem. 1994;269(20):14457-64.
24. Hara T, Ogasawara N, Akimoto H, Takikawa O, Hiramatsu R, Kawabe T et al. *High-affinity uptake of kynurenine and nitric oxide-mediated inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in bone marrow-derived myeloid dendritic cells*. Immunol. Lett. 2008;116(1):95-102.

25. Mahidhara RS, Hoffman RA, Huang S, Wolf-Johnston A, Vodovotz Y, Simmons RL, Billiar TR. *Nitric oxide-mediated inhibition of caspase-dependent T lymphocyte proliferation*. J Leukoc. Biol. 2003;74(3):403-11.
26. van der Veen RC, Dietlin TA, Karapetian A, Holland SM, Hofman FM. *Extra-cellular superoxide promotes T cell expansion through inactivation of nitric oxide*. J Neuroimmunol. 2004;153(1-2):183-9.
27. Hönig A, Rieger L, Kapp M, Sütterlin M, Dietl J, Kämmerer U. *Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance*. J Reprod. Immunol. 2004;61(2):79-86.
28. Musso T, Gusella GL, Brooks A, Longo DL, Varesio L. *Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes*. Blood. 1994;83(5):1408-11.
29. Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB et al. *Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase*. Science. 2002;297(5588):1867-70.
30. Jürgens B, Hainz U, Fuchs D, Felzmann T, Heitger A. *Interferon-gamma-triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells*. Blood. 2009;114(15):3235-43.
31. Terness P, Chuang JJ, Bauer T, Jiga L, Opelz G. *Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: too much ado about IDO?* Blood. 2005;105(6):2480-6.
32. Miwa N, Hayakawa S, Miyazaki S, Myojo S, Sasaki Y, Sakai M, Takikawa O, Saito S. *IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion*. Mol Hum Reprod. 2005;11(12):865-70.
33. Björck P, Kincade PW. *CD19+ pro-B cells can give rise to dendritic cells in vitro*. J Immunol. 1998;161(11):5795-9.
34. Kurz K, Gluhcheva Y, Zvetkova E, Konwalinka G, Fuchs D. *Interferon-gamma-mediated pathways are induced in human CD34(+) haematopoietic stem cells*. Immunobiology. 2009.
35. Jones BJ, Brooke G, Atkinson K, McTaggart SJ. *Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells*. Placenta. 2007;28(11-12):1174-81.
36. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N et al. *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Nat Med. 2003;9:1269-1274.
37. Ball HJ, Yuasa HJ, Austin CJ, Weiser S, Hunt NH. *Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway*. Int. J Biochem. Cell Biol. 2009;41(3):467-71.
38. Hansen AM, Driussi C, Turner V, Takikawa O, Hunt NH. *Tissue distribution of indoleamine 2,3-dioxygenase in normal and malaria-infected tissue*. Redox Rep. 2000;5(2-3):112-5.
39. Taylor MW, Feng GS. *Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism*. 1991;5(11)2516-22.
40. MacKenzie CR, Heseler K, Müller A, Däubener W. *Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines*. Curr. Drug. Metab. 2007;8(3):237-44.
41. Bodaghi B, Goureau O, Zipeto D, Laurent L, Virelizier JL, Michelson S. *Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells*. J Immunol. 1999;162(2):957-64.
42. Adams O, Besken K, Oberdörfer C, MacKenzie CR, Rüssing D, Däubener W. *Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Microbes Infect. 2004;6(9):806-12.
43. Schmidt SK, Müller A, Heseler K, Woite C, Spekker K, MacKenzie CR, Däubener W. *Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase*. Eur. J Immunol. 2009;39(10):2755-64.
44. Sedlmayr P. *Indoleamine 2,3-dioxygenase in materno-fetal interaction*. Curr. Drug. Metab. 2007;8(3):205-8.
45. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. *Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism*. Science. 1998;281(5380):1191-3.

46. Mellor AL, Sivakumar J, Chandler P, Smith K, Molina H, Mao D, Munn DH. *Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy.* Nat Immunol. 2001;2(1):64-8.
47. Kudo Y, Boyd CA, Spyropoulou I, Redman CW, Takikawa O, Katsuki T et al. *Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta.* J Reprod. Immunol. 2004;61(2):87-98.
48. Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K et al. *Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase.* J Clin. Invest. 2004;114(2):270-9.
49. Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. *Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy.* Nat. Med. 2005;11(3):312-9. Epub 2005 Feb 13.
50. Seo SK, Choi JH, Kim YH, Kang WJ, Park HY, Suh JH et al. *4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis.* Nat. Med. 2004;10(10):1088-94.
51. Gurtner GJ, Newberry RD, Schloemann SR, McDonald KG, Stenson WF. *Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice.* Gastroenterology. 2003;125(6):1762-73.
52. Kwidzinski E, Bunse J, Aktas O, Richter D, Mutlu L, Zipp F et al. *Indoleamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation.* FASEB J. 2005;19(10):1347-9.
53. Xu H, Oriss TB, Fei M, Henry AC, Melgert BN, Chen L et al. *Indoleamine 2,3-dioxygenase in lung dendritic cells promotes Th2 responses and allergic inflammation.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2008;105(18):6690-5.
54. Chen X, Liu L, Yang P, Wu C, Jin H, Xing L et al. *Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is involved in promoting the development of anterior chamber-associated immune deviation.* Immunol. Lett. 2006;107(2):140-7.
55. Alexander AM, Crawford M, Bertera S, Rudert WA, Takikawa O, Robbins PD, Trucco M. *Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes.* Diabetes. 2002;51(2):356-65.
56. Beutelspacher SC, Pillai R, Watson MP, Tan PH, Tsang J, McClure MO et al. *Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression.* Eur. J Immunol. 2006;36(3):690-700.
57. Meloni F, Giuliano S, Solari N, Draghi P, Miserere S, Bardoni AM et al. *Indoleamine 2,3-dioxygenase in lung allograft tolerance.* J Heart Lung Transplant. 2009;28(11):1185-92.
58. Ueno A, Cho S, Cheng L, Wang J, Hou S, Nakano H et al. *Transient upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by human chorionic gonadotropin downregulates autoimmune diabetes.* Diabetes. 2007;56(6):1686-93.
59. Shortman K, Liu YJ. *Mouse and human dendritic cell subtypes.* Nat Rev Immunol. 2002;2(3):151-61.
60. Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M et al. *Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses.* Cancer Res. 2007;67(2):792-801.
61. Dai W, Gupta SL. *Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. Upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha.* J Biol. Chem. 1990;265(32):19871-7.
62. Mellor AL, Baban B, Chandler PR, Manlapat A, Kahler DJ, Munn DH. *Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling.* J Immunol. 2005;175(9):5601-5.
63. Nam KO, Kang WJ, Kwon BS, Kim SJ, Lee HW. *The therapeutic potential of 4-1BB (CD137) in cancer.* Curr. Cancer Drug Targets. 2005;5(5):357-63.
64. Choi BK, Asai T, Vinay DS, Kim YH, Kwon BS. *4-1BB-mediated amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis is caused by indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanisms.* Cytokine. 2006;34(5-6):233-42.
65. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. *Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism.* J Exp Med. 1999;189(9):1363-72.

66. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A et al. *T cell apoptosis by tryptophan catabolism*. Cell Death Differ. 2002;9(10):1069-77.
67. Choi YH, Chang N, Fletcher PJ, Anderson GH. *Dietary protein content affects the profiles of extracellular amino acids in the medial preoptic area of freely moving rats*. Life Sci. 2000;66(12):1105-18.
68. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M et al. *An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress*. Mol. Cell. 2003;11(3):619-33.
69. Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. *Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites*. J Exp. Med. 2002;196(4):447-57.
70. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H et al. *Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase*. J Clin. Invest. 2007;117(9):2570-82.
71. Schmidt A, Beck T, Koller A, Kunz J, Hall MN. *The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease*. EMBO J. 1998;17(23):6924-31.
72. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. *GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase*. Immunity. 2005;22(5):633-42.
73. Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, Takakura S, Saito M, Aoki Y et al. *Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells*. Clin Cancer Res. 2005;11(16):6030-9.
74. Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kidokoro K et al. *Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer*. Br J Cancer. 2006;95(11):1555-61.
75. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C et al. *Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells*. Clin Cancer Res. 2006;12(4):1144-51.
76. Weinlich G, Murr C, Richardsen L, Winkler C, Fuchs D. *Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients*. Dermatology. 2007;214(1):8-14.
77. Röhrig UF, Awad L, Grosdidier A, Larrieu P, Stroobant V, Colau D et al. *Rational design of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors*. J Med. Chem. 2010;53(3):1172-89.
78. Liu X, Newton RC, Friedman SM, Scherle PA. *Indoleamine 2,3-dioxygenase, an emerging target for anti-cancer therapy*. Curr. Cancer Drug Targets. 2009;9(8):938-52.
79. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. *T cell apoptosis by kynurenines*. Adv. Exp. Med. Biol. 2003;527:183-90.
80. McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DN. *Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule*. Eur. J Immunol. 1995;25(12):3525.
81. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ et al. *Immunobiology of dendritic cells*. Annu. Rev. Immunol. 2000;18:767-811.
82. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation*. J Exp. Med. 1996;184(2):747-52.
83. Engering AJ, Cella M, Fluitsma DM, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A, Pieters J. *Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells*. Adv. Exp. Med. Biol. 1997;417:183-7.
84. Jonuleit H, Knop J, Enk AH. *Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells*. Arch. Dermatol. Res. 1996;289(1):1-8.
85. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Angeli V. *Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances*. Springer Semin. Immunopathol. 2005;26(3):273-87.
86. Williams KA, Hart DN, Fabre JW, Morris PJ. *Distribution and quantitation of HLA-ABC and DR (Ia) antigens on human kidney and other tissues*. Transplantation. 1980;29(4):274-79.

87. Prickett TC, McKenzie JL, Hart DN. *Adhesion molecules on human tonsil dendritic cells.* Transplantation. 1992;53(2):483-90.
88. Inaba K, Steinman RM, Van Voorhis WC, Muramatsu S. *Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1983;80(19):6041-5.
89. Prickett TC, McKenzie JL, Hart DN. *Characterization of interstitial dendritic cells in human liver.* Transplantation. 1988;46(5):754-61.
90. Hart DN, Prickett TC, McKenzie JL, Martin ML, Beard ME. *Characterization of interstitial dendritic cells in human tissues.* Transplant Proc. 1989;21(1 Pt 1):401-3.
91. Egnér W, McKenzie JL, Smith SM, Beard ME, Hart DN. *Human bone marrow contains potent stimulatory cells for the allogeneic MLR with the phenotype of dendritic cells.* Adv. Exp. Med. Biol. 1993;329:263-8.
92. Osugi Y, Vuckovic S, Hart DN. *Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes.* Blood. 2002;100(8):2858-66.
93. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. *Characterization of human blood dendritic cell subsets.* Blood. 2002;100(13):4512-20.
94. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J. *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood.* J Immunol. 2000;165(11):6037-46.
95. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund-Johansen F. *Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1997;94(23):12551-6.
96. Blomberg S, Eloranta ML, Magnusson M, Alm GV, Rönnblom L. *Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum. 2003;48(9):2524-32.
97. López JA, Bioley G, Turtle CJ, Pinzón-Charry A, Ho CS, Vuckovic S et al. *Single step enrichment of blood dendritic cells by positive immunoselection.* J Immunol Methods. 2003;274(1-2):47-61.
98. Vuckovic S, Kim M, Khalil D, Turtle CJ, Crosbie GV, Williams N et al. *Granulocyte-colony stimulating factor increases CD123hi blood dendritic cells with altered CD62L and CCR7 expression.* Blood. 2003;101(6):2314-7.
99. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Durand I, Banchereau J. *Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells.* Blood. 1996;87(6):2376-85.
100. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M et al. *Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules.* Immunity. 2000;12(1):71-81.
101. Ochoa MT, Loncaric A, Krutzik SR, Becker TC, Modlin RL. *"Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages.* J Invest Dermatol. 2008;128(9):2225-31.
102. Del Rio ML, Bernhardt G, Rodriguez-Barbosa JI, Förster R. *Development and functional specialization of CD103(+) dendritic cells.* Immunol Rev. 2010;234(1):268-81.
103. Ziegler-Heitbrock L. *The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation.* J Leukoc Biol. 2007;81(3):584-92.
104. Geissmann F, Jung S, Littman DR. *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.* Immunity. 2003;19(1):71-82.
105. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schäkel K. *The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting.* J Exp. Med. 2002;196(4):517-27.
106. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM. *Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature.* Immunology. 1994;82(3):487-93.
107. Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. *Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin.* Immunol. Rev. 2010;234(1):120-41.
108. Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N. *Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization.* J Clin. Invest. 1993;92(6):2587-96.

109. Summers KL, Hock BD, McKenzie JL, Hart DN. *Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils*. Am. J Pathol. 2001;159(1):285-95.
110. Res PC, Couwenberg F, Vyth-Dreese FA, Spits H. *Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus*. Blood. 1999;94(8):2647-57.
111. McIlroy D, Troadec C, Grassi F, Samri A, Barrou B, Autran B et al. *Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors*. Blood. 2001;97(11):3470-7.
112. Ho CS, Munster D, Pyke CM, Hart DN, López JA. *Spontaneous generation and survival of blood dendritic cells in mononuclear cell culture without exogenous cytokines*. Blood. 2002;99(8):2897-904.
113. Sallusto F, Lanzavecchia A. *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp. Med. 1994;179(4):1109-18.
114. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. *Tolerogenic dendritic cells*. Annu. Rev. Immunol. 2003;21:685-711.
115. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F et al. *Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4*. Nat. Immunol. 2002;3(3):237-43.
116. Grohmann U, Bianchi R, Belladonna ML, Silla S, Fallarino F, Fioretti MC, Puccetti P. *IFN-gamma inhibits presentation of a tumor/self peptide by CD8 alpha- dendritic cells via potentiation of the CD8 alpha+ subset*. J Immunol. 2000;165(3):1357-63.
117. Martín P, Del Hoyo GM, Anjuère F, Arias CF, Vargas HH, Fernández-L A et al. *Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential*. Blood. 2002;100(2):383-90.
118. von Bergwelt-Baildon MS, Popov A, Saric T, Chemnitz J, Classen S, Stoffel MS et al. *CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition*. Blood. 2006;108(1):228-37.
119. Luft T, Jefford M, Luetjens P, Toy T, Hochrein H, Masterman KA et al. *Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets*. Blood. 2002;100(4):1362-72.
120. Ayehunie S, Snell M, Child M, Klausner M. *A plasmacytoid dendritic cell (CD123+/CD11c-) based assay system to predict contact allergenicity of chemicals*. Toxicology. 2009;264(1-2):1-9.
121. Jürgens B, Hainz U, Fuchs D, Felzmann T, Heitger A. *Interferon-gamma-triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells*. Blood. 2009;114(15):3235-43.
122. Vacca C, Fallarino F, Perruccio K, Orabona C, Bianchi R, Gizzi S et al. *CD40 ligation prevents onset of tolerogenic properties in human dendritic cells treated with CTLA-4-Ig*. Microbes Infect. 2005;7(7-8):1040-8.
123. Angelini G, Gardella S, Ardy M, Ciriolo MR, Filomeni G, Di Trapani G et al. *Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2002;99(3):1491-6.
124. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. *Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells*. J Immunol. 2004;172(7):4100-10.
125. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA. *Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation*. Immunol. 2000;164(7):3596-9.
126. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaver SA. *Suppressor T cells*. J Immunol. 1972;108(3):586-90.
127. Fehérvari Z, Sakaguchi S. *CD4+ Tregs and immune control*. J Clin. Invest. 2004;114(9):1209-17.
128. Nishikawa H, Kato T, Tawara I, Takemitsu T, Saito K, Wang L et al. *Accelerated chemically induced tumor development mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells in wild-type hosts*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2005;102(26):9253-7.
129. Sakaguchi S. *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance*. Cell. 2000;101(5):455-8.

130. Read S, Malmström V, Powrie F. *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation.* J Exp. Med. 2000;192(2):295-302.
131. Banham AH. *Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells.* Trends Immunol. 2006;27(12):541-4.
132. Thornton AM, Shevach EM. *Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific.* J Immunol. 2000;164(1):183-90.
133. Thornton AM, Shevach EM. *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production.* J Exp. Med. 1998;188(2):287-96.
134. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R et al. *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.* Nat. Immunol. 2003;4(12):1206-12.
135. Mellor AL, Chandler P, Baban B, Hansen AM, Marshall B, Pihkala J et al. *Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase.* Int. Immunol. 2004;16(10):1391-401.
136. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. *Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells.* J Immunol. 2004;172(7):4100-10.
137. Hryniewicz A, Boasso A, Edghill-Smith Y, Vaccari M, Fuchs D et al. *CTLA-4 blockade decreases TGF-beta, IDO, and viral RNA expression in tissues of SIVmac251-infected macaques.* Blood. 2006;108(12):3834-42.
138. Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, Aluigi M, Isidori A, Ferri E et al. *Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells.* Blood. 2007;109(7):2871-7.
139. Tura S, Baccarani M. *Corso di malattie del sangue e degli organi ematopoietici*, 123-141, Società Editrice Esculapio, 2003.
140. Burke F, Knowles RG, East N, Balkwill FR. *The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the anti-tumour activity of human interferon-gamma in vivo.* Int. J Cancer. 1995;60(1):115-22.
141. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N et al. *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase.* Nat. Med. 2003;9(10):1269-74.
142. Munn DH. *Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation.* Curr. Opin. Immunol. 2006;18(2):220-5.
143. Curti A, Aluigi M, Pandolfi S, Ferri E, Isidori A, Salvestrini V et al. *Acute myeloid leukemia cells constitutively express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase.* Leukemia. 2007;21(2):353-5.
144. Sachs L. *The differentiation of myeloid leukaemia cells: new possibilities for therapy.* Br J Haematol. 1978;40(4):509-17.
145. Choudhury A, Toubert A, Sutaria S, Charron D, Champlin RE, Claxton DF. *Human leukemia-derived dendritic cells: ex-vivo development of specific antileukemic cytotoxicity.* Crit. Rev. Immunol. 1998;18(1-2):121-31.
146. Harrison BD, Adams JA, Briggs M, Brereton ML, Yin JA. *Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia.* Blood. 2001;97(9):2764-71.
147. Woiciechowsky A, Regn S, Kolb HJ, Roskrow M. *Leukemic dendritic cells generated in the presence of FLT3 ligand have the capacity to stimulate an autologous leukemia-specific cytotoxic T cell response from patients with acute myeloid leukemia.* Leukemia. 2001;15(2):246-55.
148. Cignetti A, Vallario A, Roato I, Circosta P, Allione B, Casorzo L et al. *Leukemia-derived immature dendritic cells differentiate into functionally competent mature dendritic cells that efficiently stimulate T cell responses.* J Immunol. 2004;173(4):2855-65.
149. Westers TM, Stam AG, Scheper RJ, Regelink JC, Nieuwint AW, Schuurhuis GJ et al. *Rapid generation of antigen-presenting cells from leukaemic blasts in acute myeloid leukaemia.* Cancer Immunol. Immunother. 2003;52(1):17-27.
150. Choudhury BA, Liang JC, Thomas EK, Flores-Romo L, Xie QS, Agusala K et al. *Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses.* Blood. 1999;93(3):780-6.

151. Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, Zandotti C, Brière F et al. *Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment.* Blood. 2001;98(13):3750-6.
152. Steinbrink K, Mahnke K, Grabbe S, Enk AH, Jonuleit H. *Myeloid dendritic cell: From sentinel of immunity to key player of peripheral tolerance?* Hum. Immunol. 2009;70(5):289-93.
153. Van Driessche A, Van de Velde AL, Nijs G, Braeckman T, Stein B, De Vries JM et al. *Clinical-grade manufacturing of autologous mature mRNA-electroporated dendritic cells and safety testing in acute myeloid leukemia patients in a phase I dose-escalation clinical trial.* Cytotherapy. 2009;11(5):653-68.
154. Mackensen A, Dräger R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. *Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells.* Cancer Immunol. Immunother. 2000;49(3):152-6.