

**DOTTORATO DI RICERCA  
IN  
SCIENZE BIOMEDICHE**

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D3 MALATTIE DEL SANGUE

Settore Scientifico disciplinare: MED/15

**MORTE IMMUNOGENICA INDOTTA DA  
CHEMIOTERAPIA E MECCANISMI DI TOLLERANZA  
IMMUNOLOGICA NELLA LEUCEMIA ACUTA  
MIELOIDE**

**Presentata da: Dott.ssa MARIANGELA STEFANIA LECCISO**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. LUCIO COCCO**

**Relatore**

**Dott.ssa LUCIA CATANI**

**Correlatore**

**Dott. ANTONIO CURTI**



<i>Sommario</i> .....	4
<i>Introduzione</i> .....	7
1. La Leucemia Acuta Mieloide .....	8
1.1 Terapia.....	13
2. La risposta immunitaria nella leucemia acuta mieloide .....	16
3. La morte cellulare.....	19
4. La morte cellulare immunogenica.....	22
4.1. Calreticulina .....	25
4.2. High Mobility Group Box 1 .....	29
4.3. Heat Shock Proteins .....	31
4.4. ATP .....	33
5. Meccanismi di tolleranza immunologica nella leucemia acuta mieloide .....	37
5.1. Asse PD-1/PD-L1 .....	37
5.2. CTLA-4 .....	38
5.3. CD200 .....	40
5.4. LAG-3 .....	41
5.5. Indoleammina 2,3-Diossigenasi e linfociti T regolatori.....	42
<i>Materiali e metodi</i> .....	45
1. Cellule .....	46
2. Isolamento di cellule mononucleate da sangue periferico e midollare.....	46
3. Separazione immunomagnetica.....	47
4. Colture cellulari.....	48
4.1. Linee cellulari.....	48
4.2. Cellule primarie.....	49
5. Trattamento con farmaci chemioterapici.....	49
6. Valutazione apoptosi .....	50
7. Valutazione dell'espressione di CRT, HSP70 e HSP90 in citofluorimetria .....	50
8. Immunofluorescenza .....	51
9. Quantificazione di ATP nei surnatanti .....	53
10. Saggio di valutazione della produzione di Interferon- $\gamma$ .....	55
11. Quantificazione dei linfociti T regolatori.....	56
12. Caratterizzazione immunofenotipica di linfociti T CD8 <sup>+</sup> da pazienti LAM dopo chemioterapia .....	57

13. Catch e sorting dei linfociti T CD8 <sup>+</sup> leucemia-specifici da pazienti LAM dopo chemioterapia .....	58
14. Caratterizzazione funzionale dei linfociti T CD8 <sup>+</sup> isolati da pazienti LAM dopo chemioterapia .....	59
14.1. Produzione di citochine e molecole citolitiche.....	59
14.2. Test di citotossicità.....	60
15. Generazione di monocyte-derived DCs a partire da monociti di donatori sani.....	60
16. Maturazione di mo-DCs .....	61
17. Western Blot.....	62
18. Induzione di linfociti T regolatori .....	63
18.1. Silenziamento di IDO1 mediante RNA interference.....	64
19. Induzione della produzione di IFN- $\gamma$ .....	65
20. Valutazione dell'attività immunosoppressiva dei Tregs .....	66
21. Modello murino.....	66
21.1. Colture cellulari e trasfezione.....	66
21.2. Misura dell'ATP extracellulare in vitro mediante PmeLUC.....	67
21.3. Generazione del tumore, imaging in vivo e somministrazione del farmaco .....	67
21.4. Valutazione delle citochine plasmatiche .....	68
21.5. Analisi dell'infiltrato tumorale in immunohistochimica e in citofluorimetria .....	69
22. Analisi statistica dei dati .....	70
<i>Risultati</i> .....	71
1. Daunorubicina e citarabina arabinoside inducono apoptosi nella linea cellulare HL-60 .....	72
2. Traslocazione di calreticulina sulla membrana citoplasmatica in seguito al trattamento con daunorubicina.....	73
3. Rilascio di HMGB1 dal nucleo al citoplasma in corso di morte immunogenica .....	77
4. Accumulo delle Heat Shock Protein sulla membrana plasmatica delle cellule morenti prima di essere rilasciate nel mezzo extracellulare.....	78
5. L'ATP è attivamente secreto dalle cellule apoptotiche dopo trattamento con daunorubicina .	79
6. Le antracicline inducono morte cellulare immunogenica nei blasti primari di LAM .....	82
7. La chemioterapia con antracicline induce una risposta immunitaria specifica contro il tumore .....	85
8. La chemioterapia induce nei pazienti l'espansione di una popolazione di linfociti T regolatori .....	90
9. I linfociti T CD8 <sup>+</sup> attivati e indotti dalla chemioterapia sono effettori citotossici leucemia-specifici e mostrano un fenotipo "exhausted" .....	91

10. La morte immunogenica delle cellule tumorali migliora l'uptake antigenico e la maturazione delle cellule dendritiche .....	95
11. Le cellule dendritiche mature caricate con antigeni tumorali mediante morte immunogenica esprimono elevati livelli dell'enzima ad azione immunoregolatoria IDO1 .....	97
12. L'ATP induce la maturazione delle cellule dendritiche e l'espressione di IDO1 tramite il recettore purinergico P2Y11 .....	99
13. Cellule dendritiche esprimenti IDO1 sono in grado di espandere la popolazione dei linfociti Tregs	100
14. Le cellule leucemiche trattate con daunorubicina e caricate in cellule dendritiche attraverso la morte immunogenica inducono cellule T leucemia-specifiche .....	103
15. La daunorubicina fa aumentare <i>in vivo</i> il rilascio di ATP extracellulare e di citochine antitumorali e determina una modificazione dell'infiltrato tumorale di cellule del sistema immunitario .....	107
Bibliografia .....	121

## *Sommario*

Recentemente, sia nei tumori solidi che nelle neoplasie ematologiche, è stato dimostrato che alcuni agenti chemioterapici, come le antracicline, sono altamente immunogenici e, attraverso un efficiente *pulsing* di antigeni tumore-associati nelle cellule dendritiche, in grado di attivare la risposta immunitaria antitumorale T-cellulare. Tale processo, caratterizzato da modificazioni intracellulari e pericellulari delle cellule tumorali morenti, quali la traslocazione sulla superficie cellulare della calreticulina e delle heat shock protein 70 e 90, il rilascio del fattore pro-infiammatorio HMGB1 e la secrezione di ATP, è noto come *morte cellulare immunogenica*. Oltre alla morte immunogenica, però, la chemioterapia può generare, all'interno microambiente tumorale, fenomeni di tipo infiammatorio e portare all'attivazione di pathway immunosoppressivi. In particolare, le cellule dendritiche possono acquisire caratteristiche tollerogeniche e alterare la funzionalità delle cellule T specifiche per il tumore. Scopo del presente studio è stato quello di caratterizzare la *morte cellulare immunogenica* indotta da antracicline nella leucemia acuta mieloide e valutare l'induzione di pathway inibitori, come l'espressione dell'enzima indoleamina-2,3-diossigenasi, o IDO1.

*In vitro*, *ex vivo* ed *in vivo* abbiamo dimostrato che il trattamento con antracicline induce *morte cellulare immunogenica* anche nella leucemia acuta mieloide. Nei pazienti sottoposti a chemioterapia è stata riscontrata una risposta anti-leucemica caratterizzata dalla produzione di IFN- $\gamma$  nei linfociti CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, quest'ultimi capaci di uccidere i blasti autologhi pur mostrando un fenotipo exhausted, ma anche l'espansione di una popolazione di linfociti T regolatori. La *morte cellulare immunogenica*, infatti, determina la maturazione delle cellule dendritiche che attivano efficacemente linfociti T antigene-specifici ma, allo stesso tempo, esprimendo elevati livelli di IDO1, inducono una

popolazione di linfociti T regolatori che limitano la risposta anti-leucemica. Questi risultati sono stati confermati nel modello murino leucemico dove, a seguito della chemioterapia, l'infiltrato tumorale è risultato arricchito di cellule dendritiche, mature ed esprimenti IDO1, ma anche di linfociti T caratterizzati da fenotipo exhausted.

I nostri dati confermano che la morte immunogenica indotta da chemioterapia è attiva nella leucemia acuta mieloide e determina una risposta immunologica nei confronti della malattia ma anche l'induzione di pathway inibitori nelle cellule dendritiche che possono alterare tale risposta. La combinazione della chemioterapia con inibitori di IDO1 rappresenta un approccio interessante per potenziare l'effetto immunogenico della chemioterapia e la risposta immunitaria anti-leucemica.

## ***Introduzione***

## 1. La Leucemia Acuta Mieloide

La leucemia acuta mieloide (LAM) è una neoplasia ematologica che trae origine dalla trasformazione neoplastica di una cellula staminale già differenziata per la mielopoiesi. È caratterizzata da un'abnorme presenza di cellule progenitrici della linea mieloide, dette blasti, che avendo perso la capacità di differenziare e di proliferare in maniera controllata, si accumulano, a differenti stadi maturativi, nel midollo osseo, dove interferiscono con il normale processo di ematopoiesi, ma anche nel sangue periferico e successivamente in altri organi o tessuti. L'insufficiente produzione di cellule ematiche mature (eritrociti, granulociti neutrofilo e piastrine) è responsabile dell'instaurarsi di manifestazioni cliniche tipiche dell'anemia (astenia, dispnea), della neutropenia (infezioni) e della trombocitopenia (emorragie diffuse). Con minore frequenza è possibile riscontrare epatomegalia, splenomegalia, linfadenomegalia, lesioni cutanee ed altre lesioni dovute all'infiltrazione blastica di organi e tessuti non ematopoietici. [1] È possibile distinguere tre diverse categorie di LAM:

- LAM PRIMARIE o DE NOVO: nelle quali non è nota la precedente esposizione ambientale, occupazionale o terapeutica ad agenti leucemogeni.
- LAM SECONDARIE: causate dall'esposizione ad agenti leucemogeni, tra cui chemioterapici e/o radioterapici impiegati per il trattamento di neoplasie maligne preesistenti.
- LAM SECONDARIE AD UNA PRECEDENTE SINDROME MIELODISPLASTICA.

La LAM è la più comune forma di leucemia acuta nell'adulto. L'età mediana dei soggetti colpiti è compresa tra i 65 e i 70 anni e può coinvolgere entrambi i sessi, seppur con una

lieve prevalenza per il sesso maschile. La distribuzione e la frequenza delle LAM varia considerevolmente nelle diverse aree geografiche, raggiungendo globalmente un'incidenza annuale di circa tre casi ogni 100.000 individui. [2]

Lo sviluppo della malattia è attribuibile sia a fattori genetici che a fattori ambientali, quali l'esposizione a radiazioni ionizzanti e l'esposizione occupazionale ad agenti chimici, come benzene e ossido di etilene. In una piccola percentuale di casi può insorgere in pazienti oncologici trattati con farmaci chemioterapici ad azione citotossica appartenenti alla classe degli alchilanti, tra cui la ciclofosfamida, il melfalan, l'etoposide. [3]

Il primo sistema di classificazione impiegato nella diagnosi delle LAM risale al 1976 ed è noto come sistema FAB (French – American - British). Questo suddivide le LAM in 8 diversi citotipi (M0-M7) sulla base delle caratteristiche morfologiche, della linea differenziativa e della capacità di maturazione delle cellule leucemiche:

- M0: INDIFFERENZIATA;
- M1: MIELOBLASTICA SENZA MATURAZIONE;
- M2: MIELOBLASTICA CON MATURAZIONE;
- M3: PROMIELOCITICA (LAP);
- M4: MIELOMONOCITICA;
- M5: MONOCITICA;
- M6: ERITROLEUCEMIA;
- M7: MEGACARIOBLASTICA.

Nel corso degli anni la scoperta dell'associazione di molti casi di leucemia ad anomalie genetiche ricorrenti, ha fornito le basi per la compilazione di un sistema di classificazione che riconoscesse non solo l'eterogeneità morfologica ma anche la diversità genetica e

clinica delle LAM. Al 2008 risale l'ultima classificazione proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. [4]

➤ **LEUCEMIE ACUTE MIELOIDI CON ANOMALIE GENETICHE**

**RICORRENTI**

- LAM con t(8;21)(q22;q22);(RUNX1-RUNX1T1)
- LAM con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22);(CBFB-MYH11)
- LAP con t(15;17)(q22;q12);(PML-RAR $\alpha$ )
- LAM con t(9;11)(p22;q23);(MLLT3-MLL)
- LAM con t(6;9)(p23;q34);(DEK-NUP214)
- LAM con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2);(RPN1-EVI1)
- LAM (megacarioblastica) con t(1;22)(p13;q13);(RBM15-MKL1)
- LAM con NPM1 mutato
- LAM con CEBPA mutate

➤ **LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE CON ALTERAZIONI CORRELATE A MDS/LAM CON DISPLASIA MULTILINEARE**

➤ **LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE E SINDROMI MIELODISPLASTICHE CORRELATE A TERAPIA**

- Agenti alchilanti, radiazioni
- Inibitori della topoisomerasi II
- Altri

➤ **LEUCEMIE ACUTE MIELOIDI NON ALTRIMENTI SPECIFICATE**

- LAM minimamente differenziata
- LAM senza maturazione
- LAM con maturazione
- Leucemia acuta mielomonocitica
- Leucemia acuta monoblastica/monocitica
- Leucemia acuta eritroide (eritroide/mieloide o eritroleucemia pura)
- Leucemia acuta megacarioblastica
- Leucemia acuta basofila
- Panmielosi acuta con mielofibrosi

➤ **PROLIFERAZIONE MIELOIDE CORRELATA ALLA SINDROME DI DOWN**

➤ **NEOPLASIA A CELLULE DENDRITICHE PLASMACITOIDI**

La caratterizzazione delle LAM viene effettuata alla diagnosi mediante analisi morfologica, citogenetica, immunofenotipica e molecolare delle cellule presenti nel sangue midollare.

I mieloblasti sono cellule di grandi dimensioni, caratterizzate da un basso rapporto nucleo/citoplasma e spesso dalla presenza di più nucleoli. L'analisi immunofenotipica, attraverso la valutazione di marcatori di superficie, permette di identificare il subset di cellule trasformate. Circa nell'80% dei pazienti affetti da LAM è possibile riscontrare una popolazione blastica esprime la molecola di superficie CD33. [5]

Le anomalie citogenetiche vengono individuate mediante lo studio del cariotipo sulle metafasi dei blasti. Le alterazioni riscontrate possono essere singole oppure presenti in

associazione, con una frequenza alla diagnosi che varia dal 60% al 90%. Le anomalie citogenetiche individuate al momento della diagnosi costituiscono un importante fattore prognostico e permettono di stratificare i pazienti in tre diverse categorie di rischio (basso, intermedio, alto). Pazienti con traslocazione t(8;21), inversione del 16 inv.(16;16) o traslocazione t(16;16) e traslocazione t(15;17) hanno prognosi estremamente favorevole; tra le aberrazioni associate ad un rischio elevato troviamo le anomalie del cromosoma 3, come inv(3) e t(3;3), quelle relative al cromosoma 7 (-7) e al cromosoma 11 (t(6;11), t(11;19), t(10;11)). [6] [7] Anche i cariotipi complessi, ossia quelli caratterizzati dalla presenza di due o più alterazioni citogenetiche clonali senza alcuna correlazione, rientrano nella categoria di rischio elevato con prognosi sfavorevole.

Un caso particolare è rappresentato dalla traslocazione t(15;17) (q22;q11.2-q12), caratterizzata da un riarrangiamento genico che determina la fusione dei geni PML, con azione di oncosoppressore, e RAR $\alpha$ , che codifica per il recettore  $\alpha$  dell'acido retinoico. La proteina risultante svolge la sua azione bloccando la maturazione delle cellule blastiche allo stadio di promielociti e causando la leucemia acuta promielocitica (LAP, citotipo M3). Questo tipo di LAM è associata ad una prognosi favorevole e richiede una terapia differente basata sull'impiego di acido all-trans-retinoico (tretinoina) e antracicline, a cui la LAP si è rivelata particolarmente sensibile.

Tra i fattori prognostici l'età del paziente è particolarmente rilevante, dal momento che un'età superiore ai 60 anni è spesso associata ad una prognosi sfavorevole. Anche l'iperleucocitosi alla diagnosi costituisce un fattore prognostico negativo.

## 1.1 Terapia

La terapia delle LAM è basata principalmente sull'impiego di farmaci ad azione citotossica che consentono di distruggere i cloni leucemici. Vengono impiegate combinazioni chemioterapiche ad alte dosi mirate al raggiungimento di una fase di remissione completa (chemioterapia d'induzione), a cui vengono fatti seguire uno o più cicli di chemioterapia intensiva, allo scopo di consolidare tale risposta, in quella che è detta fase di consolidamento.

Il regime di trattamento convenzionale nella terapia d'induzione prevede l'impiego di citosina arabinoside (Ara-C) combinata ad antracicline, come daunorubicina (DNR), doxorubicina o idarubicina, secondo lo schema d'impiego 3+7. Questa terapia è capace d'indurre la remissione completa nel 45-60% dei pazienti adulti e per prevenire la ricaduta si ricorre, nella maggior parte dei casi, ad una chemioterapia di consolidamento intensiva. Altre strategie impiegate sono terapia di mantenimento a basse dosi oppure, dove possibile, il trapianto allogenico o autologo di cellule staminali ematopoietiche. La probabilità di ricaduta, tuttavia, rimane piuttosto elevata e si verifica in circa l'85% dei casi a tre anni dalla diagnosi. La guarigione completa viene raggiunta molto raramente, in particolar modo quando si tratta di pazienti anziani o di soggetti appartenenti alle categorie di rischio elevato da un punto di vista prognostico. Il tasso di sopravvivenza può essere aumentato dal ricorso a trapianto allogenico che, però, non costituisce un'opzione di consolidamento disponibile per l'anziano.

Diversi tentativi sono stati fatti per migliorare i risultati della chemioterapia d'induzione, sostituendo la daunorubicina con altre antracicline o farmaci chemioterapici differenti come fludarabina, ciclofosfamide o etoposide, senza ottenere maggiori risultati.

Altre terapie attualmente in sperimentazione comprendono:

- Inibitori FLT3
- Inibitori della farnesil-transferasi
- Inibitori del proteasoma
- Inibitori di mTOR
- Modulatori della MDR
- Nuovi antimetaboliti come la clofarabina
- Inibitori dell'angiogenesi, nuovi alchilanti, nuovi inibitori delle topoisomerasi. [8]

Un approccio terapeutico introdotto piuttosto di recente come adiuvante nella cura dei tumori è rappresentato dall'immunoterapia, attiva o passiva, che sta acquisendo sempre maggiore importanza grazie alle sue caratteristiche uniche: l'induzione di risposte cliniche più durature, l'assenza del meccanismo di resistenza ai farmaci e soprattutto la scarsa citotossicità. Negli ultimi anni sono stati compiuti progressi significativi che si sono concretizzati nell'impiego di inibitori dei checkpoint linfocitari, virus oncolitici, recettori chimerici delle cellule T (CAR T-cell therapy) ed altri. L'immunoterapia è basata sull'abilità del sistema immunitario di riconoscere antigeni tumore-associati (TAAs) e di mediare una risposta citolitica altamente specifica a carico delle cellule tumorali. Nell'immunoterapia passiva, anticorpi ed altri agenti (cellule T e cellule NK) sono trasferiti al paziente, in modo tale che venga acquisita la risposta immune, ottenuta *in vitro*,

contro le cellule tumorali. L'immunoterapia attiva, invece, prevede l'induzione di una risposta immunitaria cellulo-mediata direttamente *in vivo* nel paziente.

Secondo il modello proposto da Chen e Mellman, i TAAs possono iniziare una risposta immune. In questo ciclo, gli antigeni sono rilasciati dalle cellule tumorali attraverso una serie di meccanismi tra cui la morte cellulare indotta dall'uso terapeutico di radiazioni ionizzanti o dalla chemioterapia citotossica. [9] Le cellule morenti rilasciano anche altri fattori detti DAMPs (damage-associated molecular pattern molecules, ossia profili molecolari associati al danno), generati in condizioni di stress cellulare, ipossia o deplezione di nutrienti, che legano recettori intracellulari o presenti sulla superficie delle cellule immunitarie, inclusi i Toll-like receptors, stimolando risposte immunitarie innate.

Lo screening di diverse classi di agenti antineoplastici in grado di indurre apoptosi delle cellule tumorali ha permesso di identificarne alcuni in grado di promuovere l'immunogenicità del tumore in diversi modi:

- 1) Stimolando l'espressione di segnali specifici sulla superficie cellulare delle cellule morenti (calreticulina, CRT e heat shock proteins 70 and 90, Hsp70/90);
- 2) Provocando il rilascio di fattori che stimolano l'immunità innata (high mobility box 1, HMGB1 e adenosina trifosfato, ATP);
- 3) Riducendo l'attività immunosoppressiva di popolazioni leucocitarie specifiche.

## **2. La risposta immunitaria nella leucemia acuta mieloide**

I tumori sono trattati con combinazioni di terapie che comprendono chirurgia, radioterapia locale e chemioterapia. Nonostante in alcuni casi, a seguito dei trattamenti, il tumore sembri eradicato, nell'organismo possono rimanere cellule tumorali dormienti responsabili di successive ricadute, con conseguente fallimento terapeutico. Per questo motivo è importante non solo programmare dei corretti regimi terapeutici ma anche trovare il modo per stimolare il sistema immunitario a tenere sotto controllo queste cellule o ad eliminarle.

Dati che dimostrano l'aumentata incidenza di tumori solidi in pazienti immunocompromessi, la regressione spontanea di alcuni tumori e l'impatto prognostico favorevole della presenza di linfociti T citotossici (CTL) e anticorpi tumore-specifici nel paziente, supportano l'ipotesi che il sistema immunitario svolga un ruolo molto importante nella progressione tumorale. [10]

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche, originariamente introdotto per consentire l'impiego di elevate dosi di chemioterapia o chemioradioterapia, fornisce la più chiara dimostrazione della capacità del sistema immunitario di eliminare il tumore. Già nel 1956, infatti, Barnes et al. dimostrarono, attraverso una serie di esperimenti su modello murino di leucemia, l'esistenza della Graft vs Leukemia (GvL), ossia di un effetto anti-leucemico del trapianto, quando riuscirono ad ottenere l'eradicazione della malattia in topi irradiati sottoposti a trapianto allogenico di midollo, contrariamente al trapianto singenico. [11]

Anche nell'uomo, conferme dell'esistenza della GvL sono derivate dall'osservazione che, a seguito di trapianto di midollo osseo allogenico, il tasso di ricaduta era marcatamente più basso in pazienti che sviluppavano GVHD (Graft Versus Host Disease, malattia del trapianto contro l'ospite) cronica o acuta rispetto agli altri. [12] [13] In altri studi è stato

evidenziato come la probabilità di ricaduta rilevata fosse maggiore quando dal midollo trapiantato erano eliminate le cellule T. [14] Infine si è potuto vedere che l'impiego di infusioni di linfociti T da donatore sano può indurre modeste risposte in pazienti con LAM che ricadono dopo trapianto. [15] Questi effetti provengono dall'abilità delle cellule NK, dei linfociti T  $\gamma\delta$  e dei linfociti T citotossici del donatore di uccidere le cellule leucemiche dopo il trapianto. Appare chiaro, quindi, che cellule immunocompetenti trapiantate con cellule staminali, o da esse originate, esercitano un potente effetto di GvL, indipendentemente dagli effetti della chemioterapia ad alte dosi. D'altra parte la LAM è una neoplasia con caratteristiche che la rendono adatta a suscitare risposte immunitarie specifiche che possono bloccare la crescita tumorale. Nel 50-90% dei casi, infatti, sono riscontrate anomalie cromosomiche, soprattutto traslocazioni, che danno origine ad antigeni di rigetto del tumore, ossia neo-antigeni non espressi dalle cellule normali. Due anomalie caratteristiche della LAM ben caratterizzate sono la traslocazione 15/17 e la traslocazione 8/21 che danno origine a geni chimerici e ai loro prodotti, rispettivamente PML/RAR $\alpha$  e ETO/AML. Mutazioni puntiformi missenso per RAS e TP53 e duplicazioni nel gene di FLT3, sono state descritte per specifici sottotipi e sono comunemente ritrovate in pazienti con LAM. [15] Le cellule leucemiche, inoltre, esprimono ad elevati livelli antigeni specifici che possono essere riconosciuti dal sistema immunitario e possono indurre una risposta T cellulare mirata, tra questi la proteinasi 3 (PR3), il recettore per la mobilità mediata dall'acido ialuronico (RHAMM) e la proteina del tumore di Wilms (WT1). [16] Dal momento che il sistema immunitario è attivo contro le cellule leucemiche non bisogna sottovalutare, dunque, la possibilità di modularne la sua azione per prolungare la sopravvivenza dei pazienti. Vari tipi cellulari come cellule T  $\alpha\beta$ , cellule T  $\gamma\delta$ , cellule

NKT, e cellule NK possono svolgere la loro funzione nel controllo della crescita tumorale, insieme ad una serie di molecole effettrici, quali perforina e TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), ma anche IFN- $\gamma$ , IFN di tipo I e IL-12.

E' importante capire se nei pazienti possono essere indotte risposte T-cellulari efficaci e in grado di eliminare le cellule tumorali in circostanze in cui i linfociti T naïve tumore-specifici potrebbero essere resi tollerogenici nei confronti del tumore. La LAM, infatti, attiva dei meccanismi nell'ospite per sfuggire al controllo da parte del sistema immunitario. Molti di questi meccanismi regolatori sembrano essere condivisi tra tumori solidi e neoplasie ematologiche e includono l'espressione di molecole costimolatorie ad azione negativa come PD-L1 (Programmed Cell Death Ligand 1) e la galectina 9, enzimi come IDO1 (Indoleamine 2,3-dioxygenase) e l'induzione dell'espansione di popolazioni di cellule immunoregolatorie, come linfociti T regolatori (Tregs) e cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC, Myeloid Derived Suppressor Cells). [17] [18] [19] [20]

### 3. La morte cellulare

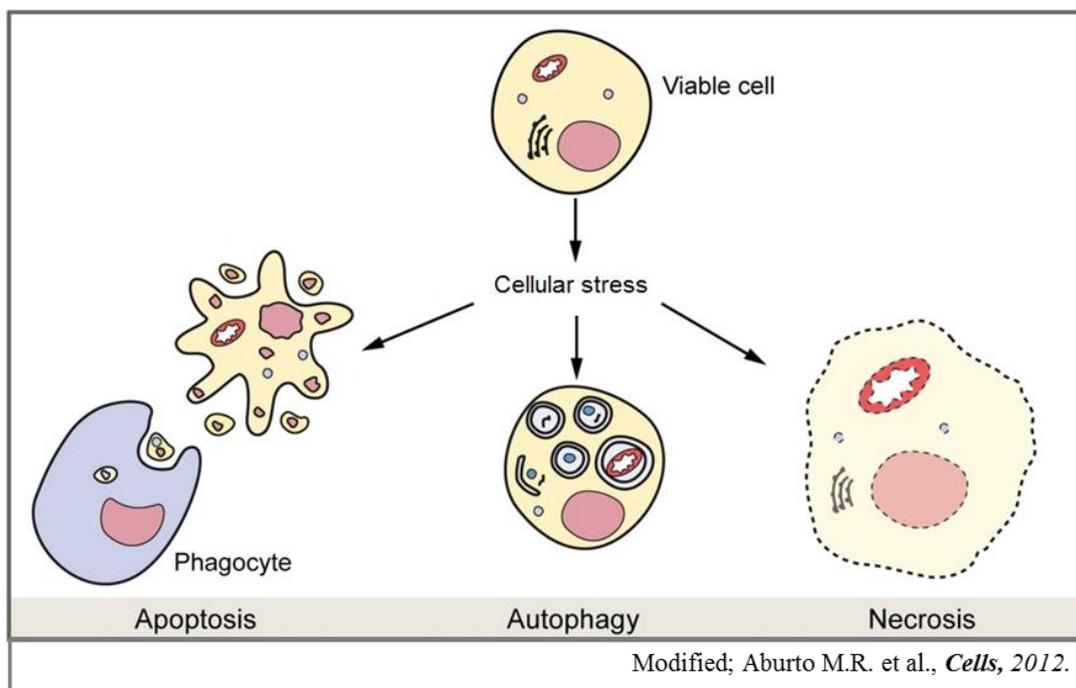
In condizioni di omeostasi, nell'organismo adulto, ogni evento di duplicazione cellulare deve essere compensato dall'eliminazione di un'altra cellula. Il sistema immunitario è, dunque, regolarmente esposto a cellule morenti, sia nel caso di lesioni e infezioni che durante il normale turnover cellulare. Per questo motivo devono esistere dei meccanismi che permettano di discriminare tra le diverse forme di morte cellulare, consentendo di eliminare correttamente gli agenti patogeni o di favorire la guarigione dei tessuti ma, allo stesso tempo, evitando risposte incontrollate verso il self, che porterebbero a malattie autoimmuni. Una risposta efficace contro gli stessi tessuti dell'ospite si rende necessaria per eliminare le cellule tumorali dopo il trattamento con agenti chemioterapici ad azione citotossica. Il sistema immunitario è chiamato, quindi, a stabilire di volta in volta se la morte cellulare è immunogenica, tollerogena o 'silenziosa'.

La morte cellulare può essere classificata in base a diversi fattori [21] :

- aspetto morfologico del processo letale (che può essere apoptotico, necrotico, autofagico o associato alla mitosi)
- criteri enzimologici (con e senza il coinvolgimento di nucleasi o classi distinte di proteasi, come caspasi o catepsine)
- aspetti funzionali (programmata o accidentale, fisiologica o patologica)
- caratteristiche immunologiche (immunogenica o non immunogenica)

Da un punto di vista morfologico, l'apoptosi è caratterizzata da riduzione del volume cellulare (picnosi), condensazione della cromatina e frammentazione nucleare (carioressi). Le cellule apoptotiche si sfaldano dando origine a piccoli corpi tondeggianti, detti corpi

apoptotici, circondati da membrane e contenenti gli organelli citoplasmatici intatti o frammenti di nucleo, che alla fine vengono eliminati dalle cellule fagocitarie residenti (Figura 1). [22]



**Figura 1. Caratteristiche morfologiche della cellula durante il processo letale**

La morte cellulare autofagica, invece, avviene in assenza di condensazione della cromatina ma è accompagnata da una massiccia vacuolizzazione del citoplasma che viene digerito da idrolasi lisosomiali. La relazione funzionale tra apoptosi e autofagia è complessa e quest'ultima può sia contribuire alla morte della cellula che costituire una difesa contro lo stress cellulare acuto, come quello derivante dalla deprivazione di sostanze nutritive o fattori di crescita essenziali. [23]

La necrosi è morfologicamente caratterizzata da un aumento di volume delle cellule (oncosi), rigonfiamento degli organelli e infine rottura della membrana plasmatica con

conseguente perdita del contenuto intracellulare. Con il termine necrosi si tende ad identificare un evento negativo, associato ad una perdita patologica di cellule e caratterizzato dalla capacità delle cellule necrotiche stesse di promuovere una condizione di infiammazione locale che può sostenere la crescita tumorale. [24] Da questo punto di vista, l'apoptosi può essere considerata un meccanismo 'fisiologico' di morte cellulare mentre la necrosi un meccanismo 'patologico'. L'idea semplicistica secondo cui la morte cellulare fisiologica (apoptosi) sia intrinsecamente tollerogena, mentre la morte cellulare patologica (necrosi) sia intrinsecamente immunogena e susciti reazioni infiammatorie, tuttavia, è stata recentemente messa in discussione da vari studi che mostrano come in alcuni casi anche l'apoptosi possa essere immunogena. L'evento chiave è rappresentato dall'identificazione di un gruppo selezionato di agenti, in particolare le radiazioni ionizzanti e alcune classi di chemioterapici come le antracicline, in grado di indurre una modalità di morte cellulare, definita *morte immunogena*, che è apoptotica nella morfologia, caspasi-dipendente e altamente efficace nello stimolare una risposta immunitaria, in assenza di qualsiasi adiuvante. [21] [25] L'immunogenicità della morte cellulare, in questi casi, appare dettata da segnali specifici di danno (come l'esposizione della CRT) piuttosto che dalla sola modalità di morte cellulare. Vari studi hanno evidenziato che diversi fattori lavorano di concerto per determinare se la morte cellulare è immunogena o meno. Questi parametri includono l'antigenicità intrinseca delle cellule, il tipo di stress o l'evento di attivazione della morte cellulare, la natura dell'induttore, la precisa via di morte che è impegnata e la disponibilità nella sede di cellule specializzate in grado di fagocitare le cellule morenti e di presentare l'antigene agli effettori del sistema immunitario. [26]

## 4. La morte cellulare immunogenica

In contesti giusti l'apoptosi può essere altamente immunogenica, consentendo la stimolazione delle cellule dendritiche (DCs) e di altre cellule presentanti l'antigene da parte del materiale rilasciato dalle cellule morenti, inclusi una potenziale gamma di neo-antigeni che qualsiasi tumore geneticamente distinto potrebbe esprimere. Lo stimolo responsabile della morte cellulare influenza sostanzialmente l'immunogenicità delle cellule tumorali in fase di apoptosi.

Dati recenti supportano il ruolo della chemioterapia nell'attivazione della risposta immunitaria, sia nei tumori solidi che nelle neoplasie ematologiche, con importanti implicazioni terapeutiche. Sono già stati identificati diversi agenti in grado di innescare la cosiddetta morte cellulare immunogenica (immunogenic cell death; ICD), che includono, oltre alle radiazioni ionizzanti, anche farmaci chemioterapici come ciclofosfamide, oxaliplatino, mitoxantrone e antracicline. [27] [28] [29] La morte delle cellule tumorali indotta da questi trattamenti è in grado di determinare un efficiente *pulsing* dei TAAs nelle cellule presentanti l'antigene (antigen presenting cells; APC), in particolare nelle DCs, che a loro volta possono avviare la risposta immunitaria antitumorale T-cellulare. In questo contesto, cioè a seguito dell'effetto citotossico dei farmaci antitumorali, la cellula tumorale va incontro ad una serie di modificazioni intracellulari ed extra/pericellulari, che favoriscono la presentazione dei TAAs e l'induzione di un'immunità anti-tumorale (Figura 2). In particolare, durante l'apoptosi, le cellule subiscono una grande varietà di eventi biochimici e molecolari con conseguente alterazione della membrana plasmatica, secrezione di proteine nel microambiente circostante e attivazione di vie cataboliche intracellulari. [30] [31] L'alterazione della composizione e delle caratteristiche superficiali

dei corpi apoptotici causerebbero delle modificazioni dell'infiltrazione locale da parte delle cellule del sistema immunitario con effetti sistemici sulla risposta immune.

La biologia del processo caratterizzante la morte in senso immunogenico è stato studiato attivamente. Nelle fasi iniziali, la CRT trasloca dal reticolo endoplasmatico (endoplasmic reticulum; ER) alla superficie cellulare, avviando così il processo apoptotico caspasi-dipendente. Parallelamente, le HSP90 e HSP70 legano gli antigeni tumorali e influenzano la maturazione delle DCs. Nelle fasi tardive, il fattore pro-infiammatorio HMGB1, che lega il TLR4 sulle DCs, viene rilasciato dal nucleo nel mezzo extracellulare. Infine la secrezione autofagia-dipendente dell'adenosintrifosfato (ATP), che lega i recettori purinergici presenti sulle APC, promuove il reclutamento, la sopravvivenza e il differenziamento delle DCs. [32] [33]

Nelle leucemie, anche se i dati *in vitro* suggeriscono l'induzione della ICD a seguito di alcuni trattamenti chemioterapici, un quadro completo di tale processo non è ancora disponibile.

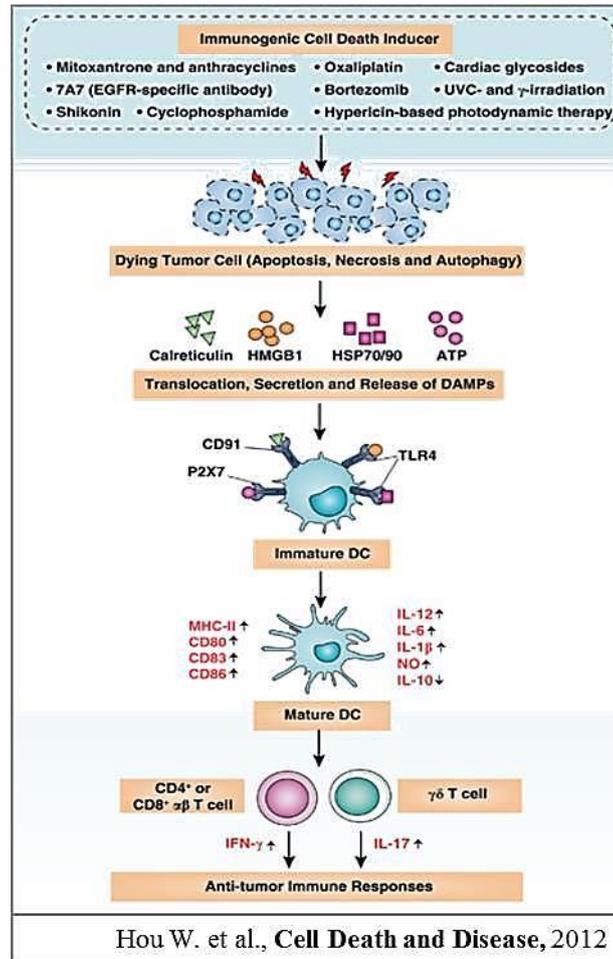


Figura 2. Rappresentazione schematica degli eventi chiave della morte cellulare immunogenica indotta da chemioterapia e radiazioni ionizzanti. Nelle cellule tumorali morenti la calreticulina e le HSPs vengono traslocate sulla superficie cellulare; il fattore pro-infiammatorio HMGB1 viene rilasciato nel mezzo extracellulare e viene secreto ATP. Queste molecole interagiscono con i loro recettori (CD91, TLR4, P2X7) sulle DCs determinandone la maturazione e inducendo la secrezione di citochine pro-infiammatorie che attivano la risposta immunitaria antitumorale.

## 4.1. Calreticulina

La calreticulina è una proteina di 46-kDa localizzata al livello del lume dell'ER. E' presente in una grande varietà di specie ed è possibile trovarla in tutte le cellule dotate di ER, ad eccezione dei lieviti. [34]

E' costituita da tre domini strutturali e funzionali:

- Il dominio N-terminale altamente conservato che svolge la funzione di chaperone;
- Il dominio P, ricco di proline, che costituisce lo scheletro della proteina ed è anch'esso coinvolto nell'attività di chaperone, interagendo con altri chaperoni nel lume dell'ER;
- Il dominio C-terminale che possiede il sito di legame per il  $\text{Ca}^{2+}$ , con una capacità di legame di 25 mol  $\text{Ca}^{2+}$ /mol di proteina. [35]

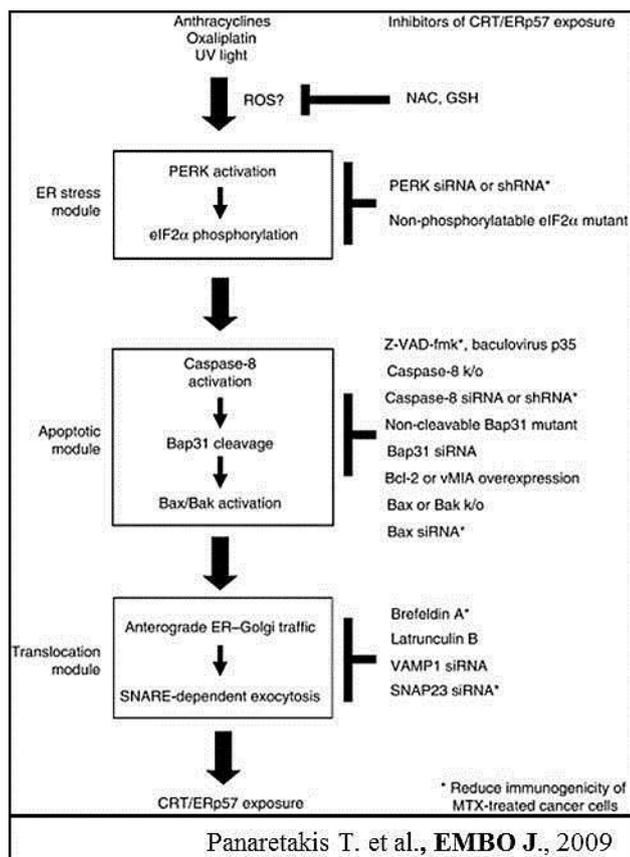
La calreticulina può essere localizzata anche nel citoplasma, sulla membrana cellulare e nella matrice extracellulare, agendo sia all'interno che all'esterno dell'ER.

All'interno dell'ER la calreticulina gioca un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare e nel suo immagazzinamento, partecipando ad una grande varietà di meccanismi di trasduzione del segnale  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendenti. [36] È coinvolta, inoltre, nel ciclo calreticulina/calnexina dove, interagendo con la calnexina e con la proteina di 57-kDa ER (ERp57), assicura il corretto ripiegamento di proteine e glicoproteine di nuova sintesi, prima che esse siano inviate alla loro destinazione finale. [37] In questo contesto è fondamentale anche per l'assemblaggio delle molecole MHC di classe I necessarie per la presentazione degli antigeni di classe I. [38]

All'esterno dell'ER è coinvolta in vari processi come l'adesione cellulare ma anche il riconoscimento e la rimozione di cellule apoptotiche, detriti cellulari e cellule tumorali.

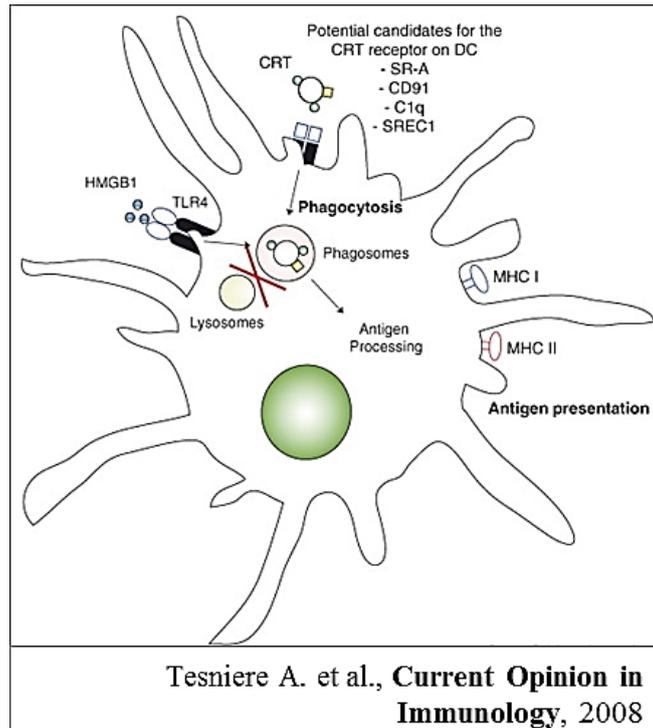
L'esposizione a farmaci chemioterapici appartenenti alla classe delle antracicline o a base di platino, le radiazioni ionizzanti, la diminuzione delle riserve di  $\text{Ca}^{2+}$  stoccate nell'ER, tutti i meccanismi in grado di causare uno stress del reticolo, sono in grado di indurre la traslocazione del complesso CRT/ERp57 sulla superficie cellulare. I meccanismi coinvolti nell'esposizione della proteina sulla superficie cellulare sono ancora poco conosciuti. Uno dei pathway proposti si compone di tre moduli: induzione dello stress del reticolo → apoptosi → traslocazione. Inizialmente l'induzione di una risposta allo stress dell'ER causa l'attivazione della serina/treonina chinasi del reticolo PERK, che va a fosforilare il fattore eucariotico di inizio della trascrizione  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ). In seguito si ha la parziale attivazione della caspasi 8 (ma non della caspasi 3), il clivaggio da parte della caspasi 8 della proteina BAP31 e l'attivazione conformazionale delle proteine pro-apoptotiche BAX e BAK. Il processo di traslocazione prevede, infine, l'esocitosi mediante un meccanismo SNARE-dipendente in cui calreticulina e ERp57 sono trasportati, all'interno di vescicole, dall'apparato del Golgi sul lato esterno della membrana plasmatica (Figura 3). [39] [40]

L'esposizione della CRT funziona da “*eat me signal*” per le DCs e rappresenta un componente cruciale nell'attivazione della risposta autoimmune suscitata dalla chemioterapia. [41] [42] In pazienti affetti da LAM, in seguito ad iniezione endovenosa di antracicline, la CRT trasloca sulla superficie delle cellule tumorali circolanti e la sua aumentata espressione sulla membrana dei blasti corrisponde ad un incremento della risposta immunitaria agli antigeni tumorali. [43]



**Figura 3. Meccanismo di trasduzione del segnale attivato dai ROS a monte dell'esposizione della CRT sulla membrana citoplasmatica**

La calreticulina dà inizio alla fagocitosi delle cellule apoptotiche, legandosi e attivando il recettore CD91 (chiamata anche proteina recettore LDL-correlata, LRP) presente sui fagociti. Altri potenziali recettori della calreticulina sulle DCs potrebbero essere il recettore scavenger A (SR-A), il recettore scavenger espresso dalle cellule endoteliali di tipo I (SREC-1), il fattore del complemento C1q (Figura 4). [30]



**Figura 4. Ruolo della calreticulina e possibili recettori sulle cellule dendritiche**

La presenza di un recettore specifico per la CRT è essenziale per l'immunogenicità della morte cellulare, che può essere facilmente abolita mediante l'impiego di anticorpi specifici neutralizzanti per la calreticulina o il silenziamento mediante siRNA. Viceversa tali effetti vengono ripristinati fornendo calreticulina ricombinante [44] o mediante l'uso di agenti farmacologici che favoriscano la traslocazione della calreticulina, come gli inibitori della fosfatasi PP1. Tra questi la tautomicina e la caliculina A, impiegati nel modello murino, hanno migliorato *in vivo* l'efficacia terapeutica di altri farmaci chemioterapici che non inducono morte immunogenica, come mitomicina C ed etoposide, suscitando una specifica risposta immunitaria. [41]

## 4.2. High Mobility Group Box 1

La proteina HMGB1 è stata identificata e descritta per la prima volta nel 1973, durante separazione elettroforetica delle proteine associate alla cromatina. [45] E' una proteina nucleare altamente conservata nei mammiferi, che partecipa al ripiegamento del DNA nella struttura cromatinica, influenzando la trascrizione ed altre funzioni nucleari. Strutturalmente tale proteina, costituita da 219 amminoacidi (25kDa), presenta tre domini: due domini basici che legano il DNA (HMG-box A e B) e una lunga coda acida C-terminale. HMGB1 può interagire attraverso il suo sito HGM con una grande varietà di proteine, incluse la proteina legante TATA (TBP), il p53, le proteine HOX, i fattori di trascrizione ottamerici (Oct1, Oct2 e Oct4), i recettori per gli steroidi (glucocorticoidi ed estrogeni), la proteina di attivazione della ricombinazione genica RAG1 e molte proteine virali. [46]

Oltre a svolgere un ruolo intranucleare, HMGB1 funziona anche da molecola di segnalazione extracellulare. In seguito a stress cellulare, la proteina trasloca nel citosol e viene rilasciata all'esterno della cellula. In altri casi è attivamente secreta da macrofagi, cellule NK e DCs mature, quando HMGB1 media la risposta ad infezioni, lesioni ed infiammazione. [47] Il legame della proteina HMGB1 o del suo dominio di 60 aminoacidi Box B a specifici recettori può indurre, insieme ad altre citochine, la maturazione di DCs mieloidi con un'aumentata espressione sulla superficie di molecole costimolatorie come CD40, CD54, CD80, CD83 e del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II. [48] Normalmente, nelle cellule vive, HMGB1 non è legata saldamente al DNA e, quando le cellule muoiono in seguito a danni meccanici o termici, ipossia o deplezione di ATP, essa diffonde rapidamente nello spazio extracellulare. Al contrario, quando la cellula muore per

apoptosi la cromatina si modifica in modo tale da legare HMGB1 irreversibilmente. Almeno in alcune circostanze, però, anche le cellule apoptotiche ed autofagiche possono rilasciare HMGB1. Contrariamente a quanto accade nel caso di danno al DNA indotto da radiazioni UV o platinazione, infatti, in cui HMGB1 è sequestrata nel nucleo, gli induttori della morte cellulare immunogenica, come le antracicline, stimolano il rilascio di HMGB1 nelle fasi tardive dell'apoptosi. [49] [50] [51]

HMGB1, rilasciato nello spazio extracellulare, lega contemporaneamente diverse proteine, tra cui almeno tre diversi recettori di superficie presenti sulle cellule dendritiche: receptor for advanced glycosylation products (RAGE), toll-like receptor 2 (TLR2) e toll-like receptor 4 (TLR4). L'immunogenicità indotta dalle antracicline, tuttavia, sembra dipendere esclusivamente dal pathway di segnalazione TLR4-MyD88. [52] Il legame di HMGB1 al TLR4 facilita il processamento e la presentazione degli antigeni tumorali attraverso l'inibizione della fusione dei fagosomi con i lisosomi, prevenendone così la degradazione precoce e consentendo il loro trasporto, attraverso i compartimenti della cellula specializzati per la presentazione dell'antigene, alle cellule immunitarie effettrici.

L'inibizione di HMGB1 attraverso specifici anticorpi o il silenziamento di HMGB1 o di TLR4, aboliscono l'immunogenicità delle cellule tumorali morenti sia *in vitro* che *in vivo*, determinando un'inefficace cross-priming dei linfociti T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. [30] Esperimenti su DCs di topi knockout per TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>), inoltre, hanno dimostrato che l'inibizione della fusione tra lisosomi e fagosomi mediante l'aggiunta di cloroquina ripristina la funzione di presentazione dell'antigene. Risultati molto simili sono stati ottenuti in pazienti affetti da melanoma portatori della mutazione Asp299Gly sul gene che codifica per il

TLR4. Tale mutazione abolisce la capacità delle DCs di presentare antigeni tumorali, capacità che può essere ripristinata dall'aggiunta di cloroquina. [33]

È stato dimostrato, infine, che HMGB1 rilasciato in fase di necrosi dalle cellule tumorali induce, oltre che maturazione delle DCs, anche secrezione di IL-12 nelle DCs e di IL-2 e IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti T, fungendo da stimolo per la polarizzazione della risposta in senso Th1. [48]

### **4.3. Heat Shock Proteins**

Un'ampia varietà di stimoli fisiologici e ambientali possono suscitare, tra i diversi meccanismi di adattamento, l'espressione delle proteine da shock termico (HSPs). Si tratta delle proteine maggiormente conservate, presenti sia in cellule procariotiche che eucariotiche. Esse svolgono essenzialmente il ruolo di chaperon, assicurando il corretto ripiegamento delle proteine neosintetizzate e di quelle danneggiate, in seguito a stress cellulare e prevenendone l'aggregazione. Le HSPs, tuttavia, possono svolgere un duplice ruolo, così come esibiscono doppia localizzazione, intracellulare ed extracellulare.

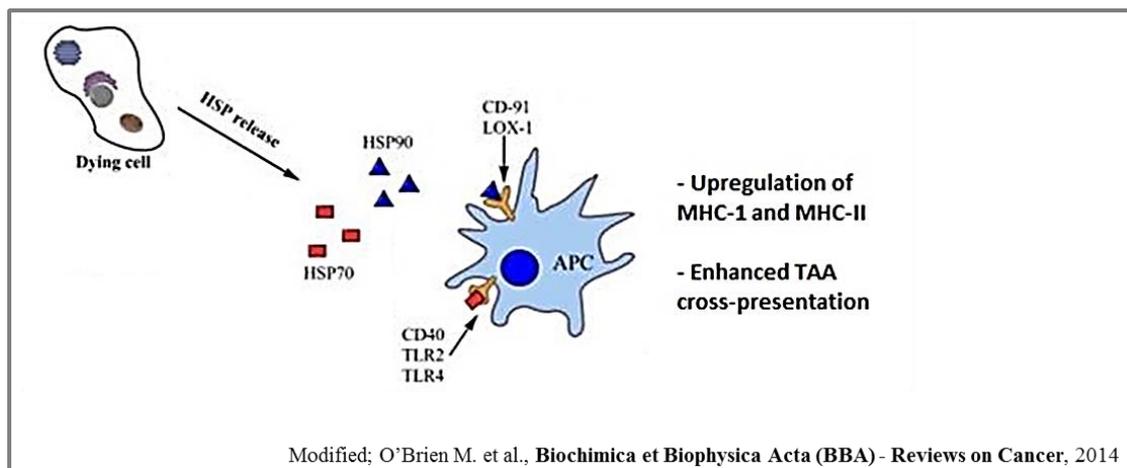
Le HSPs intracellulari hanno una funzione protettiva nei confronti della cellula, essendo responsabili dell'indirizzamento delle proteine danneggiate alla degradazione mediata dal proteasoma e, quindi, del mantenimento dell'omeostasi proteica. Sembra, inoltre, che esse siano in grado di modulare il pathway apoptotico. Le HSPs, infatti, interagiscono con vari componenti del macchinario apoptotico, sia a livello pre- che post-mitocondriale, per assicurare che un danno alla cellula indotto da stress non induca morte cellulare in modo

inappropriato. Per queste proprietà antiapoptotiche è stato ipotizzato persino un ruolo di queste proteine nella tumorigenesi. [53] [54] [55]

Le HSPs possono anche traslocare dal compartimento intracellulare alla superficie esterna della membrana citoplasmatica, come accade per HSP70, o essere rilasciate nel mezzo extracellulare, nel caso di HSP70, HSP90 e Gp96. Il rilascio delle HSPs da parte di cellule sottoposte a stress e durante l'apoptosi tardiva, rappresenta uno dei tratti distintivi della morte immunogenica indotta da farmaci chemioterapici. [53]

Ci sono diversi meccanismi attraverso cui le HSPs possono potenziare l'immunogenicità. Da un lato, quando sono presenti sulla superficie cellulare, possono migliorare il riconoscimento e l'uptake delle cellule morenti da parte delle cellule dendritiche. Dall'altro, i peptidi antigenici derivati dalle cellule tumorali possono legarsi alle HSPs ed essere direttamente riutilizzati per la presentazione antigenica in modo particolarmente efficace.

Il riconoscimento dei complessi HSPs-antigene è mediato dal TLR4, che facilita il processamento intracellulare dei TAAs e la loro presentazione. Tuttavia anche il TLR2, il CD40 e recettori scavenger come CD91, LOX1 e il recettore scavenger-A (SR-A) sono in grado di riconoscere le HSPs e trasmettere segnali di maturazione per le DCs (Figura 5). [56]



**Figura 5. Il legame delle HSPs ai recettori presenti sulle DCs facilita il riconoscimento e l'uptake dei complessi HSP-antigene e ne promuove la maturazione**

Recentemente, Dhodapkar et al. hanno riportato che la HSP90 esposta sulla superficie contribuisce all'immunogenicità della morte di cellule di mieloma indotta dall'inibitore del proteasoma bortezomib. Anche in questo caso, la HSP90 di superficie stimola la maturazione delle DCs. [57]

La presenza di HSPs sulla superficie delle cellule tumorali morenti, dunque, facilita il loro riconoscimento da parte delle DCs, ne stimola la maturazione ed è in grado di indurre una risposta immunitaria specifica contro il tumore.

#### **4.4. ATP**

Uno dei tratti distintivi della morte cellulare immunogenica è il rilascio attivo di ATP da parte delle cellule morenti che stanno entrando in fase apoptotica ma non l'hanno ancora completata.

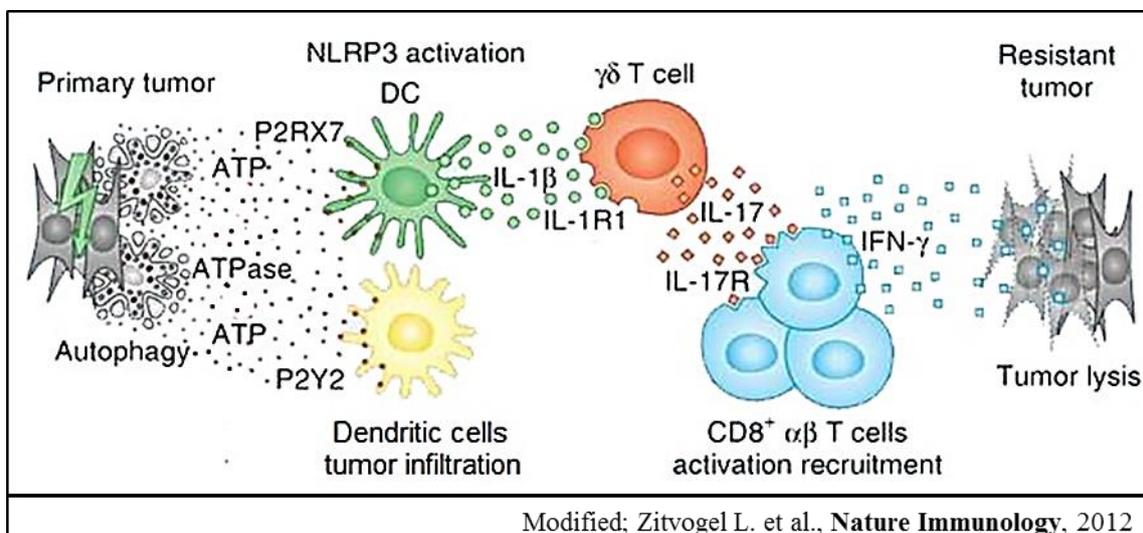
L'ATP è universalmente considerato, all'interno delle cellule, un fattore di scambio di energia che collega anabolismo e catabolismo, ma rappresenta anche il carburante per

processi come motilità cellulare, eventi fosforilativi e trasporto attivo. Nucleotidi extracellulari, soprattutto ATP, UTP, ADP e UDP, svolgono ruoli chiave in diverse attività biologiche, tra queste anche la modulazione della funzione di cellule tumorali. Diversi studi hanno dimostrato la capacità dei nucleotidi extracellulari di regolare la proliferazione, la migrazione e la morte cellulare, in base all'espressione del sottotipo recettoriale purinergico coinvolto (P2R) e del tipo/concentrazione di nucleotidi rilasciati o presenti nell'ambiente extracellulare. La famiglia dei recettori P2R è suddivisa in 2 sottogruppi: P2XR, che comprende recettori che, al momento dell'attivazione, formano dei canali di membrana che regolano il flusso di ioni nelle cellule, e P2YR, che comprende recettori di membrana proteina G-accoppiati. [58]

Come l'esposizione della CRT, il meccanismo di secrezione di ATP nella ICD dipende fortemente dalla fase apoptotica e dal tipo di stress o di stimolo che l'ha indotta.

Nonostante possa avvenire attraverso diversi meccanismi, l'elevato rilascio di ATP durante la ICD indotta da chemioterapia dipende principalmente dall'induzione del processo autofagico. Martins et al. hanno dimostrato che l'autofagia è essenziale nel promuovere la formazione di autolisosomi LAMP1<sup>+</sup> (lysosomal-associated membrane protein 1) in cui è accumulato ATP che viene poi rilasciato all'esterno della cellula a seguito della traslocazione delle vescicole sulla membrana citoplasmatica. L'esocitosi dipende dall'apertura, caspasi-mediata, dei canali della pannessina 1. L'inibizione farmacologica o il silenziamento genico dei componenti degli autofagosomi, come Atg5, Atg7 o Beclin-1, determinano una riduzione significativa del rilascio di ATP, limitando l'immunogenicità delle cellule tumorali morenti. [59]

È importante notare che l'ATP extracellulare, oltre a rappresentare un DAMP che stimola risposte immunitarie antitumorali, funge da segnale “find me” e facilita il reclutamento di cellule presentanti l'antigene nei siti di apoptosi massiva. [60] [61] [62] [63] Il reclutamento delle DCs nei siti tumorali avviene attraverso una segnalazione mediata dai recettori P2Y2 [64] [65], il legame ai recettori del sottotipo P2Y11, presenti su monociti e DCs, invece, ne induce anche la maturazione (Figura 6). [66] [67]



**Figura 6. Effetti anti-tumorigenici dell'ATP rilasciato in corso di morte cellulare immunogenica**

Una volta reclutate, le cellule immunitarie naive hanno bisogno di segnali di attivazione per aumentare la loro attività anti-tumorale. Recentemente è stato dimostrato che i recettori purinergici di tipo P2X7 sono essenziali per la risposta immunitaria indotta dalla chemioterapia. L'ATP rilasciato dalle cellule morenti lega i recettori P2RX7 presenti sulle DCs, determinando l'assemblaggio e l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3/ASC/caspasi-1 (NOD-like Receptor protein 3), a seguito della generazione di un flusso di ioni  $Ca^{2+}$  e  $K^+$ , e guidando la secrezione di IL-1 $\beta$ . L'IL-1 $\beta$  è fondamentale per un

adeguato reclutamento dei linfociti T  $\gamma\delta$  secernenti IL-17 e la generazione di linfociti T citotossici CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> tumore-specifici. [68] [69]

Da uno studio è risultato che individui con carcinoma mammario trattati con antracicline e portatori di una mutazione con perdita di funzione del P2RX7 sviluppavano la malattia metastatica più rapidamente rispetto agli individui portatori dell'allele normale, ad indicare che l'inflammasoma NLRP3 collega le risposte immunitarie innate e adattive contro le cellule tumorali morenti. A supporto del ruolo chiave del pathway ATP/P2X7/NLRP3 in risposta alla chemioterapia, Ghiringhelli et al. hanno dimostrato che l'attivazione di cellule T CD8<sup>+</sup> produttori IFN- $\gamma$  fallisce in assenza del recettore funzionale per l'IL-1 (IL-1R<sup>-/-</sup>), in modelli knockout per NLRP3<sup>-/-</sup> (NLRP3<sup>-/-</sup>) o per la Caspasi-1<sup>-/-</sup> (Casp-1<sup>-/-</sup>) nei quali l'effetto antitumorale della chemioterapia risulta significativamente ridotto. [70]

## **5. Meccanismi di tolleranza immunologica nella leucemia acuta mieloide**

Le cellule leucemiche possono sfuggire a risposte immunitarie, autologhe o allojeniche, attraverso vari meccanismi, come l'espressione dell'enzima IDO1 nei blasti, la produzione di citochine inibitorie o un'azione di soppressione nei confronti di cellule dendritiche e cellule NK.

In seguito verranno approfonditi alcuni aspetti dei 5 pathways inibitori più rilevanti.

### **5.1. Asse PD-1/PD-L1**

Le vie di costimolazione del recettore delle cellule T (T cell receptor, TCR) hanno un ruolo importante nella regolazione della tolleranza e dell'attivazione delle cellule T. B7-H1 (noto anche come PD-L1 o CD274) è un membro della superfamiglia B7-CD28 ed è un ligando per PD-1 (recettore della morte programmata 1), anch'esso membro della stessa famiglia.

[71]

PD-1 è una molecola che funziona da recettore di costimolazione negativo ed è presente su vari tipi di cellule, comprese cellule B e T e cellule di derivazione mieloide. Cellule T antigene-specifiche esprimenti PD-1 sono state identificate come disfunzionali nella produzione di citochine e nella proliferazione a seguito di stimolazione con l'antigene.

Ci sono 2 principali ligandi per PD-1: PD-L1 (B7-H1) e PD-L2 (B7-CC). L'espressione di PD-L2 è in gran parte limitata alle APC. Viceversa, PD-L1 è ampiamente espresso in una grande varietà di tessuti, compresi fegato, polmone, milza e midollo osseo. L'interazione tra PD-1 e PD-L1 gioca un ruolo importante nel controllo delle normali risposte

immunitarie ed è coinvolta nella tolleranza periferica, nella regolazione dell'autoimmunità, nell'allergia, nelle infezioni e nell'immunità antitumorale. [72] [73]

L'espressione di PD-L1 è stata rilevata in molti tipi di cellule tumorali, dove può essere ulteriormente indotta da esposizione a IFN- $\gamma$ . [74] In particolare è stato dimostrato recentemente che plasmacellule di mieloma multiplo esprimono PD-L1 e la sua espressione è maggiormente aumentata a seguito di stimolazione dei TLRs o con IFN- $\gamma$ , attraverso un pathway dipendente da MEK/ERK e MyD88/TRAF6. [71]

In diversi tipi di leucemia e nel mieloma multiplo, l'espressione superficiale di PD-L1 sulle cellule tumorali inibisce l'attivazione delle cellule T e la lisi mediata dai linfociti T citotossici grazie all'interazione con il recettore PD-1, fortemente espresso sulla loro superficie. In un modello murino di LAM, la progressione del tumore ha determinato un aumento dei linfociti T regolatori e l'induzione di un'elevata espressione di PD-1 sui linfociti T CD8<sup>+</sup> citotossici a livello del sito tumorale, dimostrando che l'interazione tra PD-1 e PD-L1 può facilitare la soppressione di cellule T effettrici mediante i Tregs e smorzare la risposta immunitaria antitumorale. Analogamente ai tumori solidi, nel modello murino sperimentale, il blocco dell'asse PD-1/PD-L1 determina un aumento della risposta immunitaria anti-leucemica e permette di prevenire la progressione della LAM. [74] [75]

## **5.2. CTLA-4**

La piena attivazione dei linfociti T naïve richiede la stimolazione dei TCR da parte dei corrispondenti complessi peptide-MHC, nonché la costimolazione della molecola CD28 da parte di CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), presenti sulle APC. CD80 e CD86 sono anche

ligandi di CTLA-4 che, al contrario di CD28, è un recettore co-inibitorio in grado di sopprimere la funzione delle cellule T durante la prima fase di attivazione. CTLA-4, rispetto al recettore CD28, ha una maggiore affinità e avidità per i membri della famiglia B7, interagendo con i quali trasmette un segnale negativo, responsabile dell'inattivazione delle cellule T stesse. Il legame al CD80 e al CD86 sulle APC porta, infatti, ad una riduzione della produzione di IL-2 e ad una conseguente ridotta proliferazione delle cellule T. [76]

*In vivo* è stato dimostrato che gli anticorpi monoclonali (monoclonal antibodies; MAbs) che bloccano le interazioni CTLA-4/B7 da un lato favoriscono l'espansione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> in risposta a diversi stimoli antigenici, dall'altro impediscono l'induzione di fenomeni di tolleranza immunologica periferica in seguito a vaccinazioni. L'inibizione del pathway di CTLA-4 è fondamentale nel tentativo di aumentare una risposta immunitaria antitumorale mediata dalle cellule T, che si tradurrebbe in una regressione tumorale prolungata. [77] [78] In ambito clinico l'anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumab, si è dimostrato a questo scopo particolarmente efficace, soprattutto nei pazienti con melanoma metastatico e carcinoma polmonare a piccole cellule. [79] [80] Anche nelle neoplasie ematologiche, tra cui la LAM, sono in corso trials clinici su CTLA-4 (NCT 010.757.639, NCT 00.060.372). Di recente, infatti, in pazienti affetti da LAM, alcuni studi hanno messo in relazione la presenza di un polimorfismo a singolo nucleotide CT60, nella regione 3'-non tradotta del gene di CTLA4, con un più alto tasso di ricaduta e una sopravvivenza globale a 3 anni più bassi. [81]

### 5.3. CD200

CD200 è una glicoproteina di membrana, appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline, espressa su alcuni tipi cellulari, tra cui cellule del sistema nervoso, linfociti T e B e cellule dendritiche. Di recente l'espressione di CD200, che risulta essere aumentata sulle cellule B di pazienti affetti da leucemia linfatica cronica, è stata indicata come un fattore prognostico sfavorevole in malattie linfoproliferative e nella leucemia acuta. [82] [83] In particolare, l'espressione CD200 è stata associata con l'espansione di Tregs e con una soppressione diretta della funzione dei linfociti T della memoria. [84] [85] Inoltre, è stata dimostrata un'attività immunosoppressiva di CD200, espresso dalle cellule di LAM, direttamente sul sistema immunitario innato, attraverso una riduzione della funzione citolitica delle cellule NK *in vitro*. [86]

Il meccanismo di immunosoppressione è guidato dall'interazione diretta di CD200, espresso sulle cellule leucemiche, con il recettore CD200R presente sulle cellule del sistema immunitario adattativo. Sia nei topi che nell'uomo, l'interazione di CD200 con il suo recettore determina la trasmissione di un segnale immunosoppressivo che porta all'inibizione dell'attività dei macrofagi, all'induzione di linfociti Tregs, alla polarizzazione del profilo di citochine da Th1 a Th2 e all'inibizione delle cellule T tumore-specifiche. [87] Questi risultati suggeriscono di considerare il pathway di CD200 come potenziale bersaglio terapeutico, che potrebbe avere un impatto clinico rilevante nella prognosi della LAM.

## 5.4. LAG-3

Tra le molte molecole che regolano la funzione delle cellule T, Lag-3 (Lymphocyte activation gene-3), o CD223, sta suscitando sempre più interesse.

La proteina transmembrana LAG-3 è una molecola inibitoria di superficie espressa sulle cellule B, le cellule NK, i linfociti T tumore-infiltranti e altri sottogruppi di cellule T [88], di cui ne regola la funzione. Il più noto ligando di LAG-3 è l'MHC di classe II ma i meccanismi attraverso i quali LAG-3 regola le risposte immunitarie non sono ancora del tutto chiari. Studi recenti indicano che l'espressione di LAG-3 sulle cellule T, in particolare sui linfociti CD8, è associata ad una ridotta secrezione di citochine, vale a dire ad un "fenotipo esausto". [89] Questo recettore sembra essere molto importante nel mantenimento della tolleranza non solo ad antigeni self ma anche agli antigeni tumorali, esercitando un'azione diretta sulle cellule del sistema immunitario. Nell'uomo è stata dimostrata un'aumentata espressione di LAG-3 su linfociti T regolatori Foxp3<sup>+</sup> infiltranti il tumore [90] e sembra, inoltre, che la sua espressione, normalmente bassa sulle cellule T CD8<sup>+</sup> naive, aumenti fortemente in seguito a stimolazione antigenica. [91] In modelli murini, l'inibizione di LAG-3, mediante anticorpi bloccanti o il silenziamento del gene, ha comportato un maggiore accumulo e una maggiore attivazione delle cellule T antigene-specifiche nell'infiltrato e l'arresto della crescita tumorale. [92] [93]

Per quanto riguarda le neoplasie ematologiche, in pazienti con linfoma di Hodgkin l'espressione di Lag-3 sui linfociti Tregs e sui linfociti T CD4<sup>+</sup> è stata correlata con l'evasione del tumore dal controllo del sistema immunitario, a causa della compromissione della funzionalità delle cellule T tumore-specifiche. [90]

Lo studio degli effetti dell'espressione di LAG-3 nel contesto del microambiente tumorale ha portato a considerare questa molecola come un bersaglio promettente nel tentativo di migliorare l'immunità antitumorale.

## **5.5. Indoleamina 2,3-Diossigenasi e linfociti T regolatori**

La modulazione da parte di cellule leucemiche di piccole molecole, come gli aminoacidi essenziali arginina e triptofano, è stata recentemente proposta come un nuovo meccanismo di evasione dalla sorveglianza immunologica. In particolare è stato dimostrato che cellule di LAM esprimono IDO1, un enzima chiave nel metabolismo del triptofano, codificato dal gene IDO1 (o INDO). Tale enzima è responsabile dell'ossidazione del triptofano in N-formilchinurenina, che è rapidamente convertita in L-chinurenina dall'azione della arilformamidasi. [94] L'elevata affinità di IDO1 per l'L-triptofano fa sì che esso venga rapidamente metabolizzato ed eliminato dal microambiente tumorale, con effetti sulla progressione tumorale. La concentrazione del triptofano e dei suoi metaboliti, infatti, sono in grado di regolare l'attività del sistema immunitario sotto vari aspetti. [95] [96] [97] La degradazione del triptofano e la produzione di chinurenine è responsabile da un lato dell'inibizione dell'attivazione, della proliferazione e della sopravvivenza delle cellule T [96] [98], dall'altro dell'espansione di popolazioni di cellule T regolatorie (Tregs). [19] L'effetto di IDO1 sui linfociti può essere mediato da due pathway. Il primo pathway prevede l'attivazione, in seguito a deplezione del triptofano, della chinasi sensibile agli stress cellulari GCN2, che si rende responsabile dell'arresto delle cellule T in fase G1 del ciclo cellulare, dell'induzione di uno stato di anergia e di una maggiore sensibilità

all'apoptosi mediata da Fas. [99] Il secondo pathway prevede l'inibizione di mTOR (mammalian target of rapamycin) che funge da segnale di attivazione per la crescita cellulare e la cui azione è alla base della regolazione del ciclo cellulare e della sintesi proteica. [100]

Il ruolo immunosoppressivo e tollerogenico di IDO1 è stato osservato nella tolleranza materna verso il feto [101], nella regolazione di malattie autoimmuni [102], nella soppressione del rigetto del trapianto [103] e nel tumore escape [104] [105] [106]. L'attività enzimatica di IDO1, enzima ubiquitario, può essere indotta nei diversi tipi cellulari da specifici stimoli infiammatori, come l'IFN- $\gamma$ , ma anche il TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$  e il lipopolisaccaride (LPS), anche se con minore efficacia. [107] [108] [109] Probabilmente questo fenomeno appartiene ad un meccanismo di contro-regolazione volto a bloccare l'infiammazione e a limitare un'eccessiva attivazione dei linfociti T in sedi specifiche. Nelle cellule dendritiche l'espressione dell'enzima può essere modulata anche dal CTLA-4 espresso sui linfociti T citotossici e da altre citochine quali IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  e la PGE<sub>2</sub>. [97] [107]

L'enzima IDO1 risulta essere espresso costitutivamente in una grande varietà di tumori, quali il melanoma, il carcinoma ovarico, del colon-retto e la leucemia acuta mieloide. [110] [111] [112] [105] È già stato dimostrato che l'espressione dell'enzima immunoregolatorio IDO1 da parte delle cellule tumorali ne permette la loro evasione dai meccanismi di controllo del sistema immunitario. Nei blasti leucemici, l'espressione di IDO è responsabile dell'instaurarsi di uno stato di tolleranza immunologica attraverso l'induzione di Tregs, in seguito a conversione di linfociti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. [19] [105] Tale effetto tollerogenico non viene ripristinato differenziando i blasti in cellule dendritiche

leucemiche, che ancora esprimono IDO ed espandono una popolazione completamente funzionale di Tregs secernente IL-10. [113]

Fisiologicamente, i Tregs hanno un ruolo fondamentale nella regolazione dell'autoimmunità e dell'infiammazione cronica, esplicando la loro funzione di mantenimento della tolleranza immunologica periferica, sia attraverso il contatto diretto cellula-cellula che attraverso la produzione di citochine con funzione immunoregolatoria come l'IL-10 e il TGF- $\beta$ . [114] La presenza di un elevato numero di Tregs, riscontrata in pazienti leucemici dopo chemioterapia di induzione/consolidamento, tuttavia, correla significativamente con uno scarso esito clinico, con ricadute precoci anche dopo aver raggiunto la remissione completa. Clinicamente, anche l'espressione di IDO1 nelle LAM è stata correlata ad una ridotta risposta alla chemioterapia e ad una maggiore frequenza di ricadute [115], suggerendo chiaramente che il pathway tollerogenico che coinvolge IDO1 e i Tregs può influenzare in modo critico l'efficacia delle terapie anti-tumorali.

## *Materiali e metodi*

## **1. Cellule**

Gli esperimenti *in vitro* di caratterizzazione del processo di morte immunogenica sono stati condotti su due linee cellulari di leucemia acuta mieloide, umana e murina, rispettivamente HL-60 (FAB M3; DSMZ no. ACC 3) e WEHI-3B (mielomonocitica; DSMZ no. ACC 26) e su campioni primari di blasti leucemici ottenuti da pazienti con LAM, che avevano firmato un consenso informato secondo le linee guida istituzionali.

Per la caratterizzazione *ex vivo* della risposta immunitaria indotta da chemioterapia sono state utilizzate cellule mononucleate (MNCs) criopreservate di pazienti affetti da LAM, isolate dal sangue periferico e dal sangue midollare alla diagnosi (quota cellule blastiche > 90%) e MNCs del sangue periferico isolate dopo chemioterapia d'induzione a base di DNR ai giorni +7, +14, +21 e +28 dall'inizio del trattamento chemioterapico.

Per esperimenti funzionali *in vitro* sono stati utilizzati anche MNCs da sangue periferico, isolate da *buffy coat* di donatori sani.

## **2. Isolamento di cellule mononucleate da sangue periferico e midollare**

Al fine di isolare le MNCs, il sangue periferico e midollare dei pazienti e il sangue periferico dai *buffy coat* di donatori sani erano diluiti con soluzione fisiologica (in rapporto 1:2 per il sangue periferico e 1:4 per quello midollare) e stratificati per gradiente di densità (Lympholyte CL5020, Cedarlane, Ontario, Canada). Dopo centrifugazione a 2000 rpm per 20 minuti, le MNCs formavano un anello visibile che veniva prelevato e lavato per due

volte in PBS. Le cellule erano poi contate mediante camera di Neubauer in acido acetico al 3%, per lisare gli eventuali globuli rossi ancora presenti.

### **3. Separazione immunomagnetica**

Le popolazioni cellulari di interesse ( $CD3^+$ ,  $CD19^+$ ,  $CD14^+$ ,  $CD4^+CD25^+$ ) sono state ottenute attraverso un sistema di separazione su colonne (specifiche per la selezione positiva o per la delezione di una frazione cellulare) basato sull'impiego di biglie immunomagnetiche e di un separatore magnetico (Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Germany). L'isolamento delle cellule marcate con biglie immunomagnetiche avviene nel campo magnetico all'interno del quale è posta la colonna. La colonna contiene, infatti, una matrice composta da sfere ferromagnetiche, in grado di trattenere, quando essa è posta nel campo magnetico, le biglie e le cellule ad esse legate che la attraversano. Il protocollo prevede che le cellule siano incubate per 15 minuti a  $4^{\circ}C$  con le biglie magnetiche, coniugate ad anticorpi specifici per l'antigene caratteristico della popolazione d'interesse, in una soluzione tampone costituita da PBS, albumina di siero bovino (BSA) allo 0.5% ed EDTA 5 mM. Al termine dell'incubazione le cellule devono essere lavate con la soluzione tampone, per rimuovere il reagente in eccesso, e risospese nella stessa. La sospensione cellulare viene fatta passare attraverso la colonna e, dopo tre lavaggi, è possibile recuperare la frazione positiva rimuovendo la colonna dal supporto magnetico ed esercitando pressione mediante uno stantuffo per staccare le biglie presenti nella matrice. La frazione negativa, invece, viene eluita durante i lavaggi della colonna e può essere impiegata per separazioni successive.

La caratteristica di biodegradabilità e le piccole dimensioni delle biglie consente di eseguire saggi colturali con le cellule separate, senza che vi sia alcuna influenza sulla sopravvivenza o funzionalità delle cellule ottenute. Questo sistema consente di ottenere recuperi  $\geq 85\%$  e livelli di purezza delle popolazioni isolate che possono superare il 98%.

## **4. Colture cellulari**

### **4.1. Linee cellulari**

La linea cellulare umana di leucemia acuta mieloide HL-60 è stata coltivata *in vitro*, utilizzando il terreno RPMI 1640 (Lonza, BioWhittaker, Walkersville, MD, USA), preparato aggiungendo 1% di L-glutammina (Gibco, Invitrogen, Carlsband, CA, USA), 1% di penicillina/streptomina (MP Biomedicals, Verona, Italia), 1% di HEPES (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) e 10% di siero fetale bovino (FBS, Gibco, Invitrogen, Carlsband, CA, USA), precedentemente scomplementato a 56°C, per 30 minuti. Le cellule venivano seminate in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> o da 75 cm<sup>2</sup>, fino ad una densità massima di 500.000 cellule/ml, all'interno di un incubatore in presenza di CO<sub>2</sub> al 5% e ad una temperatura di 37°C.

La linea cellulare murina di leucemia acuta mielomonocitica WEHI-3B è stata coltivata *in vitro*, in terreno IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Lonza), addizionato con 1% di L-Glutammina, 1% di penicillina/streptomina, 1% di HEPES, 10% di FBS scomplementato. Le cellule venivano seminate in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> o da 75 cm<sup>2</sup>, fino ad una densità massima di 50.000 cellule/cm<sup>2</sup>, ed incubate a 37 °C in presenza di CO<sub>2</sub> al 5%. Entrambe le linee venivano splittate mediamente ogni 48 ore.

## **4.2. Cellule primarie**

Le cellule umane isolate da campioni primari di sangue periferico o midollare di pazienti con LAM o di donatori sani, impiegate nei differenti test funzionali, sono state coltivate in terreno RPMI completo addizionato di siero autologo (10%), separato dal sangue periferico mediante centrifugazione in apposite provette.

## **5. Trattamento con farmaci chemioterapici**

Per la caratterizzazione in vitro del processo di morte immunogenica, le cellule leucemiche primarie e delle linee cellulari (HL-60 e WEHI-3B) sono state sottoposte a trattamento con DNR (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Le cellule della linea HL-60 e i blasti da campioni primari sono stati seminati ad una concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/ml e trattati per 4 ore con DNR a tre concentrazioni diverse (100 ng/ml, 500 ng/ml e 1000 ng/ml) al fine di determinare la concentrazione in grado di indurre apoptosi, valutata 20 ore dopo il lavaggio del farmaco (24 ore totali). Per gli esperimenti successivi è stata scelta ed impiegata la dose di 500 ng/ml.

In alcuni esperimenti, le cellule sono state trattate con Ara-C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), per 4 ore, alle concentrazioni di 25  $\mu\text{g/ml}$ . Per costruzione della curva dose-risposta sono state impiegate tre concentrazioni: 2  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  e 25  $\mu\text{g/ml}$ .

## **6. Valutazione apoptosi**

L'induzione di apoptosi è stata valutata a 24 ore dal trattamento con il farmaco, mediante marcatura con Annexin V-FITC Apoptosis Detection Reagent (5X) (Abcam, Cambridge, UK). Le cellule erano raccolte (100.000 per condizione), lavate con PBS e marcate con Annexina V-FITC (1µl/10<sup>5</sup> cellule) per 10 minuti al buio e a temperatura ambiente, seguendo le istruzioni fornite dalla ditta. Le cellule non trattate costituivano il controllo negativo. Le analisi sono state effettuate al citofluorimetro BD Accuri C6 (BD Bioscience, CA).

## **7. Valutazione dell'espressione di CRT, HSP70 e HSP90 in citofluorimetria**

Su cellule sottoposte a trattamento con farmaco chemioterapico (e su cellule non trattate, per controllo) è stata valutata l'esposizione sulla superficie cellulare della calreticulina e delle heat shock protein, mediante citofluorimetria a flusso (FACS). Lo staining è stato effettuato su 100.000 cellule per ciascun marcatore della morte immunogenica. Le cellule sono state lavate con 2 ml di blocking solution (PBS/FBS 2% filtrata) e marcate nella blocking solution con i seguenti anticorpi primari:

- Anticorpo anti-Calreticulina [EPR3924] (Rabbit monoclonal; Abcam, Cambridge, UK) diluito in rapporto 1:100
- Anticorpo anti-HSP70 [EPR16892] (Rabbit monoclonal; Abcam, Cambridge, UK) diluito in rapporto 1:230

- Anticorpo anti-HSP90 [EPR16892] (Rabbit polyclonal; Abcam, Cambridge, UK) diluito in rapporto 1:250

Dopo incubazione per 30 minuti al buio a temperatura ambiente, le cellule sono state lavate con PBS freddo per due volte e successivamente marcate con anticorpo secondario Donkey anti-rabbit IgG-AlexaFluor 647 (Abcam, Cambridge, UK), diluito in rapporto 1:5000 nella blocking solution. Per controllo della corretta procedura di marcatura è stato impiegato il solo anticorpo secondario.

Al termine dell'incubazione con anticorpo secondario (30 minuti al buio, a temperatura ambiente), i campioni sono stati lavati per due volte con PBS freddo. Infine è stata effettuata una marcatura con Annexina V-FITC (1  $\mu$ l in 100  $\mu$ l di PBS, 10 minuti a temperatura ambiente; Abcam, Cambridge, UK) per valutare la percentuale di cellule apoptotiche. Le cellule sono state analizzate al citofluorimetro BD AccuriC6 (BD Biosciences).

## **8. Immunofluorescenza**

Per ciascuna condizione (cellule non trattate e trattate con DNR 500 ng/ml), 300.000 cellule risospese in 50  $\mu$ l di PBS sono state trasferite su vetrino portaoggetto mediante centrifugazione con Cytospin (Shandon Elliott) per 10 minuti a 500 rpm. I campioni sono stati fissati con paraformaldeide al 4% (diluita in PBS) per 10 minuti. Dopo 3 lavaggi con PBS freddo della durata di 5 minuti, è stata effettuata la marcatura. Le immagini dai vetrini sono state acquisite ed elaborate mediante microscopio Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss Microscopy-LLC, NY, United States). L'intensità di immunofluorescenza è stata misurata

mediante densitometria (Adobe Photoshop software 6.0) (n = 12 celle selezionate in modo casuale). I valori sono stati corretti per il numero di pixel per confrontare cellule di diverse dimensioni. Le cellule sono raggruppate in classi di intensità di fluorescenza (intensità di fluorescenza per pixel). [116]

#### ➤ **Espressione della Calreticulina sulla superficie cellulare**

I vetrini per la valutazione della calreticulina sono stati coperti, per saturare i siti aspecifici, con 80 µl di Blocking Solution (PBS/BSA 5%) e messi ad incubare per 30 minuti a temperatura ambiente. E' stata poi effettuata la marcatura con anticorpo primario anti-Calreticulina [EPR3924] (rabbit monoclonal; Abcam, Cambridge, UK) diluito in rapporto 1:100 in blocking solution (100 µl), per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi da 5 minuti in PBS freddo, i vetrini sono stati incubati con anticorpo secondario Chicken anti-Rabbit IgG FITC (Abnova, Taoyuan, Taiwan), diluito 1:500 in blocking solution, per 30 minuti al buio a temperatura ambiente. Sono stati eseguiti ancora 3 lavaggi in PBS freddo e incubazione con DAPI (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) alla concentrazione di 0,1 µg/ml per 7 minuti al buio, per la colorazione dei nuclei. Infine sono stati effettuati 2 lavaggi con PBS freddo al buio e i vetrini sono stati chiusi con 6 µl di Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA), mediante vetrino coprioggetto, fissato con smalto trasparente. Come controllo della fluorescenza è stata effettuata la marcatura con il solo anticorpo primario e con il solo anticorpo secondario.

### ➤ **Rilascio di HMGB1 dal nucleo al citoplasma**

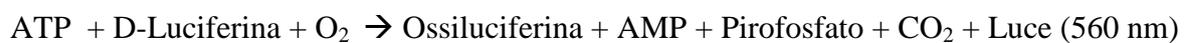
I vetrini per la valutazione del rilascio di HMGB1 dal nucleo sono stati lavati per 5 minuti con PBS-Tween 0,1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Le cellule sul vetrino portaoggetto sono state permeabilizzate con PBS-Triton 0,2% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) per 10 minuti. Dopo due lavaggi da 5 minuti con PBS-Tween 0,1%, le cellule sono state coperte con 80 µl di blocking solution (PBS-Tween 0,1% + BSA 1%, Sigma Aldrich) ed incubate per 30 minuti a temperatura ambiente. E' stata poi effettuata la marcatura con anticorpo primario anti-HMGB1 (rabbit polyclonal; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), diluito in rapporto 1:100 in blocking solution, per 30 minuti a temperatura ambiente.

Dopo tre lavaggi da 5 minuti in PBS-Tween 0,1% freddo, i vetrini sono stati incubati con anticorpo secondario chicken anti-Rabbit IgG FITC (Abnova, Taoyuan, Taiwan), diluito 1:500 in blocking solution, per 30 minuti al buio a temperatura ambiente. Sono stati eseguiti ancora 3 lavaggi in PBS freddo e la successiva colorazione dei nuclei con DAPI. Infine dopo 2 lavaggi con PBS-0,1% Tween freddo al buio, i vetrini portaoggetto sono stati chiusi col coprioggetto, utilizzando 6 µl di Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) e fissando con smalto trasparente.

## **9. Quantificazione di ATP nei surnatanti**

Per la quantificazione dell'ATP rilasciato nel surnatante, le cellule della linea HL-60 trattate con DNR (e Ara-C per confronto) e le cellule non trattate (controllo negativo) sono

state seminate in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto. Le cellule sono state seminate ad una densità di  $10^5$  cellule in 100  $\mu$ l di terreno RPMI completo per pozzetto. Dopo 24 ore dal trattamento, eseguito come riportato al paragrafo 5, è stato quantificato l'ATP rilasciato nel surnatante utilizzando il kit ENLITEN rLuciferase/Luciferin Reagent (Promega Italia, Milan, Italy). Il saggio è basato sulla reazione di bioluminescenza catalizzata dalla luciferasi ricombinante:



Quando l'ATP è il fattore limitante nella reazione della luciferasi, l'intensità di luce emessa è proporzionale alla concentrazione di ATP. L'intensità della luce emessa può essere misurata utilizzando un luminometro, che permetta una quantificazione diretta dell'ATP.

La misurazione, eseguita in triplicato per ciascun campione, è stata effettuata su 10  $\mu$ l di surnatante, che veniva aggiunto a 100  $\mu$ l di reagente rLuciferasi/Luciferina, in una eppendorf sterile. La misurazione della luminescenza è stata effettuata con un tempo di integrazione di 10 secondi. Il valore era restituito nell'unità di misura della luminescenza RLU (relative light units). Per determinare la concentrazione di ATP nei campioni, è stata costruita una curva standard con diluizioni seriali di ATP. La lettura dei campioni è stata eseguita sul luminometro a singolo tubo GloMax 20/20 (Promega Italia).

## 10. Saggio di valutazione della produzione di Interferon- $\gamma$

Il sangue periferico e midollare di 23 pazienti affetti da LAM, sottoposti a chemioterapia di induzione con antracicline, sono stati analizzati prima e dopo (nei giorni +7, +14, +21, +28) somministrazione del farmaco.

I linfociti T CD3<sup>+</sup> di ciascun paziente, isolati prima e dopo l'inizio della chemioterapia, sono stati messi in coltura con i blasti leucemici autologhi, isolati e criopreservati prima dell'inizio della terapia, e testati per la capacità di rispondere con la produzione di IFN- $\gamma$ , attraverso citofluorimetria.

Per ciascun paziente e ad ogni time point, in una piastra da 96 pozzetti, sono state allestite:

- una coltura di linfociti CD3<sup>+</sup> da soli, come controllo negativo;
- una coltura di linfociti CD3<sup>+</sup> e cellule CD19<sup>+</sup> autologhe in rapporto 1:10 (100.000 CD3<sup>+</sup> con 10.000 CD19<sup>+</sup>), come controllo per verificare che i CD3<sup>+</sup> non producessero IFN- $\gamma$  in risposta al self.
- una coltura di linfociti CD3<sup>+</sup> da soli in presenza degli immunostimolanti Ionomicina (500 ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e Phorbol-12-Myristate-13-Acetato (10 ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), come controllo positivo;
- la coltura d'interesse costituita da linfociti CD3<sup>+</sup> e blasti leucemici autologhi in rapporto 1:10 (100.000 CD3<sup>+</sup> con 10.000 blasti).

Dopo 4 ore di co-coltura, veniva aggiunta Brefeldina (2  $\mu$ g/ml, BD Biosciences), al fine di bloccare il trasporto proteico intracellulare. Dopo incubazione overnight, si procedeva con l'analisi citofluorimetrica della produzione di IFN- $\gamma$ . Le cellule erano lavate con PBS e

marcate per gli antigeni di superficie CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, con gli anticorpi monoclonali (mAbs) anti-human CD4 FITC (eBioscience, clone RPA-T4) e anti-human CD8 APC (eBioscience, clone RPA-T8) per 15 minuti al buio, a temperatura ambiente. Dopo lavaggio con PBS, le cellule erano fissate mediante incubazione con paraformaldeide (4% in PBS) per 10 minuti a temperatura ambiente, lavate ancora con PBS e permeabilizzate in Saponina 0,1% (Sigma-Aldrich). Dopo due lavaggi in Saponina, la marcatura intracellulare veniva effettuata in Saponina con mAb anti-human IFN- $\gamma$  PE (eBioscience, clone 4S.B3), per 30 minuti a 4°C.

Dopo aver lavato le cellule in PBS, i campioni erano analizzati al citofluorimetro BD Accuri C6 (BD Biosciences), mediante acquisizione di 10.000 eventi e impiegando i controlli isotipici anti-human IgG1 FITC, anti-human IgG1 APC, anti-human IgG1 PE (Mouse IgG1 K Isotype Control, eBioscience, clone P3.6.2.8.1).

## **11. Quantificazione dei linfociti T regolatori**

Per la quantificazione dei linfociti T regolatori circolanti nel sangue periferico dei pazienti sottoposti a chemioterapia è stato impiegato il kit *Human Regulatory T Cell Whole Blood Staining Kit* (eBioscience, San Diego, CA, USA), seguendo le istruzioni fornite dalla ditta. Per ogni campione è stata effettuata una marcatura di superficie, su 100  $\mu$ l di sangue periferico intero, impiegando gli anticorpi monoclonali anti-human-CD4<sup>+</sup> FITC (eBioscience, clone RPA-T4) e anti-human-CD25 APC (eBioscience, clone BC96). Dopo incubazione per 15 minuti al buio a temperatura ambiente, venivano aggiunti 2 ml di Lysis Buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA), per permettere la lisi dei globuli rossi (10

minuti al buio, a temperatura ambiente). Dopo due lavaggi successivi in 2 ml di Flow Cytometry Staining Buffer (FCSB, eBioscience, Dan Diego, CA, USA), le cellule erano fissate e permeabilizzate aggiungendo 1 ml di Fixation/Permeabilization Buffer working solution (eBioscience, San Diego, CA, USA) e incubando per 30 minuti al buio a 4 C°. Dopo lavaggio con FCSB, era eseguita la marcatura intracellulare per FOXP3 (anti-human FOXP3 PE, eBioscience, clone PCH101), a 4 C° per 30 minuti. Infine i campioni cellulari, risospesi in PBS, erano analizzati al citofluorimetro BD Accuri C6 (BD, Erembodegem, Belgio). Per ogni campione sono stati utilizzati i controlli isotipici per FITC, APC (Mouse IgG1 K Isotype Control, eBioscience, clone P3.6.2.8.1) e PE (Rat IgG2a K Isotype Control PE, eBioscience, clone eBR2a).

## **12. Caratterizzazione immunofenotipica di linfociti T CD8<sup>+</sup> da pazienti LAM dopo chemioterapia**

I linfociti T CD3<sup>+</sup>, purificati mediante separazione immunomagnetica, di due pazienti LAM che rispondevano alla chemioterapia con produzione di IFN- $\gamma$ , al giorno +14 o +21, sono stati meglio caratterizzati da un punto di vista fenotipico. In particolare è stata valutata l'espressione dei marcatori CCR7 e CD45RA per individuare le sub-popolazioni linfocitarie (naive, central memory, effector memory e effector memory esprimenti RA, EMRA) e l'espressione di molecole di attivazione/esaurimento, come Lag-3, CD28 e PD-1.

È stata effettuata una marcatura di superficie, per 20 minuti a T ambiente, utilizzando i seguenti anticorpi: anti-human CD8 (Pacific blue, clone RPA-T8 RUO, BD Pharmingen),

anti-CD45RA (ECD, clone 2H4LD11LDB9, Beckman Coulter) anti-human PD-1 (PerCP-eF710), clone eBioJ105, eBioscience), anti-CD38 (Alexa700, clone HIT2, eBioscience), Anti-Human LAG-3 (CD223, FITC, Clone: 3DS223H, eBioscience), anti-human CD28 (APC, Clone CD28.2 RUO, BD Pharmingen), Anti-Human CD3 (APC-eFluor® 780, Clone: UCHT1, eBioscience), Anti-Human CD197 (CCR7) (PE-Cyanine7, Clone: 3D12, eBioscience).

### **13. Catch e sorting dei linfociti T CD8<sup>+</sup> leucemia-specifici da pazienti**

#### **LAM dopo chemioterapia**

I linfociti T CD8<sup>+</sup> leucemia-specifici sono stati isolati mediante l'utilizzo di un kit per la cattura e l'arricchimento di cellule producenti IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . In breve dopo stimolazione o.n. a 37°C con blasti autologhi in rapporto 1:1, i linfociti sono stati raccolti, lavati in terreno di coltura freddo e marcati con IFN- $\gamma$  Catch reagent e TNF- $\alpha$  Catch reagent (Miltenyi) per 5 minuti in ghiaccio. Dopo l'aggiunta di terreno caldo sono stati incubati in agitazione per 45 minuti a 37°C per permettere la secrezione delle citochine. È stata infine effettuata la marcatura con IFN- $\gamma$  detection antibody (APC) e TNF- $\alpha$  detection antibody (APC), con gli anticorpi anti-human CD137 (4-1BB), anti-human CD8 e anticorpi anti-CD33 o anti-CD34 (per poter distinguere la popolazione blastica).

I linfociti CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>CD137<sup>+</sup> sono stati isolati mediante sorting, utilizzando lo strumento BD FACS Aria cell sorter (BD Biosciences). Dopo sorting i linfociti T CD8<sup>+</sup> leucemia-specifici purificati sono stati espansi in vitro su un feeder di MNCs irradiate di

due donatori sani ( $1 \times 10^6$  cellule/ml) in terreno RPMI completo contenente siero umano (8%), PHA (fitoemoagglutinina, 1  $\mu\text{g/ml}$ ) e interleuchina 2 (150 U/ml; R&D System, Minneapolis, MN), per 2/3 settimane fino ad ottenere un numero di cellule sufficienti per ulteriori analisi. Durante l'espansione l'IL-2 è stata aggiunta alla coltura ogni due giorni.

## **14. Caratterizzazione funzionale dei linfociti T CD8<sup>+</sup> isolati da pazienti LAM dopo chemioterapia**

I linfociti CD8<sup>+</sup> espansi sono stati caratterizzati funzionalmente, sia per la capacità di produrre molecole effettrici in risposta a blasti autologhi sia dal punto di vista dell'efficacia citotossica.

### **14.1. Produzione di citochine e molecole citolitiche**

I linfociti CD8<sup>+</sup> sono stati coltivati, in terreno RPMI completo addizionato con siero umano (8%), con i blasti autologhi in rapporto 1:1. Dopo 24 ore è stata valutata, tramite FACS, la produzione di molecole effettrici e citolitiche. Per la marcatura intracitoplasmatica, effettuata con paraformaldeide 4% e saponina 0,1%, sono stati impiegati i seguenti anticorpi: anti-human IFN- $\gamma$  PE-Cy7, clone 4S.B3 (eBioscience); Anti-Human TNF- $\alpha$  PerCP-Cy5.5, clone: MAb11 (eBioscience); anti-human Granzyme B Alexa Fluor® 647, clone GB11 (BD, Bioscience); anti-human Perforin FITC, clone dG9 (eBioscience).

## **14.2. Test di citotossicità**

Dopo 4 ore di co-coltura a diversi rapporti blasti:linfociti (1:1, 1:20, 1:100), mediante marcatura dei blasti (CD8<sup>-</sup>) tramite kit Annessina V/Propidio Ioduro (PI), è stata valutata la capacità citotossica dei linfociti CD8<sup>+</sup> ottenuti da paziente. Per confronto, gli stessi saggi funzionali sono stati condotti in parallelo in condizioni allogeniche, impiegando come cellule effettrici i linfociti T ottenuti da un altro paziente con la stessa procedura di cattura, sorting ed espansione e i linfociti T citotossici da donatore sano.

## **15. Generazione di monocyte-derived DCs a partire da monociti di donatori sani**

Le mo-DCs (monocyte-derived DCs), che per comodità chiameremo semplicemente DCs, sono state generate a partire da monociti (CD14<sup>+</sup>) di donatori sani. Le cellule CD14<sup>+</sup>, purificate mediante separazione immunomagnetica, sono state seminate ad una densità di  $1 \times 10^6$ /ml e coltivate per 5 giorni in terreno RPMI completo con 10% di siero autologo e citochine essenziali per il differenziamento, ossia GM-CSF 50 ng/ml (Fattore Stimolante la formazione di Colonie di Granulociti-Macrofagi, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) e IL-4 800 U/ml (Miltenyi, Germany).

## 16. Maturazione di mo-DCs

Le mo-DCs sono state maturate, dopo 5 giorni di differenziamento in presenza di GM-CSF e IL-4, mediante diversi stimoli maturativi:

- Co-coltura con HL-60 trattate con DNR 500 ng/ml (rapporto semina 1:2; DCs:HL-60)
- Co-coltura con HL-60 lisate mediante cicli ripetuti di congelamento-scongelo (rapporto semina 1:2)
- Co-coltura con HL-60 trattate con Ara-C 25 µg/ml (rapporto semina 1:2)

La maturazione delle DCs, mediante caricamento con cellule tumorali morenti, è stato effettuato per 24 ore, in presenza delle citochine GM-CSF (50 ng/ml) e IL-4 (800 U/ml). Lo stadio maturativo delle DCs ottenute è stato valutato mediante analisi citofluorimetrica dell'immunofenotipo.

Per ogni campione  $3 \times 10^5$  DCs sono state analizzate utilizzando i seguenti anticorpi per marcatori di superficie: Anti-Human CD14 FITC (clone HCD14, Biolegend), Anti-Human HLA-DR PE (BD Bioscience, clone L243), Anti-Human CD1a APC (Biolegend, clone HI149), Anti-Human CD80 PE (Biolegend, clone:2D10), Anti-Human CD83 PE (clone HB15e, Biolegend), Anti-Human CD86 FITC (clone 2331 (FUN-1), Pharmingen), Anti-Human CD40 FITC (Biolegend, clone: HB14) e Anti-Human CD197 PE (CCR7, clone: 3D12, eBioscience). E' stata effettuata la marcatura anche con i controlli isotipici corrispondenti (Mouse IgG1 K Isotype Control, eBioscience, clone P3.6.2.8.1 o Rat IgG2a K Isotype Control, eBioscience, clone: eBR2a).

Le cellule sono state raccolte e lavate in PBS. Al termine del lavaggio sono state incubate con gli anticorpi per 20 minuti al buio a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio in PBS, la lettura dei campioni è stata effettuata al citofluorimetro BD AccuriC6 (BD Biosciences), acquisendo 10.000 eventi per campione e selezionando la popolazione di DCs, mediante gating sulle cellule HLA-DR<sup>+</sup>.

In alcuni esperimenti, la maturazione delle cellule dendritiche è stata ottenuta mediante aggiunta di ATP (1 mM) in presenza o assenza dell'antagonista del recettore purinergico di membrana P2Y<sub>11</sub>, addizionato al mezzo di coltura 3 ore prima del trattamento. L'antagonista NF340 [4,4'-(Carbonylbis(imino-3,1-(4-methylphenylene)carbonylimino))bis(naphthalene-2,6-disulfonic acid tetrasodium salt)] (Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri) è stato impiegato ad una concentrazione di 10 µM.

## 17. Western Blot

Le cellule dendritiche sono state lavate per due volte con washing buffer (PBS/PMSF 1 mM) e lisate a 4°C per 30 minuti in Cell Lysis Buffer (10X) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), arricchito da inibitori delle proteasi, secondo le istruzioni d'uso del fornitore. Dopo recupero del surnatante mediante centrifugazione, le proteine in esso contenute sono state quantificate allo spettrofotometro (Bio-photometer - Eppendorf) secondo il metodo di Bradford, utilizzando il colorante Coomassie G-250 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). I campioni proteici (40 µg) sono stati diluiti in Laemmli 2X (Bio-Rad, Milan, Italy), contenente β-mercaptoetanololo al 5% (Biorad), prima di essere caricati su gel (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX Stain-Free<sup>™</sup> Precast, Biorad). È stato caricato

anche un marker di peso molecolare (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, Bio-Rad). La corsa è stata effettuata mediante il sistema elettroforetico fornito dalla ditta (Mini-PROTEAN 3 vertical electrophoresis, Biorad) in buffer Tris/Glicina/SDS 10x. Il blotting è stato eseguito su apposita membrana di nitrocellulosa mediante lo strumento Trans-Blot turbo (Biorad). L'espressione della proteina IDO1 nei campioni è stata verificata dopo incubazione della membrana overnight a 4°C con anticorpo anti-human IDO1 (rabbit, per gentile concessione del Dr. METZ, Lankenau Institute for Medical Research, Wynnewood, Pennsylvania), diluito 1:20.000 in blocking buffer (PBS/TWEEN 0.1% con 3% di latte e 2% di BSA) e successiva incubazione con anticorpo secondario (donkey anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology; sc-2313) diluito 1:20 000, per 1 ora a temperatura ambiente. Per controllo è stata effettuata anche la marcatura per l'actina, proteina espressa costitutivamente, per la quale sono stati impiegati i seguenti anticorpi: anticorpo anti-actina (goat, Santa Cruz Biotechnology; sc-1616; diluizione 1:5000) e anticorpo secondario donkey anti-goat (Santa Cruz Biotechnology; sc-2033; diluizione 1:20.000). L'immagine della membrana è stata acquisita allo strumento ChemiDoc (Biorad), dopo un'incubazione di 5 minuti con la soluzione di sviluppo (Amersham ECL Select WB Detection Reagent, GE Healthcare, Zipf, Austria).

## **18. Induzione di linfociti T regolatori**

Al fine di valutare se le mo-DCs esprimenti l'enzima IDO1, fossero in grado di indurre una popolazione di linfociti T regolatori, sono state messe in coltura in RPMI completo, addizionato di siero autologo (10%), con linfociti T allogenici ( $1 \times 10^6$ /ml) in rapporto 1:10

(DCs:linfociti), in presenza o in assenza dell'inibitore dell'enzima 1-MT-L 1 mM (1-metiltryptofano-L, Sigma-Aldrich). Dopo una co-coltura di 5 giorni, l'induzione dei Tregs è stata valutata mediante FACS.

In alcuni esperimenti i linfociti T regolatori sono stati purificati per l'utilizzo in saggi funzionali, mediante separazione immunomagnetica e selezione della popolazione CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim</sup> (Miltenyi, Germany).

### **18.1. Silenziamento di IDO1 mediante RNA interference**

L'induzione dei linfociti T regolatori è stata valutata anche a seguito del silenziamento di IDO1. In breve,  $2 \times 10^6$  DCs immature e  $2 \times 10^6$  DCs subito pulsate con blasti leucemici morenti per 24 ore sono state trasfettate, mediante nucleofezione, utilizzando il programma U02 del Nucleofector (Amaxa Biosystem, Cologne, Germany), seguendo le istruzioni del fornitore. Per la trasfezione è stato impiegato un siRNA specifico per IDO1 (250 nM) e un siRNA di controllo (250 nM). [117] Una miscela di quattro siRNA gene-specifici sono stati utilizzati per silenziare IDO1 (ON-TARGETplus SmartPool da Dharmacon, Lafayette, CO). Per IDO1, le sequenze bersaglio erano: 1) 5'-UCACCAAUCCACGAUCAU-3', 2) 5'-UUUCAGUGUUCUUCGCAUA-3', 3) 5'-GUAUGAAGGGUUCUGGGAA-3', 4) 5'-GAACGGGACACUUUGCUGAA-3'. Un pool di siRNA non-targeting (Dharmacon) è stato usato come controllo. Dopo incubazione o.n., le DCs sono state messe in coltura con i linfociti T allogenici per 48 ore, prima di effettuare l'analisi immunofenotipica (CD4/CD25/FOXP3).

## 19. Induzione della produzione di IFN- $\gamma$

Le DCs ottenute dai donatori sani sono state maturate, per 24 ore, mediante caricamento con cellule HL-60 (in rapporto 1:2; DCs:HL-60), in cui era stata indotta morte cellulare mediante:

- trattamento con DNR 500 ng/ml
- trattamento con Ara-C 25  $\mu$ g/ml.

Per indurre la produzione leucemia-specifica di IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti T CD3<sup>+</sup>, le DCs così caricate sono state messe in coltura con linfociti T autologhi in rapporto 1:10 (DCs:linfociti T). Durante la fase di priming sono stati aggiunti, a giorni alterni, 20 U/ml di IL-2. Dopo 8 giorni è stato eseguito un secondo ciclo di stimolazione aggiungendo alle colture altre DCs caricate (rapporto 1:10). Al termine dei due cicli di stimolazione, è stato allestito un saggio per la valutazione della produzione di IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti. Gli effettori erano rappresentati da:

- CD3 da soli;
- CD3 ottenuti dopo co-coltura con DCs caricate con HL-60 trattate con DNR;
- CD3 ottenuti dopo co-coltura con DCs caricate con HL-60 trattate con Ara-C.

Per ciascuna di queste condizioni i target erano rappresentati da:

- DCs caricate con lisato di HL-60, per valutare la specificità della risposta;
- DCs immature;
- DCs caricate con lisato di cellule di un'altra linea leucemica umana THP-1 (leucemia acuta monocitica, DSMZ no. ACC 16), come controllo negativo della specificità della risposta.

L'allestimento del saggio e l'analisi citofluorimetrica è stata eseguita come riportato al paragrafo 10.

## **20. Valutazione dell'attività immunosoppressiva dei Tregs**

Per valutare la capacità inibitoria della popolazione di linfociti Tregs indotta dalle DCs esprimenti l'enzima IDO1, generate in corso di morte immunogenica dei blasti, le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim/-</sup>, separate mediante biglie immunomagnetiche (Miltenyi), sono state aggiunte in un saggio di MLR (Mixed Leukocyte Reaction) allogena. I Tregs, ottenuti come descritto nel paragrafo 18, sono stati addizionati a linfociti T CD3<sup>+</sup> in rapporto 1:10 (Teff:Tregs) e tenuti in coltura per 5 giorni, in un saggio allestito per valutare la risposta immunitaria leucemia-specifica indotta da chemioterapia. In particolare, è stata valutata l'inibizione della produzione di IFN- $\gamma$  da parte dei CD3<sup>+</sup> effettori come al paragrafo 19.

## **21. Modello murino**

### **21.1. Colture cellulari e trasfezione**

La linea cellulare murina WEHI-3B è stata impiegata per l'allestimento degli esperimenti in vivo nel modello murino. Per ottenere cloni cellulari che esprimessero stabilmente la PmeLUC sulla membrana plasmatica, le cellule sono state trasfettate con il vettore pcDNA3.1 esprimente la luciferasi. [118] In breve, 6x10<sup>6</sup> cellule sono state risospese nel tampone di elettroporazione (Life Technologies) in presenza di 3 pg di DNA plasmidico ed

elettroporate mediante lo strumento Microporator MP-100 (bio Digital, Thermo Fisher), applicando un voltaggio di 1250 V per 40 millisecondi. Le linee cellulari trasfettate stabilmente sono state ottenute mediante selezione con neomicina/G418 solfato (0,2-0,8 mg/mL; Sigma) e successive diluizioni seriali.

### **21.2. Misura dell'ATP extracellulare in vitro mediante PmeLUC**

Le cellule WEHI-3B PmeLUC ( $2,5 \times 10^6$ ) sono state seminate in una piastra da 6 pozzetti e trattate con 100 ng/ml di DNR, 15  $\mu$ g/ml di Ara-C o PBS sterile. I livelli extracellulari di ATP, secreto dalle cellule a seguito del trattamento, sono stati quantificati mediante luminometro Lumina IVIS (PerkinElmer, Massachusetts). L'emissione di fotoni è stata monitorata a 24 e 48 ore, dopo aggiunta di 60 mg/ml di luciferina (Promega) ed è stata espressa come numero di fotoni per secondo. Tenendo conto che la sonda PmeLUC è espressa sulla superficie cellulare e che la sua attività dipende dal numero di cellule, i dati sono stati normalizzati sul numero di cellule per campo visivo 20x al microscopio (DMIL a LED, Leica Microsystems, GmbH), contate con l'aiuto del software ImageJ 1.42I (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD).

### **21.3. Generazione del tumore, imaging in vivo e somministrazione del farmaco**

Topi maschi BALB/cJ di 4-6 settimane, sono stati inoculati sottocute con  $2 \times 10^6$  cellule WEHI-3B PmeLUC. Il tumore è diventato evidente circa sette giorni dopo l'inoculo e da

quel momento è stato misurato con un calibro manuale; il volume è stato calcolato secondo la seguente equazione:  $\pi/6 [w1 (w2)^2]$ , dove w1 sta per diametro maggiore e w2 per diametro minore. L'attività della sonda PmeLUC è stata misurata ogni giorno dal giorno 7 al giorno 12 dopo l'inoculo mediante luminometro total body per piccoli animali (IVIS Lumina, Caliper, Perkin Elmer), come già descritto. [119] Nei topi anestetizzati con isofluorano 2,5% è stata iniettata intraperitoneo (i.p.) la D-luciferina 150 mg/kg (Promega) ed è stata misurata la luminescenza emessa dal dorso dell'animale. L'emissione di fotoni è stata quantificata come media di fotoni al secondo/cm<sup>2</sup>, utilizzando il software Living Image® (Perkin Elmer). I farmaci DNR (3 mg/kg, Sigma) e Ara-C (50 mg/kg, Sigma) o il PBS sterile sono stati somministrati due volte mediante iniezione i.p. ai giorni +7 e +9 dal momento dell'inoculo. I campioni di sangue sono stati raccolti dal seno retroorbitale dei topi in anestesia generale immediatamente prima di sacrificare l'animale (giorno 12 dall'inoculo). I tumori sono stati asportati e opportunamente trattati per consentire le analisi successive. Tutte le procedure sono state approvate dal Comitato Etico dell'Università di Ferrara, dove gli esperimenti sono stati condotti, e dal Ministero della Salute (direttiva 2010/63/UE e D.Lgs 26/2014).

#### **21.4. Valutazione delle citochine plasmatiche**

Il plasma dei topi è stato separato per centrifugazione dal sangue periferico prelevato (1000xg, 10 minuti a 4°C) e conservato a -80°C con il reagente Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (Thermo Scientific). I livelli di citochine sono

stati valutati mediante il kit per topo Ciraplex CK1 multi-cytokine assay (Aushon Biosystem, distribuito da Tema Ricerca), seguendo le istruzioni del produttore.

### **21.5. Analisi dell'infiltrato tumorale in immunoistochimica e in citofluorimetria**

Per l'immunoistochimica, pezzi di tumore sono stati inclusi nel composto OTC, congelati e conservati a -80°C. Le sezioni di 5 µm ottenute al criostato sono state fissate in acetone, bloccate in FCS 5% per 20 minuti e incubate per 1 ora con l'anticorpo mAb CD11b FITC (clone MI/70) (BD Biosciences). Come anticorpo secondario è stato usato l'anticorpo coniugato con perossidasi rabbit anti-FITC (DakoCytomation). L'antigene è stato rivelato con 3,3 diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) secondo le istruzioni del fornitore. Le sezioni sono state colorate con il colorante di contrasto ematossilina di Mayer, disidratate in alcool (etanolo 70%, 95% e 100%) e montate in soluzione di montaggio BDH (Merck Eurolabs). Tutte le immagini sono state catturate mediante microscopio e fotocamera digitale (DXM1200; Nikon).

Per l'analisi al FACS le masse tumorali sono state incubate collagenasi D (1 mg/mL, Roche) per 40 min a 37°C. La digestione enzimatica è stata bloccata con 2 mL di HBBS/5 mol/L EDTA e il tumore è stato ridotto ad una sospensione di singole cellule pipettando delicatamente con siringa e filtrando attraverso un filtro per cellule di 70 µm (Falcon, Becton Dickinson Labware Europe). Le cellule sono state marcate in HBSS+BSA 0,5% con anticorpi forniti dalla ditta BD Bioscience o eBioscience, nel caso dell'anticorpo anti-mouse IDO PerCP-eFluor710.

L'analisi è stata eseguita su  $10^4$  cellule vitali mediante citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson). I dati sono stati raccolti e analizzati utilizzando il software CellQuest.

## **22. Analisi statistica dei dati**

I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  SEM (*standard error mean*) dei valori ottenuti negli esperimenti. Le analisi statistiche, effettuate mediante il software di analisi dati GraphPad Prism6 (GraphPad Software, Inc., USA), sono il test *t di Student* e l'analisi di varianza ANOVA. Tutti i valori di  $p < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

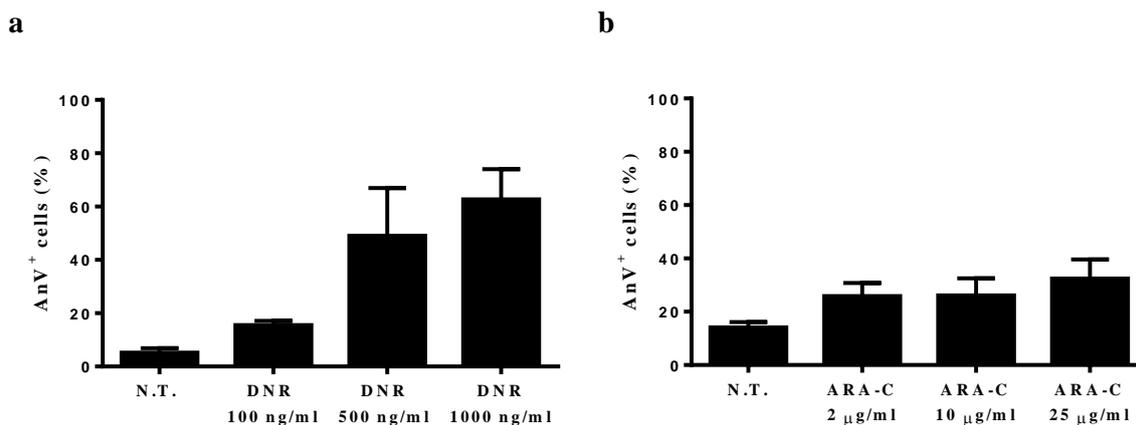
## *Risultati*

## **1. Daunorubicina e citarabina arabinoside inducono apoptosi nella linea cellulare HL-60**

Prima di poter valutare gli effetti del trattamento con il farmaco chemioterapico ad azione immunogenica, è stata verificata l'attività citotossica sulle cellule leucemiche, al fine di selezionare il tempo e la dose a cui esso risulta farmacologicamente attivo *in vitro*. Per indurre il processo di ICD è stata scelta la DNR, un inibitore della topoisomerasi II appartenente alla classe delle antracicline, impiegata anche *in vivo* per la cura delle LAM. Per costruire la curva dose-risposta è stata valutata l'apoptosi cellulare, mediante analisi citofluorimetrica della colorazione con Annessina V (AnV), dal momento che i fenomeni comunemente osservati in corso di ICD si verificano durante le fasi di apoptosi precoce e tardiva, quindi prima che venga persa l'integrità della cellula e l'espressione di superficie della fosfatidilserina (PS).

Le cellule della linea leucemica HL-60 sono state trattate per 4 ore con tre differenti concentrazioni di DNR (100 ng/ml, 500 ng/ml e 1000 ng/ml), dopo lavaggio del farmaco le cellule sono state rimesse in coltura e il processo apoptotico è stato valutato dopo 24 ore totali.

Come mostrato in Figura 1a, il farmaco è risultato parzialmente attivo con  $15,53 \pm 1,63\%$  di cellule apoptotiche AnV<sup>+</sup> (media  $\pm$  SEM) già alla dose di 100 ng/ml. Per gli esperimenti successivi è stata selezionata la dose di DNR 500 ng/ml con  $49,00 \pm 17,98\%$  di cellule apoptotiche, che si è rilevata ottimale per indurre gli eventi tipici della ICD *in vitro*.



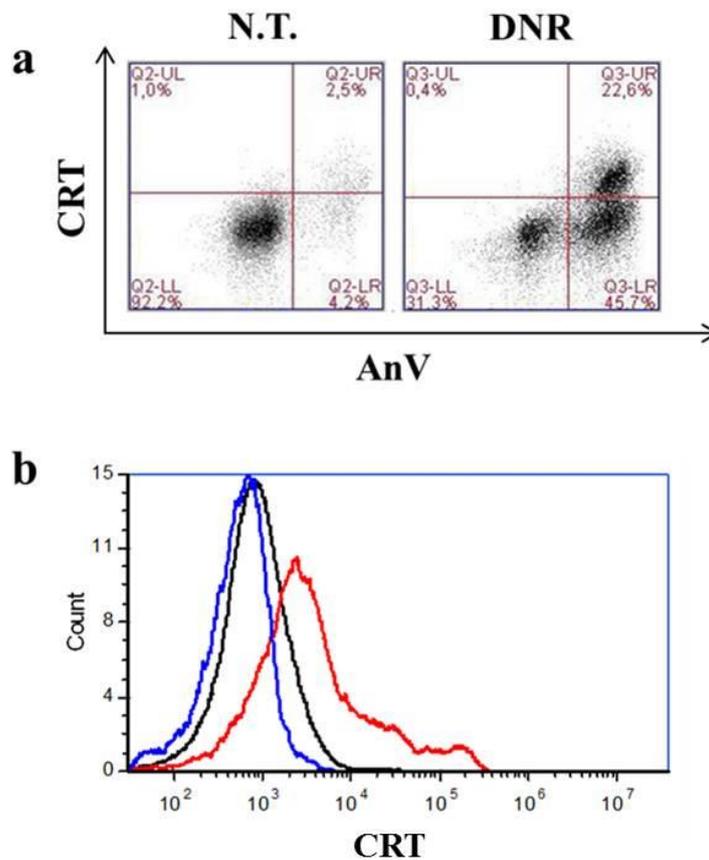
**Figura 1.** Sensibilità della linea cellulare HL-60 alla DNR e all'Ara-C. Le cellule sono state trattate per 4h. La percentuale di cellule apoptotiche (AnV<sup>+</sup>) è stata valutata attraverso FACS dopo 24 ore totali. Le cellule non trattate (N.T.) sono state utilizzate come controllo negativo. I valori rappresentano la media  $\pm$  SEM di 5 esperimenti indipendenti.

Una curva dose-risposta è stata costruita anche per il farmaco Ara-C, un antimetabolita non induttore di ICD, che è stato impiegato come trattamento di controllo in alcuni esperimenti successivi (Figura 1b). La dose selezionata, ossia 25  $\mu$ g/ml, è stata quella che permetteva il raggiungimento di livelli di apoptosi ( $32,44 \pm 7,19\%$  di cellule AnV<sup>+</sup>) simili a quelli indotti dalla dose selezionata per la DNR.

## **2. Traslocazione di calreticulina sulla membrana citoplasmatica in seguito al trattamento con daunorubicina**

La traslocazione della CRT dall'ER alla membrana citoplasmatica, in seguito a trattamento, è stata valutata sia mediante citofluorimetria a flusso che mediante immunofluorescenza. L'analisi della CRT, come quella di tutti gli altri indicatori di ICD, è stata effettuata dopo 24 ore dal trattamento con la DNR, alla dose selezionata di 500 ng/ml. La marcatura della CRT, secondo il metodo indiretto che prevede l'impiego di mAb

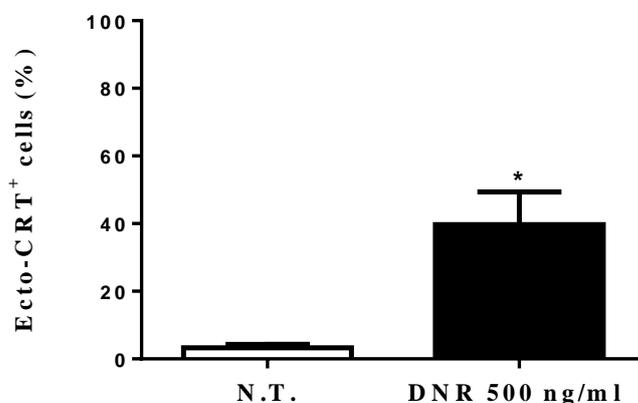
primario e mAb secondario, è stata accoppiata con marcatura mediante AnV, per essere certi di considerare nell'analisi solo le cellule apoptotiche. La figura 2, ricavata da un esperimento rappresentativo condotto sulle cellule della linea HL-60, mette in evidenza il marcato aumento dell'espressione superficiale di CRT in seguito a trattamento con DNR. Il valore percentuale delle cellule esprimenti la proteina passa da 4,68% nella condizione di controllo (non trattate; N.T.) al 22,14% nelle cellule sottoposte a trattamento farmacologico (DNR 500 ng/ml) (Figura 2a).



**Figura 2.** Espressione di CRT su cellule HL-60 attraverso FACS; **a.** Espressione di CRT in cellule AnV<sup>+</sup> non trattate (N.T.) e trattate con DNR 500 ng/ml, dopo 24 ore di trattamento; **b.** Fold change di espressione della CRT riportata come MIF (mean of fluorescence intensity) in cellule non trattate (blu) rispetto alle trattate con DNR (rosso). Il controllo dell'immunofluorescenza è rappresentato dal solo anticorpo secondario (control; nero). Esperimento rappresentativo.

Nella Figura 2b è riportato il fold change di espressione della CRT, espressa come MIF, tra le cellule HL-60 trattate con DNR e le HL-60 N.T.

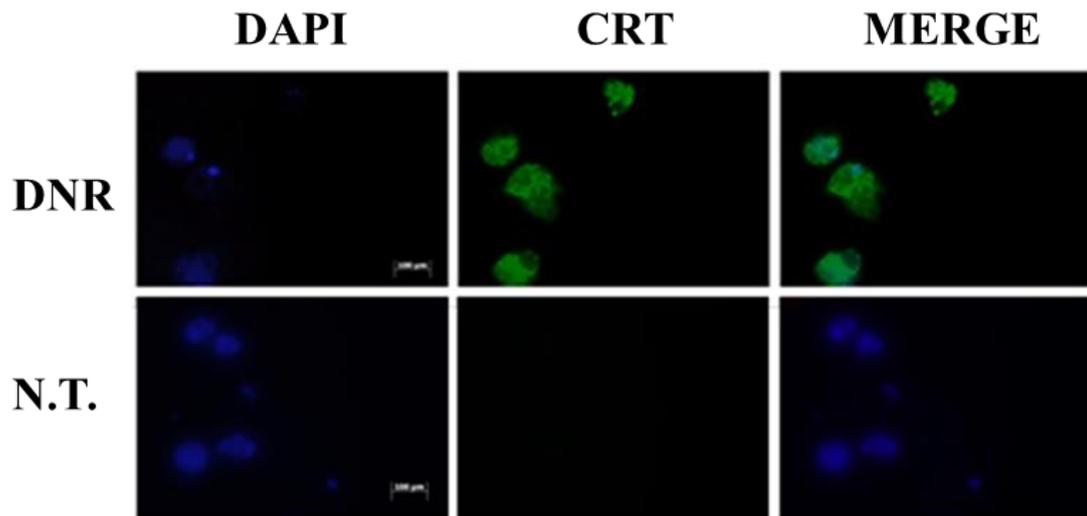
L'aumento di espressione della CRT sulla membrana citoplasmatica (ecto-CRT) dopo trattamento con DNR ( $39,70 \pm 9,7\%$  di cellule CRT<sup>+</sup>; media  $\pm$  SEM), rispetto alle cellule N.T ( $3,33 \pm 0,93\%$  di cellule CRT<sup>+</sup>), è risultato statisticamente significativo ( $p=0.02$ ) in esperimenti ripetuti (Figura 3).



**Figura 3.** Percentuale di cellule HL-60 esprimenti CRT sulla membrana plasmatica (ecto-CRT) nelle condizioni N.T. e trattate con DNR 500 ng/ml. I valori rappresentano la media  $\pm$  SEM di 3 esperimenti indipendenti. \*  $p<0,05$  .

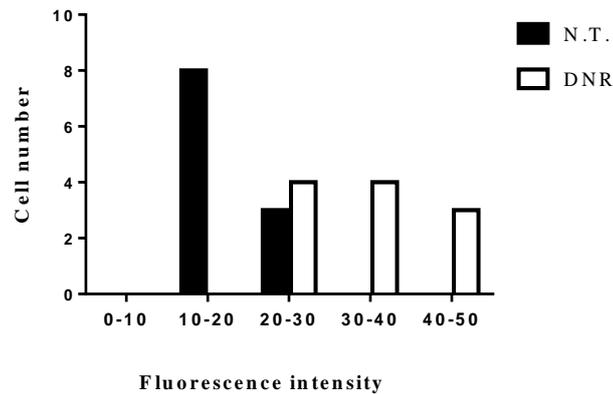
L'effetto della DNR sulla traslocazione della CRT sul lato esterno della membrana citoplasmatica è stata dimostrata anche mediante immunofluorescenza.

L'espressione della CRT riscontrata sulle cellule N.T. è minima o assente; al contrario, le cellule trattate con DNR esprimono elevati livelli della proteina, di cui appare visibile la localizzazione a livello del contorno superficiale della cellula (Figura 4).



**Figura 4.** Espressione di CRT su cellule HL-60 attraverso immunofluorescenza; Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza su cellule HL-60 trattate con DNR 500 ng/ml e N.T. dopo 24 ore dal trattamento. CRT marcata con FITC (verde), nuclei colorati con DAPI (blu).

Per confrontare l'espressione della CRT sulle cellule HL-60 trattate con DNR rispetto alle N.T., è stata misurata l'intensità di fluorescenza della CRT (FITC) emessa dalle cellule nel campo rappresentativo, per ogni condizione, mediante il software di elaborazione delle immagini Photoshop. L'analisi, che permette di dividere le cellule in classi di unità arbitrarie di fluorescenza, ha evidenziato un'intensità di fluorescenza maggiore nelle cellule trattate rispetto alle cellule N.T., che ricadono invece nelle classi di fluorescenza medio-bassa (Figura 5).

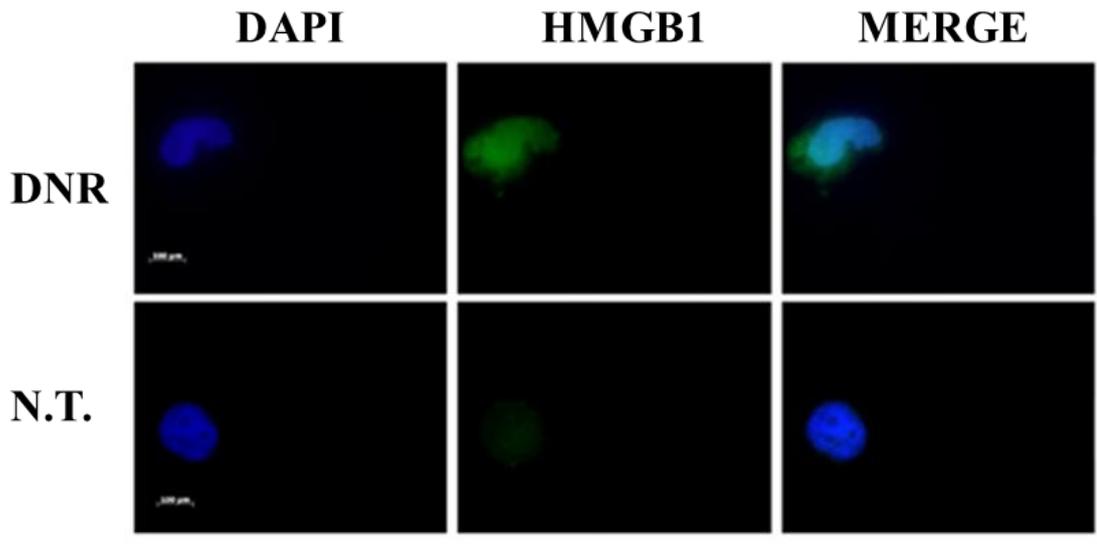


**Figura 5.** Analisi quantitativa dell'intensità di fluorescenza della CRT emessa al microscopio a fluorescenza da cellule HL-60 N.T. e trattate con DNR 500 ng/ml, dopo 24 ore.

### **3. Rilascio di HMGB1 dal nucleo al citoplasma in corso di morte immunogenica**

Mediante immunofluorescenza, si è tentato di visualizzare il rilascio di HMGB1 dal nucleo al citoplasma, prima del suo rilascio nel mezzo extracellulare.

Grazie alla colorazione dei nuclei con il colorante DAPI, nelle cellule HL-60 è stato possibile evidenziare l'evento di fuoriuscita della proteina e il suo riversamento nella porzione citoplasmatica circostante, verosimilmente in fase di apoptosi tardiva, dato l'aspetto morfologico delle cellule in cui è stata osservata (Figura 6).



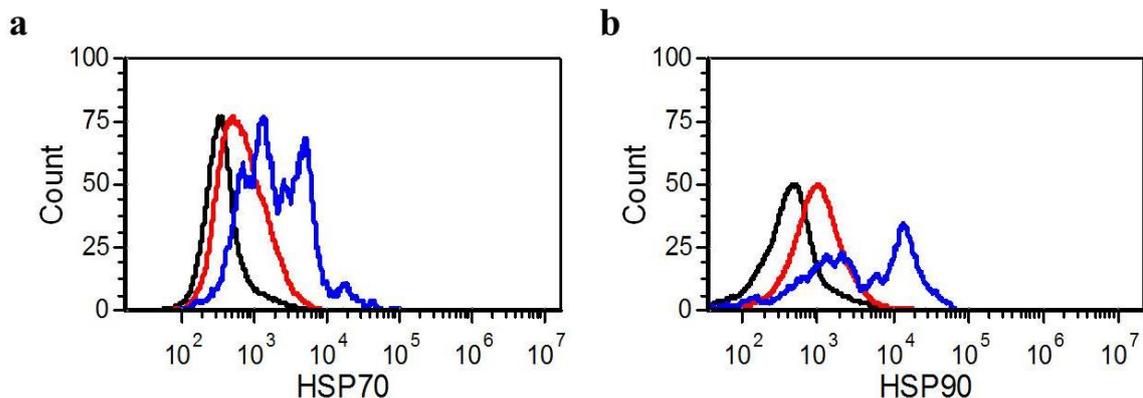
**Figura 6.** Rilascio di HMGB1 dal nucleo al citoplasma in cellule HL-60, attraverso immunofluorescenza; Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza su cellule HL-60 trattate con DNR 500 ng/ml e N.T., dopo 24 ore dal trattamento. HMGB1 in FITC (verde), nuclei colorati con DAPI (blu).

#### **4. Accumulo delle Heat Shock Protein sulla membrana plasmatica delle cellule morenti prima di essere rilasciate nel mezzo extracellulare**

La traslocazione delle HSP90 e HSP70 sulla membrana cellulare, un altro meccanismo indotto in corso di ICD, è stata valutata mediante citofluorimetria.

Nella Figura 7a sono riportati gli istogrammi, ottenuti in un esperimento rappresentativo, relativi all'espressione della HSP70 su HL-60 N.T. e HL-60 trattate con DNR (500 ng/ml). L'espressione di questa proteina chaperone, espressa basalmente nell'1 % delle cellule, è indotta fino al 13,7 % in seguito a trattamento con DNR. Nella Figura 7b sono riportati gli

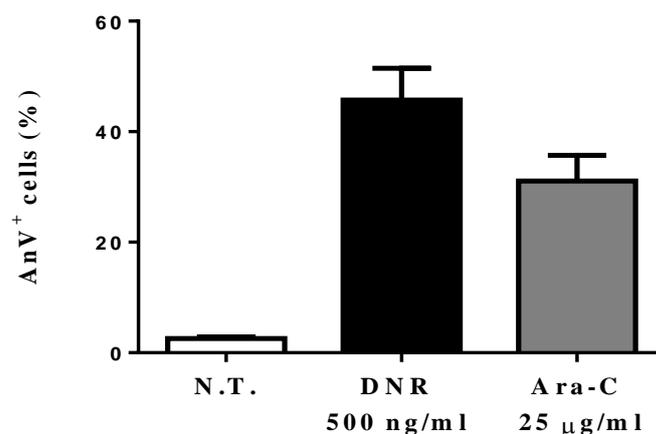
istogrammi relativi all'espressione della HSP90, che aumenta, passando dal 2,7 % nelle cellule N.T. al 40,4 % in seguito a trattamento con DNR.



**Figura 7.** Espressione delle heat shock proteins su cellule HL-60 attraverso FACS; **a.** Fold change di espressione della HSP70 e **b.** della HSP90, riportati come MIF (mean of fluorescence intensity) tra cellule N.T. (rosso) e cellule trattate con DNR 500 ng/ml (blu), dopo 24 ore dal trattamento. Controllo di immunofluorescenza rappresentato dal solo anticorpo secondario (control; nero). Esperimento rappresentativo.

## 5. L'ATP è attivamente secreto dalle cellule apoptotiche dopo trattamento con daunorubicina

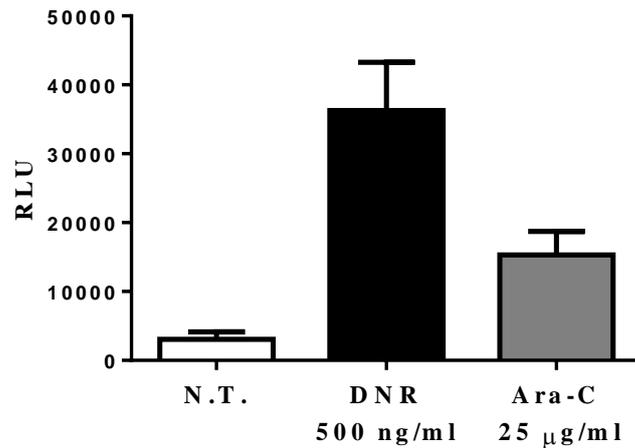
Le cellule HL-60 sono state esposte alla DNR e all'Ara-C, un farmaco chemioterapico non immunogenico, che ci ha permesso di fare una distinzione tra quello che è il rilascio attivo di ATP da parte delle cellule morenti che vanno incontro a ICD e l'ATP che può fuoriuscire passivamente dalla cellula in seguito a rottura della membrana plasmatica, per necrosi. Parallelamente al monitoraggio dell'apoptosi (Figura 8), abbiamo misurato la concentrazione di ATP extracellulare (eATP) dopo 24 ore dall'esposizione ai farmaci.



**Figura 8.** Apoptosi di cellule HL-60 N.T., trattate con DNR 500 ng/ml e Ara-C 25µg/ml, dopo 24 ore dal trattamento, espressa come percentuale di cellule positive per AnV<sup>+</sup>.

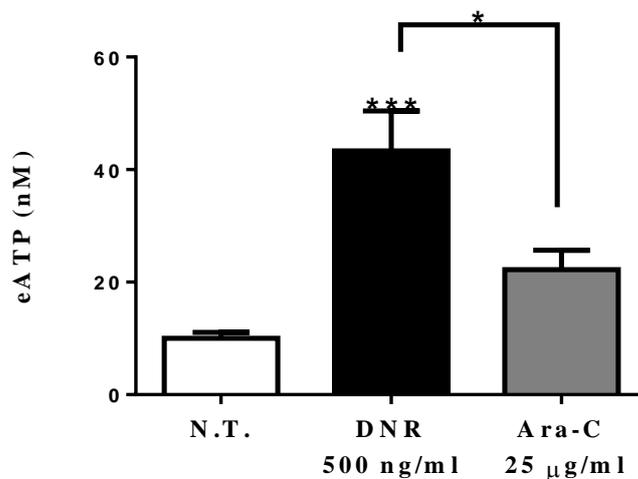
Mediante quantificazione del nucleotide nel surnatante delle colture, effettuata attraverso un saggio di bioluminescenza, abbiamo riscontrato che l'induzione di apoptosi da parte della DNR ( $45,74 \pm 5,74\%$  di cellule AnV<sup>+</sup>; media  $\pm$  SEM) è accompagnata da un accumulo di eATP nel mezzo extracellulare, dovuto ad una secrezione attiva da parte delle cellule morenti.

La Figura 9 mostra i valori di luminescenza ottenuti per i diversi trattamenti nell'unità di misura restituita dal luminometro, gli RLU (Relative Light Unit). Nella condizione di trattamento con DNR i valori di RLU emessi dal surnatante sono pari a  $36273,33 \pm 6990,58$ , nella condizione di trattamento con Ara-C (cellule apoptotiche pari a  $31,06 \pm 4,64\%$ ) gli RLU emessi sono dimezzati e pari a  $15294,60 \pm 3452,75$ .



**Figura 9.** Misurazione della luminescenza emessa dai surnatanti delle colture di HL-60 N.T e trattate con i due agenti chemioterapici, DNR e Ara-C, dopo 24 ore. I valori sono espressi nell'unità di misura RLU (Relative Light Unit). È rappresentata la media  $\pm$  SEM dei valori ottenuti in 4 esperimenti indipendenti. I valori ottenuti in ciascun esperimento derivano dalla media di triplicati. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Mediante la costruzione di una retta di taratura abbiamo ricavato le concentrazioni di eATP nel surnatante (Figura 10). A seguito del trattamento con DNR, la concentrazione di ATP nel surnatante risulta significativamente aumentata ( $42,6 \pm 7,9$  nM; media  $\pm$  SEM) rispetto alla condizione N.T. ( $9,5 \pm 1,15$  nM) ma anche rispetto alla condizione di trattamento con Ara-C ( $23,5 \pm 3,4$  nM); le stesse differenze sono visibili nel grafico in cui sono riportati gli RLU (Figura 9). Le cellule morenti sono ancora integre e i livelli di eATP nelle colture cellulari sottoposte ai due trattamenti citotossici non si eguagliano: nelle cellule HL-60 trattate con DNR la quantità di eATP è maggiore, a causa del fenomeno di rilascio attivo indotto in corso di ICD che, invece, non è presente nel caso di trattamento con Ara-C.

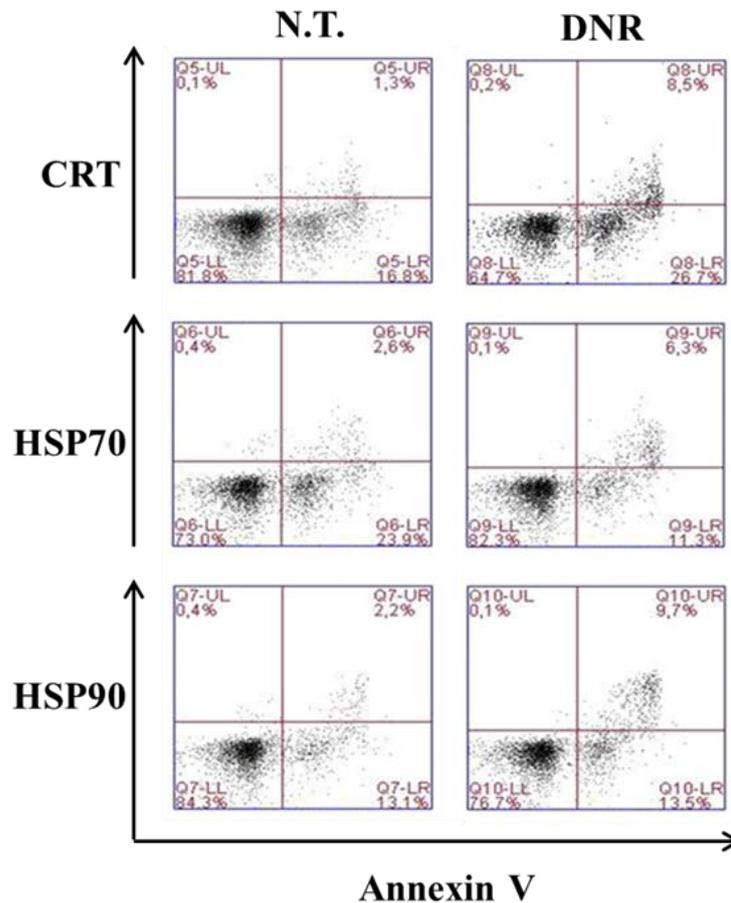


**Figura 10.** Concentrazione di eATP, rilasciato nei surnatanti da cellule HL-60 N.T e trattate con DNR e Ara-C. Le concentrazioni sono state ottenute mediante lettura di una curva standard di ATP. I valori rappresentati derivano dalle medie  $\pm$  SEM dei valori ottenuti in 4 esperimenti indipendenti. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 6. Le antracicline inducono morte cellulare immunogenica nei blasti primari di LAM

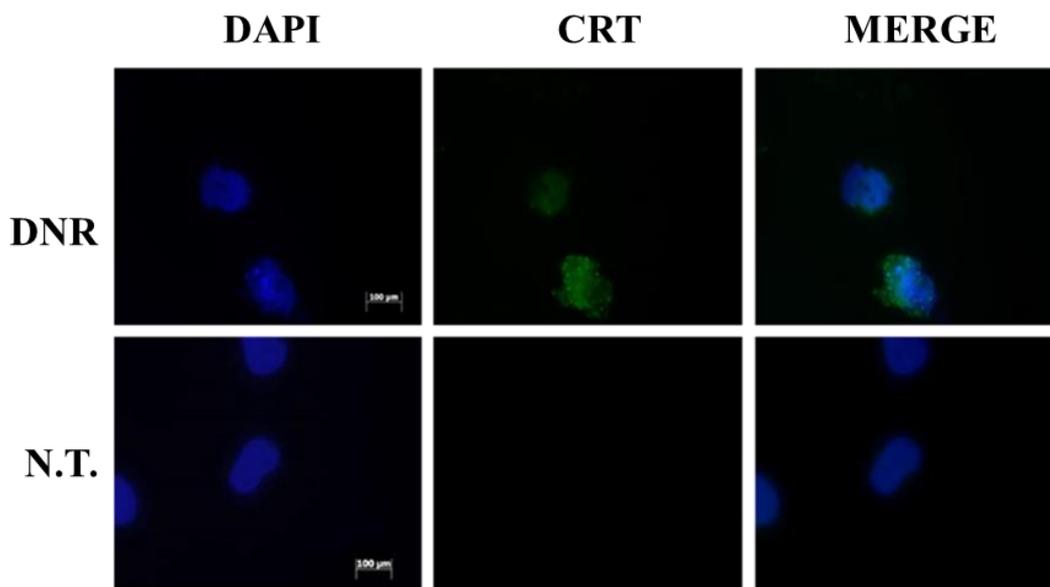
Gli stessi esperimenti allestiti per la valutazione dei principali marker di morte immunogenica sono stati eseguiti su campioni primari di cellule blastiche da pazienti LAM. Il trattamento con il farmaco chemioterapico è stato eseguito con le stesse modalità impiegate per le HL-60, e cioè per 4 ore ad una concentrazione di 500 ng/ml per la DNR e di 25 µg/ml per l'Ara-C. Tutte le analisi sono state effettuate dopo 24 ore. Data l'estrema variabilità biologica dei campioni impiegati, non è stato possibile elaborare insieme e fare un confronto tra i dati ottenuti nei diversi pazienti analizzati; dati che, tuttavia, hanno seguito un andamento coerente con quelli ottenuti nella linea cellulare. Per semplificazione

sono riportati grafici e foto che dimostrano l'induzione, da parte del farmaco, degli eventi tipici della ICD nei blasti leucemici di un paziente LAM rappresentativo.

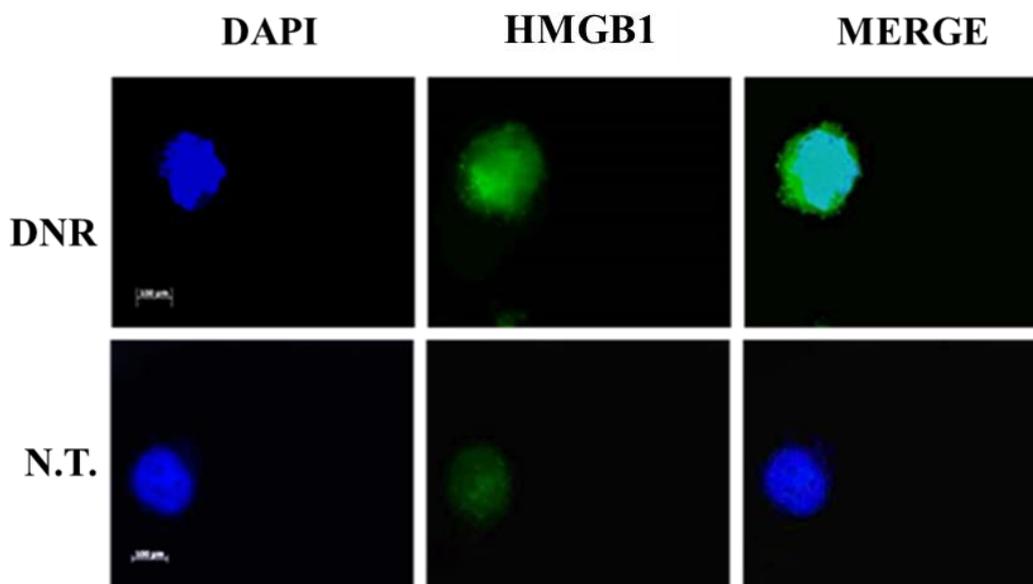


**Figura 11.** Analisi di espressione mediante FACS di CRT, HSP70, HSP90 su blasti leucemici primari di un paziente LAM rappresentativo. Le cellule sono state trattate per 4 ore con DNR 500 ng/ml e la valutazione è stata effettuata dopo 24 ore, su cellule AnV<sup>+</sup>.

Dopo trattamento con DNR, l'espressione superficiale di CRT passa dall'1,3% all'8,5%; l'espressione di HSP70 varia dal 2,6% nel N.T. al 6,3% nella condizione di trattamento con DNR; infine la HSP90 mostra un aumento percentuale nel campione trattato rispetto al controllo N.T. del 7,5% (Figura 11). Anche in immunofluorescenza l'esposizione della CRT sulla membrana citoplasmatica indotta da trattamento con DNR è confermata per i blasti primari (Figura 12).

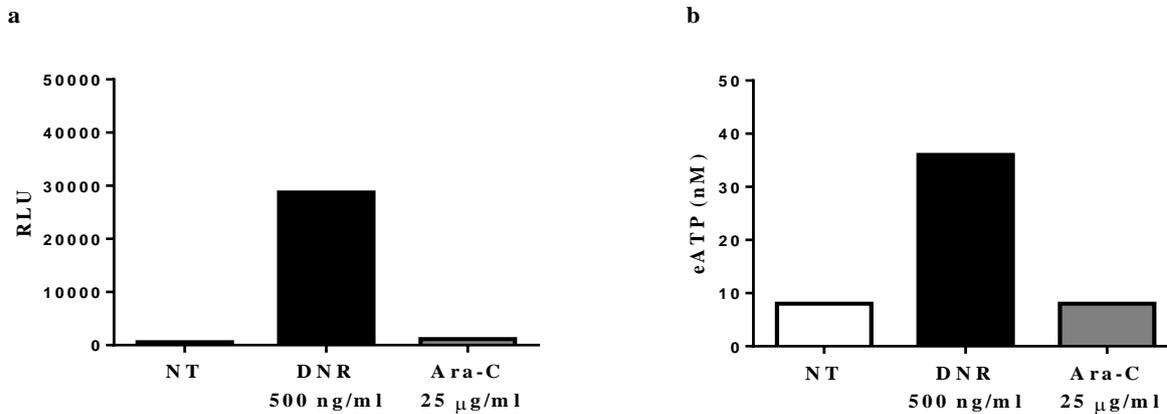


**Figura 12.** Espressione di CRT su blasti primari di LAM di un paziente rappresentativo, attraverso immunofluorescenza; Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza su blasti leucemici primari trattati con DNR 500 ng/ml e N.T., dopo 24 ore dal trattamento. CRT in FITC (verde), nuclei colorati con DAPI (blu).



**Figura 13.** Rilascio di HMGB1 dal nucleo al citoplasma in blasti primari di LAM di un paziente rappresentativo, attraverso immunofluorescenza; Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza su blasti leucemici primari trattati con DNR 500 ng/ml e N.T., dopo 24 ore dal trattamento. HMGB1 in FITC (verde), nuclei colorati con DAPI (blu).

Nella figura 13 è ben evidente la localizzazione extranucleare della proteina HMGB1 nel campione di blasti trattati mentre, nel campione di controllo, la fluorescenza emessa è meno brillante e localizzata all'interno del nucleo.



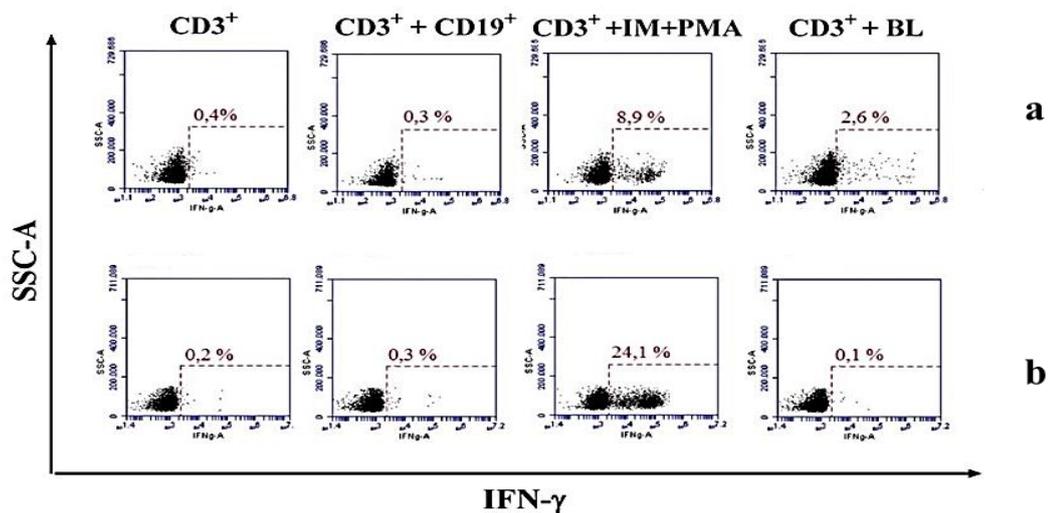
**Figura 14.** Rilascio di ATP nel surnatante da parte di blasti primari di un paziente LAM rappresentativo, N.T. e trattati con DNR (500 ng/ml) e Ara-C (25 µg/ml). **a.** RLU emessi dai surnatanti nelle diverse condizioni; **b.** concentrazione di eATP (nM) nei surnatanti nelle diverse condizioni. Valori ottenuti da medie di triplicati.

Anche i blasti leucemici primari, come le cellule della linea cellulare HL-60, secernono elevate quantità di ATP nel surnante in seguito a trattamento con DNR ( $28720 \pm 3634,1$  RLU;  $36 \pm 3,60$  nM); il trattamento con Ara-C, al contrario, non influenza questo fenomeno di secrezione pre-necrotico ( $1127 \pm 428,08$  RLU;  $8 \pm 0,58$  nM) (figura 14a e 14b).

## 7. La chemioterapia con antracicline induce una risposta immunitaria specifica contro il tumore

Gli effetti immunogenici della chemioterapia sono stati valutati *ex vivo* in pazienti affetti LAM sottoposti a chemioterapia d'induzione a base di DNR. Il sangue periferico e

midollare di 23 pazienti è stato analizzato prima e dopo somministrazione del farmaco (nei giorni 7, 14, 21, 28). In particolare è stata valutata la frequenza di cellule T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> che producevano IFN- $\gamma$ , come risultato di un'attivazione del sistema immunitario contro la leucemia, in corso di morte immunogenica indotta da chemioterapia. I linfociti T CD3<sup>+</sup>, isolati prima e dopo chemioterapia dal sangue periferico e messi in coltura con blasti leucemici autologhi, isolati inizialmente dal sangue midollare, sono stati testati per la capacità di produrre IFN- $\gamma$ . Sono stati considerati positivi alla produzione di IFN- $\gamma$ , nell'analisi al FACS, quei pazienti in cui i valori ottenuti erano pari o superiori al doppio di quelli riscontrati nei controlli negativi interni all'esperimento, rappresentati dalla coltura di linfociti CD3<sup>+</sup> da soli o da co-cultura di linfociti CD3<sup>+</sup> con linfociti CD19<sup>+</sup> autologhi. La Figura 15 mostra il confronto tra un paziente positivo (2,6 % di CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) e uno negativo (0,1 % di CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), con i rispettivi controlli negativi e positivi necessari per la valutazione dell'induzione della risposta immunologica.



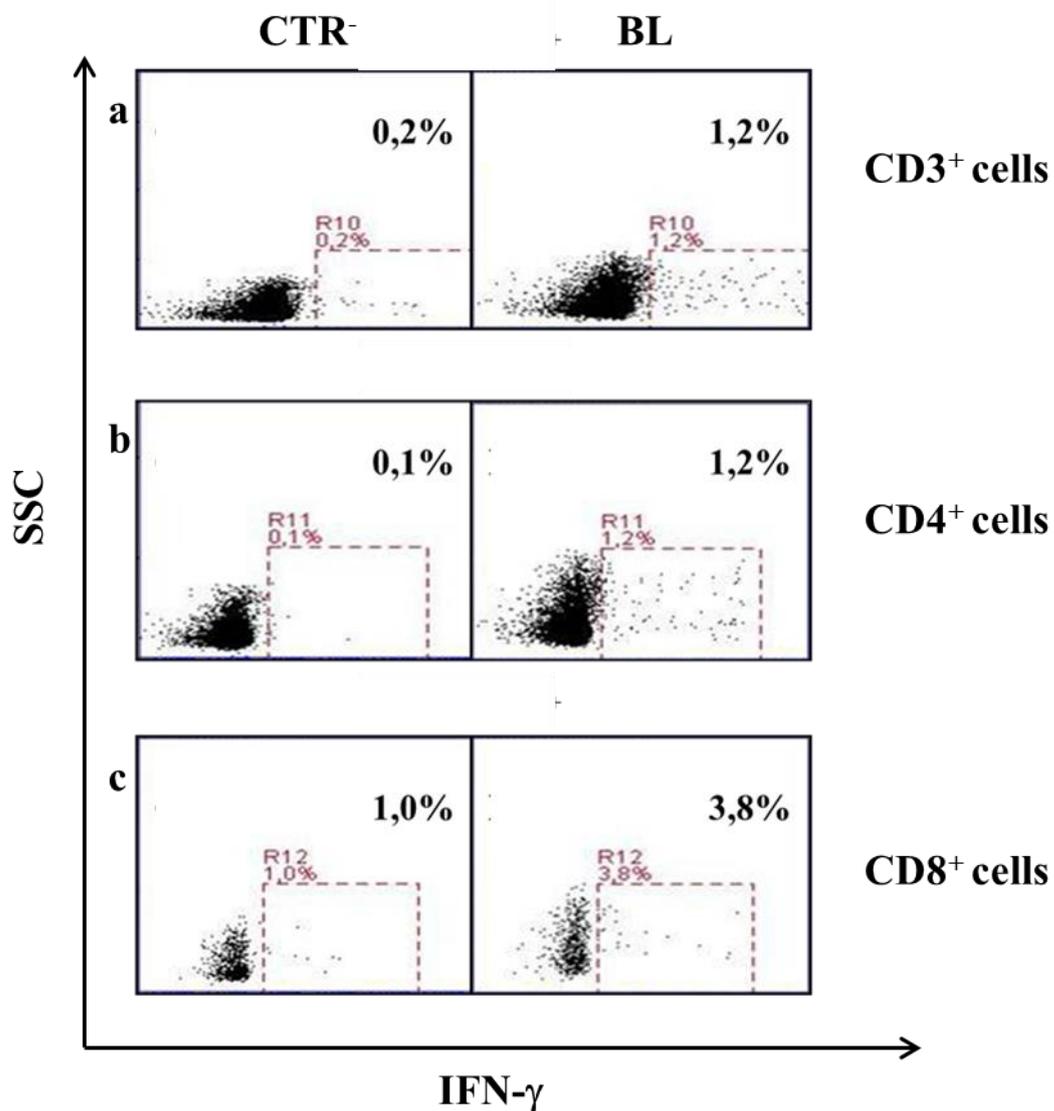
**Figura 15.** Produzione di IFN- $\gamma$  da parte di linfociti T CD3<sup>+</sup> ottenuti da due pazienti LAM al giorno +21 dopo chemioterapia, analizzata attraverso citofluorimetria. **a.** Paziente positivo per la produzione di IFN- $\gamma$ . **b.** Paziente negativo per la produzione di IFN- $\gamma$ . Controlli negativi: CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> + CD19<sup>+</sup>; controllo positivo: CD3<sup>+</sup> + IM+PMA. Esperimento rappresentativo.

La risposta immunologica, ossia una produzione di IFN- $\gamma$ , è stata riscontrata nel 65% dei pazienti (15/23), con una maggiore frequenza di rilascio della citochina nei giorni 14 e 21, a partire dal primo giorno di chemioterapia (Tabella 1).

patient	Day after chemotherapy				
	before chemotherapy	7	14	21	28
1	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	+
3	-	-	+	+	+
4	-	-	+	+	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	+	-	-
7	-	-	+	-	-
8	-	+	+	-	-
9	-	-	+	+	-
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	+	+	-	-
14	-	-	-	-	+
15	-	-	+	+	-
16	-	-	-	+	-
17	-	-	-	+	-
18	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-
20	-	+	-	-	-
21	-	+	-	-	-
22	-	-	-	-	-
23	-	-	+	-	-

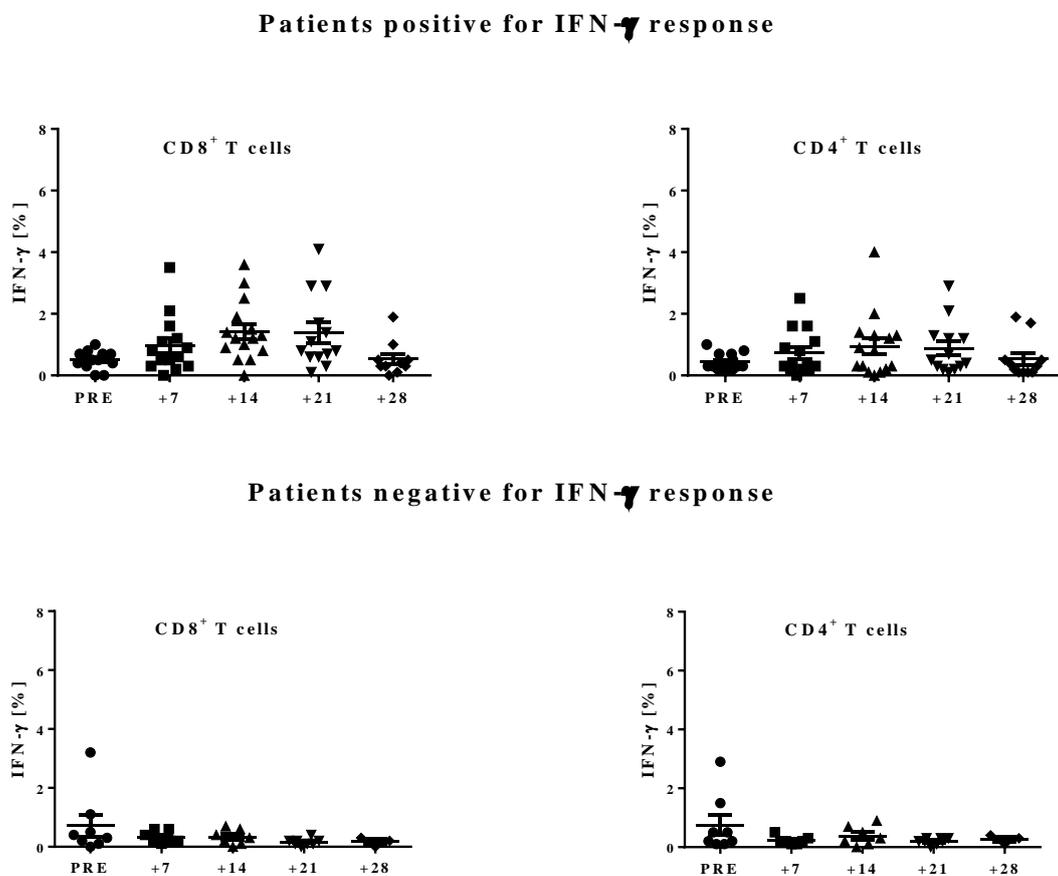
**Tabella 1.** Produzione di IFN- $\gamma$  valutata in 23 pazienti LAM nei giorni +7, +14, +21 e +28 dopo chemioterapia d'induzione a base di DNR.

Da una preliminare caratterizzazione fenotipica dei linfociti è emersa, nella maggior parte dei pazienti positivi, una frequenza moderatamente superiore di cellule IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> nella sottopopolazione dei linfociti CD8<sup>+</sup>. Nell'analisi di un paziente rappresentativo, mostrata in figura 16, si vede che il 3,8% dei linfociti CD8<sup>+</sup> producono IFN- $\gamma$  rispetto all'1,2% dei linfociti CD4<sup>+</sup> e all'1,2% dei linfociti CD3<sup>+</sup> totali.



**Figura 16.** Valutazione della produzione di IFN- $\gamma$  in risposta a blasti autologhi (BL) di un paziente al giorno +21 dopo chemioterapia, analisi citofluorimetrica. Produzione di IFN- $\gamma$  nei linfociti **a.** CD3<sup>+</sup> totali; **b.** CD4<sup>+</sup>; **c.** CD8<sup>+</sup>. Controllo negativo (CTR<sup>-</sup>) costituito da co-cultura di linfociti CD3<sup>+</sup> con CD19<sup>+</sup> autologhi;

Nella Figura 17 è riportata una suddivisione tra pazienti positivi (15/23) e pazienti negativi (8/23) alla risposta IFN- $\gamma$ . Nel gruppo dei pazienti positivi, sia nei linfociti CD4<sup>+</sup> che nei linfociti CD8<sup>+</sup>, la produzione di IFN- $\gamma$  aumenta dopo chemioterapia con prevalenza nei giorni 14 e 21, come effetto dell'attivazione del sistema immunitario indotta dal trattamento.

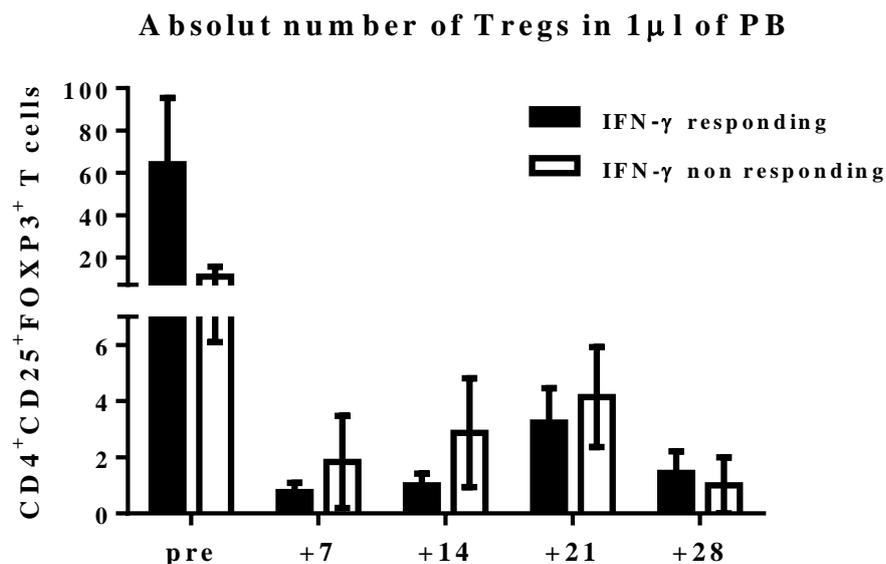


**Figura 17.** Distribuzione della produzione di IFN- $\gamma$  nei giorni successivi alla chemioterapia nei pazienti LAM. n=15 pazienti positivi per IFN- $\gamma$ ; n=8 pazienti negativi per IFN- $\gamma$ .

## 8. La chemioterapia induce nei pazienti l'espansione di una popolazione di linfociti T regolatori

Negli stessi giorni in cui è stata valutata la produzione di IFN- $\gamma$ , è stata monitorata la presenza di linfociti Tregs nel sangue periferico e gli effetti che la chemioterapia può avere nel modulare la frequenza di tale popolazione. I Tregs sono stati quantificati, mediante analisi citofluorimetrica, in base all'espressione dei marcatori di superficie CD4 e CD25 e del marcatore intranucleare FOXP3, per i quali i Tregs sono positivi.

Poiché l'analisi è stata effettuata su sangue intero, è stato possibile risalire al numero assoluto di Tregs circolanti per  $\mu\text{l}$  di sangue periferico (Figura 18).



**Figura 18.** Numero assoluto di linfociti Tregs per  $\mu\text{L}$  di sangue periferico rilevati in 23 pazienti LAM prima (pre) e dopo (giorni +7,+14,+21,+28) chemioterapia a base di DNR.

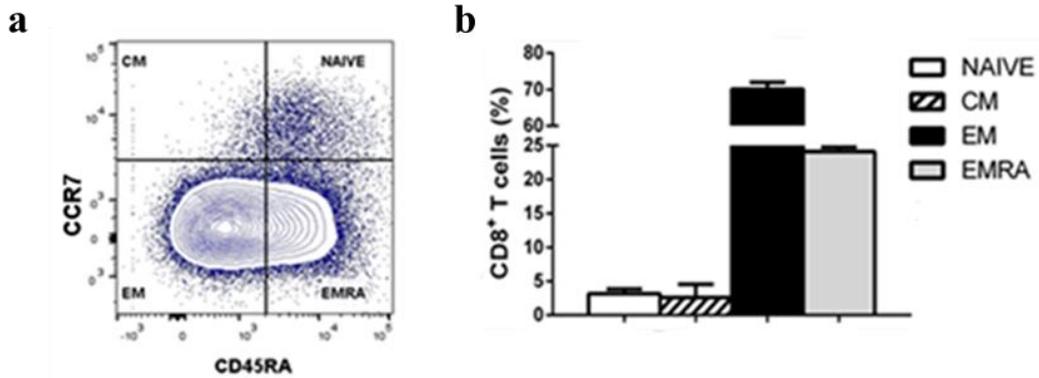
Sia nei pazienti che producevano IFN- $\gamma$  in risposta ai blasti autologhi, sia nei pazienti negativi abbiamo osservato, in particolare ai giorni +14 e +21, un fenomeno di espansione della popolazione di linfociti Tregs.

Anche questo effetto può essere il risultato delle proprietà immunomodulatorie della chemioterapia a base di antracicline che, parallelamente all'attivazione del sistema immunitario contro le cellule leucemiche, è anche responsabile dell'induzione di una popolazione di linfociti dotata di caratteristiche tollerogeniche. Questo dato è in linea con quanto pubblicato in un lavoro di Kanakry et al., in cui è ipotizzata una risposta immunologica generalizzata alla chemioterapia d'induzione nelle LAM, che si caratterizza per una rapida espansione di Tregs attivati ad azione soppressoria. [120]

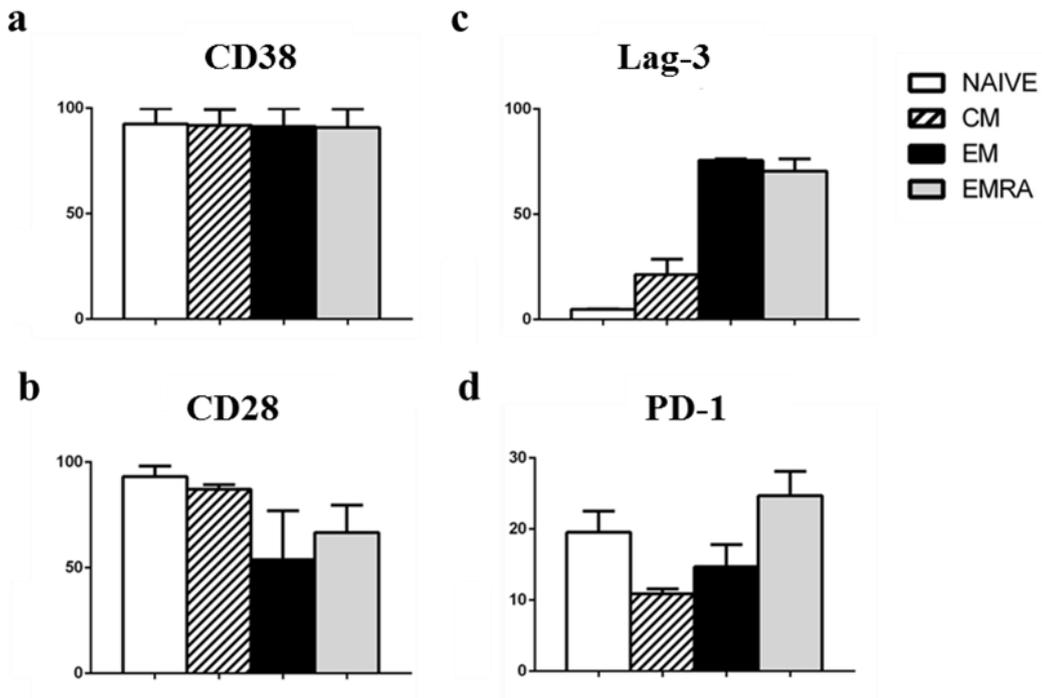
## **9. I linfociti T CD8<sup>+</sup> attivati e indotti dalla chemioterapia sono effettori citotossici leucemia-specifici e mostrano un fenotipo “exhausted”**

I linfociti T CD8<sup>+</sup> produttori IFN- $\gamma$  sono stati isolati dal sangue periferico di due pazienti dopo chemioterapia (giorno 21) e meglio caratterizzati sia da un punto di vista fenotipico che funzionale. Mediante lo studio di espressione delle molecole di superficie CCR7 e CD45RA, è stato possibile distinguere i 4 subset linfocitari: naive (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), central memory (CM; CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), effector memory (EM; CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) e effector memory esprimenti RA (TEMRA; CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) (Figura 19a). L'analisi immunofenotipica ha messo in evidenza la prevalenza dei subset EM con 70,10  $\pm$  1,90% di

espressione (media  $\pm$  SD) e TEMRA con  $24,10 \pm 0,70\%$ , mentre i subset naive e CM sono poco rappresentati ( $3,18 \pm 0,66\%$  e  $2,6 \pm 1,95\%$  rispettivamente) (Figura 19b).



**Figura 19.** Identificazione delle sottopopolazioni di linfociti CD8<sup>+</sup> di due pazienti LAM, positivi per la produzione di IFN- $\gamma$ , isolati nel giorno +21 dopo chemioterapia. **a.** analisi citofluorimetrica dell'espressione dei marcatori di superficie CCR7 e CD45RA. Dot plot rappresentativo. **b.** Distribuzione percentuale dei subset: naive, CM, EM ed EMRA. Medie  $\pm$  SD.

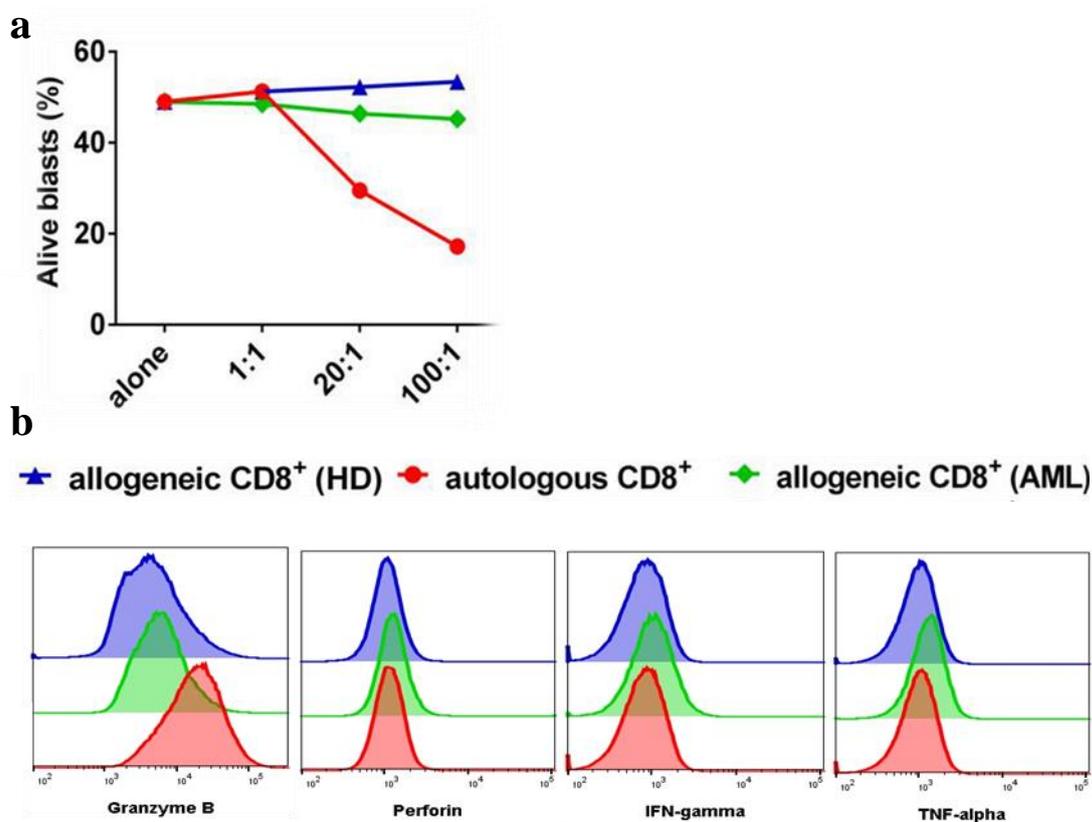


**Figura 20.** Analisi citofluorimetrica dell'espressione dei principali recettori co-stimolatori **a.** CD38 e co-inibitori **b.** CD28, **c.** Lag-3, **d.** PD-1, nei diversi subset di linfociti CD8<sup>+</sup>, isolati da due pazienti LAM al giorno +21 dopo chemioterapia. Medie  $\pm$  SD.

I due subset più rappresentati, EM e TEMRA, hanno le caratteristiche di CTL terminalmente differenziati che dovrebbero produrre maggiori quantità di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . [121] Esprimono altissimi livelli del marker di attivazione CD38 (rispettivamente  $91,35 \pm 8,45\%$  e  $90,90 \pm 8,80\%$ ) e, allo stesso tempo, mostrano una down-regolazione del CD28 (CD28<sup>+</sup> EM  $53,90 \pm 23,10\%$ ; CD28<sup>+</sup> EMRA  $66,65 \pm 13,05\%$ ) rispetto ai linfociti naive e CM ( $93,15 \pm 4,95\%$  e  $87,20 \pm 2,20\%$  rispettivamente) (Figura 20a e 20b). Questa molecola co-stimolatoria, fondamentale per l'interazione con le APC, è richiesta per la stimolazione del TCR e l'attivazione del linfocita ed è downregolata in seguito a contatto con l'antigene. E' stata valutata anche l'espressione di due marcatori di exhaustion delle cellule T, Lag-3 e PD-1 (Figura 20c e 20d). Più del 70% dei CTL EM e TEMRA esprimono la proteina Lag-3 ( $75,6 \pm 0,80\%$  e  $70,55 \pm 5,85\%$  rispettivamente), mentre per i naive e i CM le percentuali di espressione di Lag-3 rimangono sotto il 20% ( $4,86 \pm 0,21\%$  e  $21,30 \pm 7,30\%$ ). Anche la frequenza di cellule esprimenti PD-1 sembra essere aumentata nella popolazione effettrice di CD8 EMRA ( $24,7 \pm 3,40\%$ ) rispetto ai subset naive e CM ( $19,55 \pm 5,95\%$  e  $10,90 \pm 0,70\%$  rispettivamente). PD-1 e Lag-3 sono dei recettori co-inibitori che vengono up-regolati nei CTL in seguito all'incontro con l'antigene tumorale specifico e che, allo stesso tempo, limitano la risposta immunitaria, rappresentando per il tumore un meccanismo di evasione dalla sorveglianza immunologica.

I CD8<sup>+</sup> leucemia-specifici di entrambi i pazienti, che producevano IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  in risposta ad una breve stimolazione con blasti autologhi, sono stati isolati mediante sorting ed espansi al fine di poter effettuare una caratterizzazione funzionale mediante test di citotossicità e analisi della produzione di citochine. In un esperimento rappresentativo, i

linfociti T CD8<sup>+</sup> attivati hanno mantenuto una modesta attività citotossica antigene-specifica contro i blasti autologhi, seppure ad elevati rapporti CTL:blasti.



**Figura 21.** Analisi del potenziale citotossico contro blasti autologhi dei CTL attivati, isolati da un paziente LAM ed espansi. **a.** citotossicità valutata come % di blasti leucemici vivi, mediante analisi citofluorimetrica della marcatura AnV/PI. Il potenziale citotossico dei CTL del paziente in esame è stato confrontato con quello dei CTL di un altro paziente LAM (allogeneic CD8<sup>+</sup> AML) e di un donatore sano (allogeneic CD8<sup>+</sup> HD). I blasti sono stati messi in coltura con i CTL per 4 ore nei rapporti 1:1, 20:1, 100:1. **b.** Produzione di citochine da parte dei CTL del paziente in esame durante co-coltura di 24 ore con i blasti leucemici autologhi (rapporto 1:1).

Abbiamo osservato una lisi specifica pari al 20% quando i blasti sono stati incubati con CD8<sup>+</sup> autologhi ad un rapporto di 20:1 (CD8<sup>+</sup>:blasti) e del 40% ad un rapporto di 100:1, mentre non è stata riscontrata lisi dei blasti quando sono stati messi in coltura con i CD8<sup>+</sup> allogeneici da paziente o da donatore sano (rispettivamente 8% e 0%; Figura 21a).

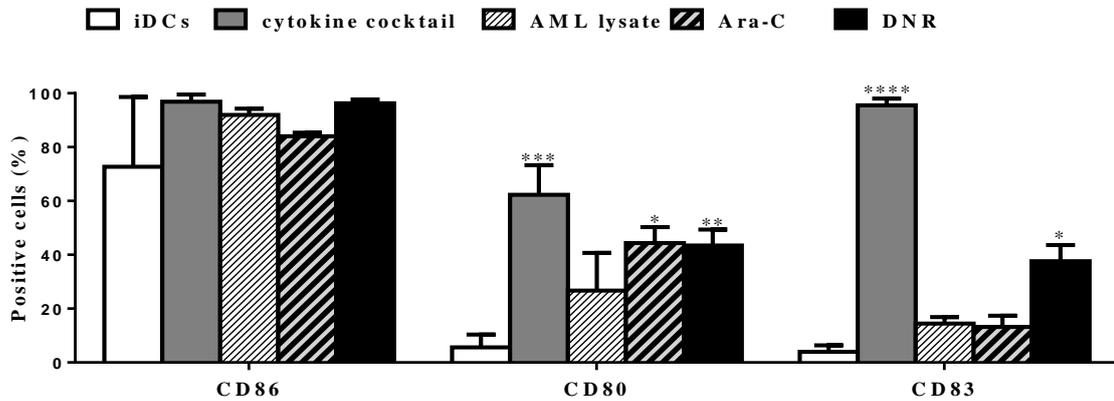
L'analisi al FACS della produzione di citochine in risposta ai blasti ha confermato, inoltre, l'attività citotossica dei CTL autologhi, che sembra essere legata ad un'aumentata produzione di Granzima B, espresso nel 73% dei CTL autologhi rispetto al 28,9% dell'altro paziente LAM e al 18,8% del donatore sano. Al contrario Perforina, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  non sembrano essere modulate durante la risposta citotossica (Figura 21b).

## **10. La morte immunogenica delle cellule tumorali migliora l'uptake antigenico e la maturazione delle cellule dendritiche**

I DAMPs, precedentemente descritti e valutati *in vitro*, indotti nelle cellule morenti durante ICD, dovrebbero determinare la maturazione delle DCs con cui vengono a contatto. Per verificare questo fenomeno sono stati eseguiti esperimenti funzionali a partire da cellule dendritiche immature (iDCs), differenziate da monociti CD14<sup>+</sup> di donatori sani, che sono state messe in coltura con HL-60 trattate con DNR, per consentirne la maturazione. La maturazione è stata valutata, dopo 24 ore di co-coltura, mediante analisi fenotipica al FACS dei marcatori di superficie HLA-DR, CD1a, CD83, CD86, CD80, CD40 e CCR7. Sono stati eseguiti 4 esperimenti indipendenti, in cui il controllo positivo era rappresentato dalle DCs maturate con un cocktail di citochine e il controllo negativo da iDCs.

Le DCs pulstate con HL-60 trattate con DNR mostrano livelli significativamente più elevati di espressione delle molecole co-stimolatorie di superficie rispetto alle iDCs. L'espressione del CD86 passa dal 72,70  $\pm$  25,90% delle iDCs al 96,33  $\pm$  1,40% delle DCs caricate con HL-60 trattate con DNR, l'espressione del CD80 aumenta da 5,60%  $\pm$  4,80 delle iDCs al

43,45%  $\pm$  5,95, infine il CD83 viene upregolato da 3,95%  $\pm$  2,45 a 37,63%  $\pm$  5,99 (media  $\pm$  SEM) (Figura 22).



**Figura 22.** Immunofenotipo delle DCs in presenza dei diversi stimoli maturativi. Le iDCs e le DCs maturate con cocktail di citochine (IL-1 $\beta$  10 ng/ml, TNF- $\alpha$  10 ng/ml e IL-6 10 ng/ml) rappresentano rispettivamente il controllo negativo e il controllo positivo della maturazione. Le DCs sono state caricate per 24 ore con lisato di HL-60 (AML lysate), HL-60 trattate con Ara-C 25  $\mu$ g/ml (Ara-C) o HL-60 trattate con DNR 500 ng/ml (DNR), prima dell'analisi al FACS. I valori derivano dalla medie di 4 esperimenti  $\pm$  SEM, . \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001 vs iDCs (ANOVA).

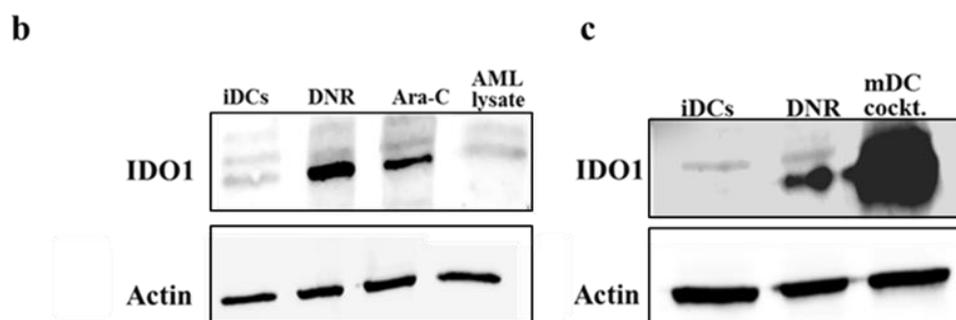
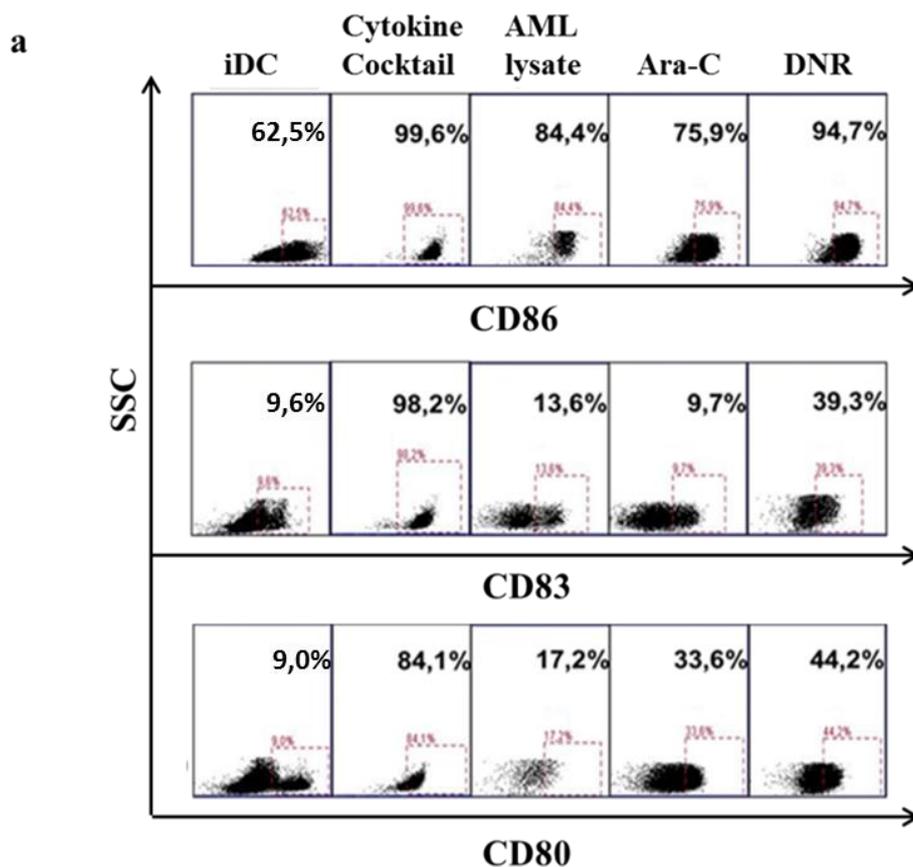
La ICD indotta dalle antracicline determina un efficiente pulsing degli antigeni tumorali e costituisce un forte stimolo maturativo per le DCs.

## **11. Le cellule dendritiche mature caricate con antigeni tumorali mediante morte immunogenica esprimono elevati livelli dell'enzima ad azione immunoregolatoria IDO1**

Nelle DCs maturate come descritto sopra (par. 10) è stata valutata l'espressione dell'enzima tollerogenico IDO1. A fronte di un maggior grado di maturazione rispetto alle iDCs e alle DCs maturate con lisato cellulare o in presenza di cellule uccise con Ara-C, nelle DCs caricate e maturate con HL-60 trattate con DNR, in corso di morte immunogenica, è stata osservata anche una maggiore espressione dell'enzima immunoregolatore IDO1 (Figura 23a e 23b).

La quantità di proteina IDO1 riscontrata nelle DCs pulsate con HL-60 uccise con DNR è maggiore sia rispetto a quella riscontrata nella condizione di pulsing con HL-60 trattate con Ara-C sia rispetto a quella riscontrata nella condizione di pulsing con lisato di HL-60 (ottenuto mediante cicli di congelamento/scongelamento).

La figura 23c mostra il confronto con due controlli, ossia iDCs che hanno una bassa espressione della proteina e DCs maturate con il cocktail citochinico di maturazione (vedi sopra, par.10), che esprimono livelli molto elevati della proteina. La quantità di proteina rilevata nelle DCs caricate in corso di ICD (trattamento con DNR) si pone ad un livello intermedio tra le due condizioni.



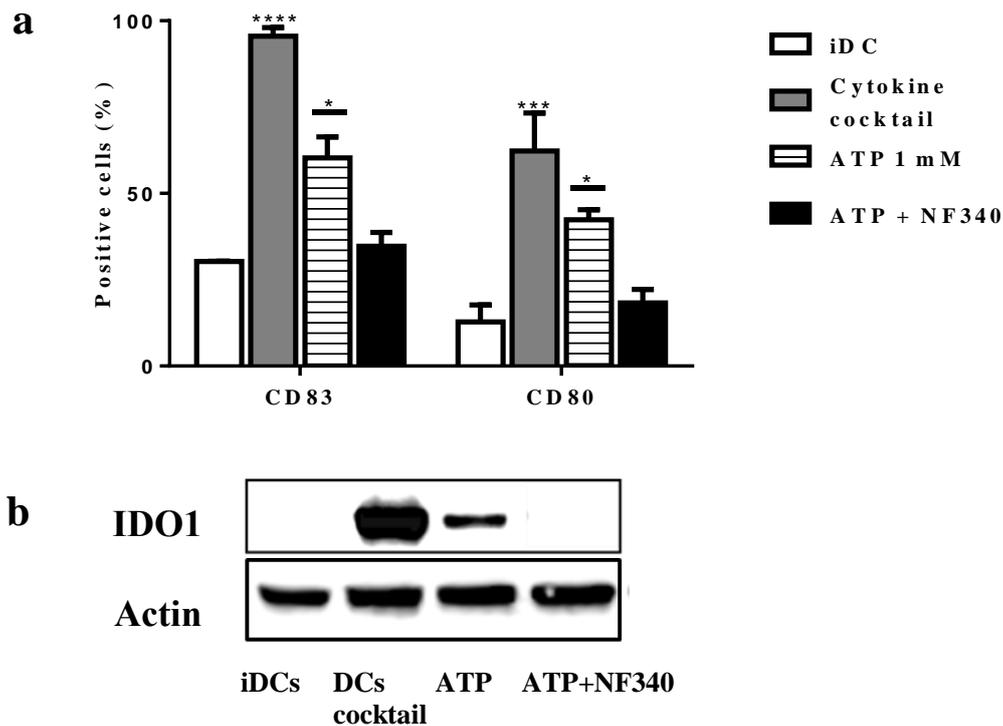
**Figura 23.** Immunofenotipo delle DCs dopo interazione per 24 ore con HL-60 trattate con DNR, Ara-C o lisate, e modulazione dell'espressione di IDO1. **a.** Confronto tra i diversi stimoli maturativi nell'analisi citofluorimetrica dei marcatori CD83, CD86 e CD80. iDCs e DCs maturate con cocktail di citochine rappresentano rispettivamente il controllo negativo e positivo nella valutazione dello stadio maturativo. Esperimento rappresentativo. **b.** Espressione della proteina IDO1 attraverso western blot nelle DCs caricate e maturate con HL-60 trattate con DNR (500 ng/ml), Ara-C (25µg/ml) e lisate. **c.** Confronto dell'espressione proteica di IDO1 in iDCs, DCs caricate con HL-60 trattate con DNR e DCs maturate con cocktail di citochine.

## **12. L'ATP induce la maturazione delle cellule dendritiche e l'espressione di IDO1 tramite il recettore purinergico P2Y11**

È possibile che l'espressione di IDO1 nelle DCs sia in parte sostenuta dalle piccole quantità di ATP rilasciate nel tempo dalle cellule tumorali morenti in corso di ICD. È già stato dimostrato che i recettori purinergici P2Y11 presenti sulle DCs sono responsabili del loro differenziamento e della loro migrazione nei siti d'infiammazione. [64] [66] Al fine di valutare gli effetti dell'ATP mediati dal P2Y11 sull'espressione di IDO1, sono stati condotti degli esperimenti in cui il nucleotide purinergico ATP è stato aggiunto alle iDCs in coltura, in presenza o in assenza dell'antagonista del recettore P2Y11, NF340.

L'ATP aggiunto ha determinato l'upregolazione delle molecole co-stimolatorie CD83 e CD80. Come atteso, la parziale maturazione delle DCs, mediata dall'ATP aggiunto in coltura, è inibita in presenza dell'antagonista del P2Y11 (Figura 24a).

Il risultato interessante ottenuto è che lo stesso recettore media l'espressione di IDO1, nelle DCs stimulate mediante aggiunta di ATP. La figura 24b mostra la proteina IDO1 presente nel lisato proteico delle DCs maturate per 24 ore in presenza di ATP e l'assenza della proteina nella condizione in cui è stato aggiunto l'antagonista NF340. Per controllo sono state inserite le condizioni di iDCs, che esprimono bassi livelli di IDO1 e DCs maturate per 24 ore con cocktail di citochine di maturazione, che esprimono elevati livelli della proteina (Figura 24b).



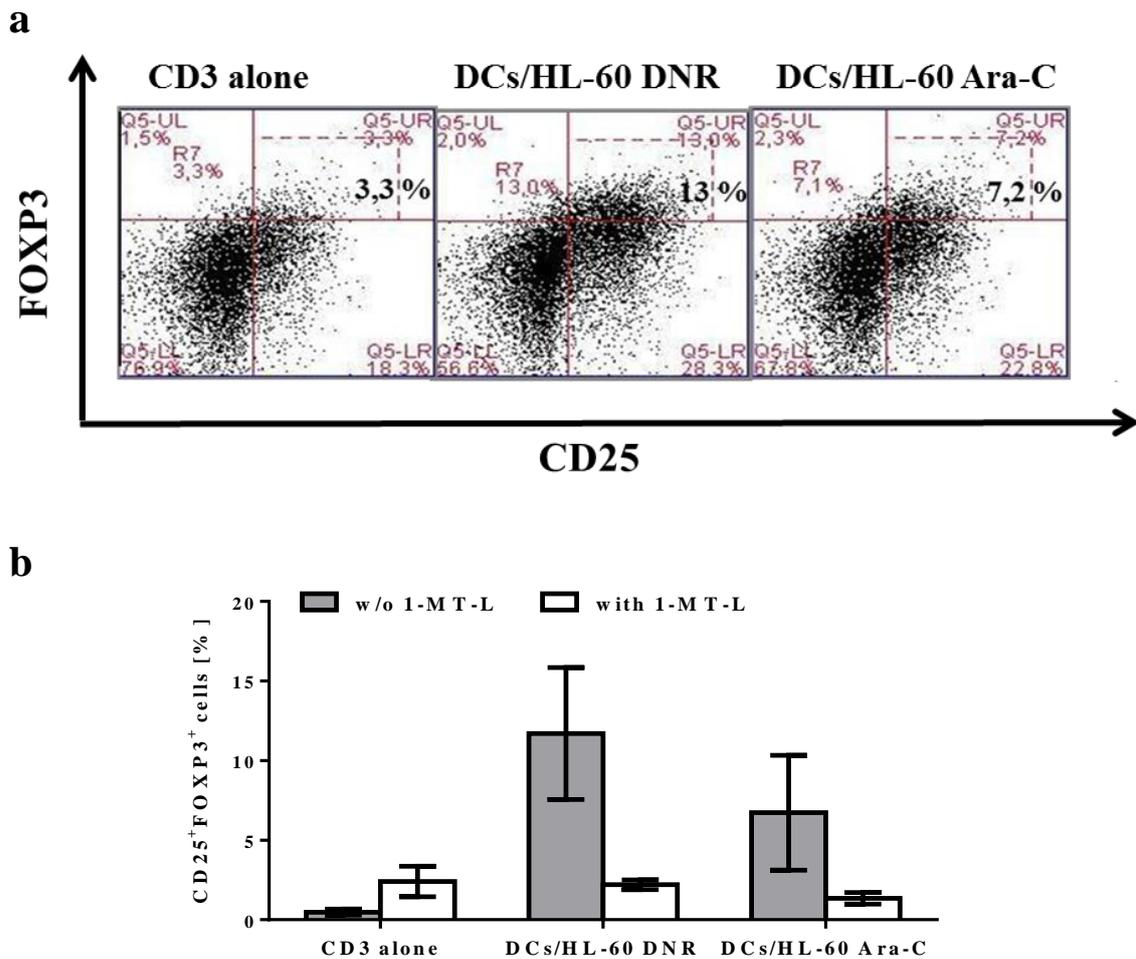
**Figura 24.** Regolazione dell'espressione dei marcatori di maturazione e della proteina IDO1 da parte dall'ATP attraverso P2Y11. **a.** Espressione di CD83 e CD 80 (analisi FACS) e **b.** della proteina IDO1 (western blot) in DCs mantenute in coltura per 24h in presenza di ATP (1mM) e ATP+NF340 (10 $\mu$ M). iDCs e DCs cocktail sono le condizioni di controllo. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM dei valori ottenuti in 2 esperimenti. \*\*\*\*p< 0,001, \*\*\*p<0,001 \*p<0,05 vs iDCs.

### 13. Cellule dendritiche esprimenti IDO1 sono in grado di espandere la popolazione dei linfociti Tregs

Esperimenti di co-cultura ci hanno permesso di evidenziare come cellule DCs maturate sotto lo stimolo della ICD ed esprimenti elevati livelli di IDO1, siano in grado di indurre una maggiore espansione di una popolazione di linfociti Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> allogeneici dopo 5 giorni in co-cultura, rispetto a DCs pulsate con cellule apoptotiche non immunogeniche, come quelle trattate con Ara-C (Figura 25). La Figura 25a mostra l'induzione dei Tregs CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> in un esperimento rappresentativo, in cui la loro

percentuale aumenta dal 3,3% nei CD3<sup>+</sup> non stimolati al 13% nei CD3<sup>+</sup> stimolati con DCs caricate con HL-60 trattate con DNR o Ara-C (7,2%).

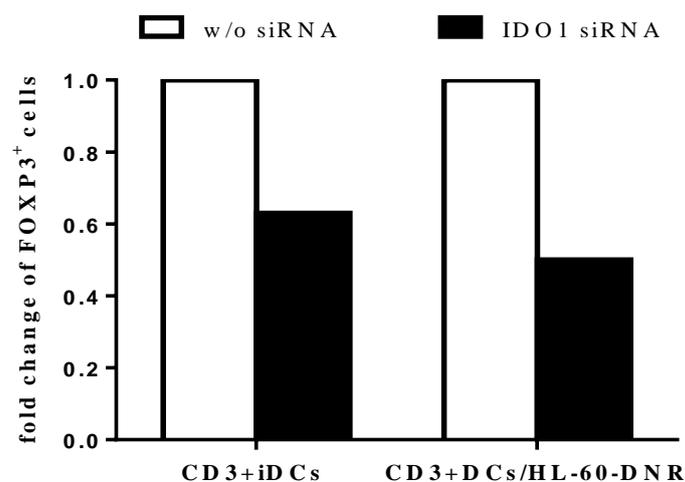
Il ruolo di IDO1 nell'indurre tale popolazione è stato dimostrato mediante utilizzo di un inibitore specifico per l'enzima, l'1-MT-L, la cui aggiunta è stata sufficiente ad abolire quasi completamente il numero di Tregs presenti nella co-cultura.



**Figura 25.** Induzione di linfociti Tregs allogeneici da parte di DCs esprimenti IDO1 (analisi citofluorimetrica). Percentuale di CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> allogeneici (gate su CD4<sup>+</sup>) espansi dopo 5 giorni di co-cultura con DCs maturate in presenza di HL-60 trattate con DNR (500 ng/ml) e con Ara-C (25µg/ml). **a.** Analisi citofluorimetrica da un esperimento rappresentativo. **b.** La presenza di 1-MT-L (1mM.) inibisce la generazione di CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> allogeneici. I valori rappresentati derivano dalle medie ± SEM dei valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

La percentuale di linfociti Tregs CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> passa da  $0,47 \pm 0,19\%$  nella coltura di linfociti CD3<sup>+</sup> non stimolati a  $11,70 \pm 4,15\%$  nella co-coltura di linfociti CD3<sup>+</sup> con DCs caricate con HL-60 trattate con DNR; questo valore è ridotto al  $2,2 \pm 0,30\%$  dall'aggiunta dell'inibitore 1-MT-L. Le DCs caricate con HL-60 trattate con Ara-C inducono una minore espansione della popolazione Tregs, pari al  $6,72 \pm 3,61\%$ , che è ridotta a  $1,35 \pm 0,36\%$  dall'aggiunta dell'inibitore (Figura 25b).

Per conferma è stato eseguito un esperimento di co-coltura (24 ore) di linfociti CD3<sup>+</sup> allogenici con DCs, maturate in presenza di HL-60 trattate con DNR, in cui IDO1 è stato silenziato mediante siRNA. Come mostrato in figura 26, in questa condizione, abbiamo osservato una diminuzione di Tregs pari al 50% in presenza di DCs silenziate rispetto al controllo (15% e 7,2% di cellule CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> rispettivamente). Nella condizione CD3<sup>+</sup>/iDCs il fold-change è risultato leggermente inferiore; la percentuale di Tregs, comunque più bassa, è diminuita nella coltura, dopo silenziamento, solo del 37% rispetto al controllo (9,5% e 6% di cellule CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> rispettivamente), dal momento che l'induzione dei Tregs da parte delle iDCs dipende da altri meccanismi tollerogenici, oltre che dall'espressione di IDO1.



**Figura 26.** Fold-change della percentuale di Tregs in una popolazione di linfociti CD3<sup>+</sup> tenuti in coltura per 24 ore in presenza di iDCs o DCs caricate con HL-60 precedentemente esposte a DNR (500 ng/ml), nelle quali è stato silenziato il trascritto genico di IDO1 mediante siRNA (250nM). La percentuale di Tregs presenti nella coltura di linfociti CD3<sup>+</sup> e DCs non silenziate sono state utilizzate come riferimento e poste uguale a 1. Analisi citofluorimetrica di un esperimento rappresentativo.

#### **14. Le cellule leucemiche trattate con daunorubicina e caricate in cellule dendritiche attraverso la morte immunogenica inducono cellule T leukemia-specifiche**

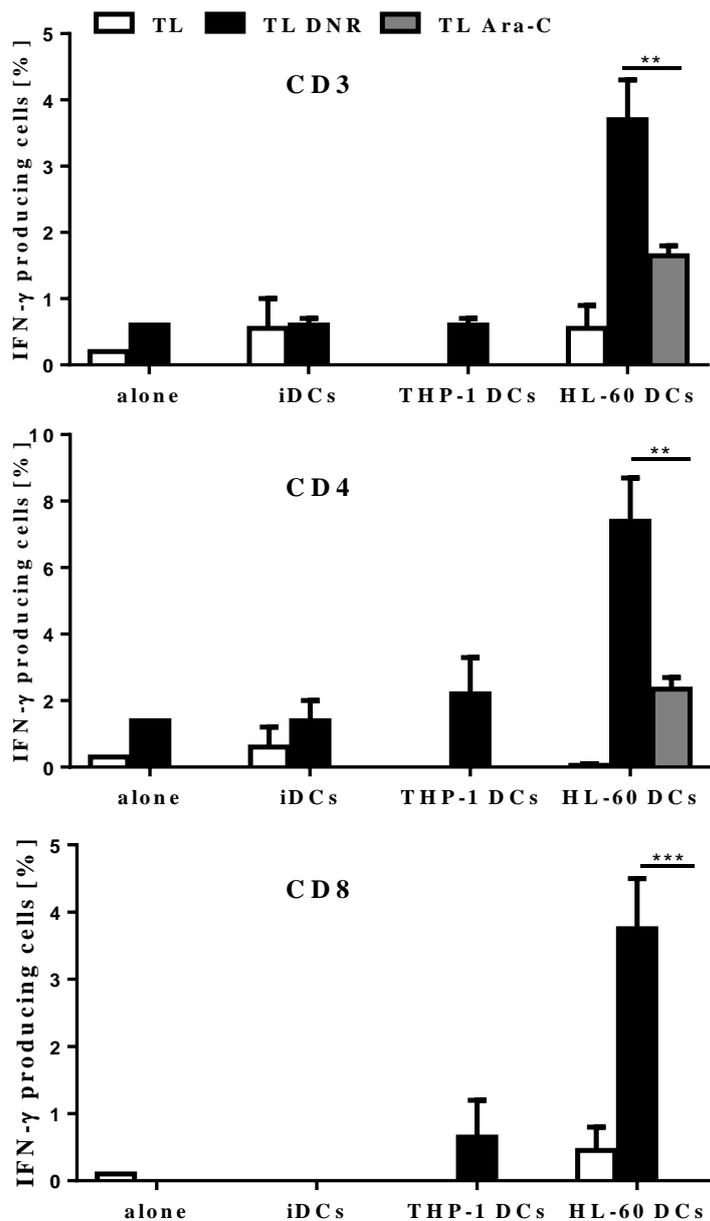
*In vitro* le DCs caricate con HL60 trattate con DNR si sono dimostrate efficienti nell'induzione di linfociti T CD3<sup>+</sup> antigene-specifici attivati e secernenti IFN- $\gamma$ . Un significativo aumento (\*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.001) sia dei CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (3,70  $\pm$  0,60%) che dei CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (7,40  $\pm$  1,30%) e dei CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (3,75  $\pm$  0,75%) è stato osservato, quando i linfociti CD3<sup>+</sup> attivati, indotti per 2 settimane con due cicli di stimolazione, da DCs caricate con HL-60 trattate con DNR, sono stati messi in coltura contro un target

costituito da DCs autologhe caricate con lisato di cellule HL-60. La stessa risposta non è stata osservata quando i target impiegati erano iDCs ( $0,60 \pm 0,10\%$  per i  $CD3^+$ ,  $1,40 \pm 0,60\%$  per i  $CD4^+$ ,  $0,00 \pm 0,00\%$  per i  $CD8^+$ ) o DCs caricate con lisato della linea cellulare leucemica THP-1 ( $0,60 \pm 0,10\%$  per i  $CD3^+$ ;  $2,20 \pm 1,10\%$  per i  $CD4^+$ ;  $0,65 \pm 0,55\%$  per i  $CD8^+$ ) (Figura 27). Questo fenomeno conferma l'efficiente cross-priming dei linfociti T, di cui sono capaci le DCs maturate in corso di ICD, che si caratterizza, inoltre, per un'elevata specificità antigenica.

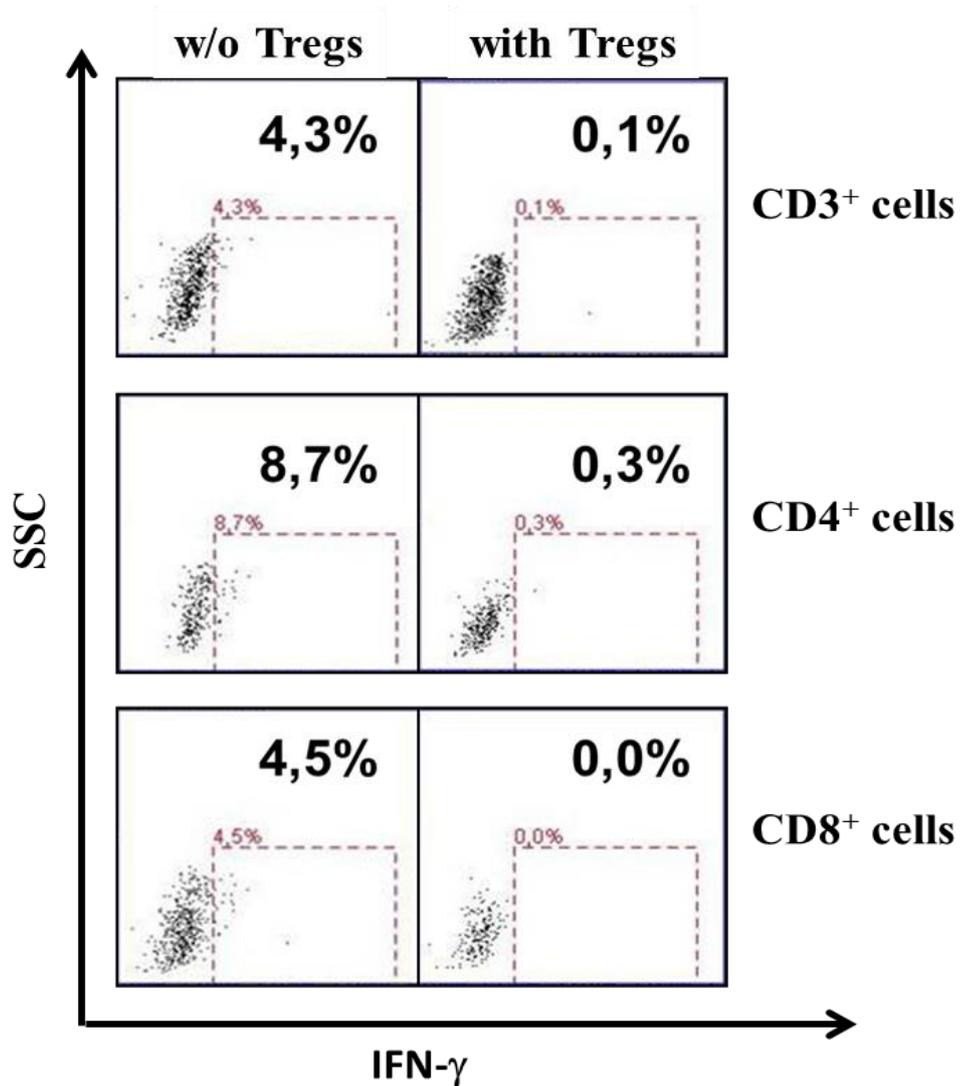
L'attivazione dei linfociti T  $CD3^+$ , indotti dalle DCs caricate con HL-60 trattate con Ara-C (per 2 settimane con due cicli di stimolazione) e utilizzati come controllo dei Teffettori, si è rivelata inferiore ( $1,65 \pm 0,15\%$  per i  $CD3^+$ ;  $2,35 \pm 0,35\%$  per i  $CD4^+$ ;  $0,00 \pm 0,00\%$  per i  $CD8^+$ ), anche se specifica per antigeni espressi dalla linea HL-60 (TL-Ara-C vs HL-60-DCs). Contro gli altri target non è stata rilevata alcuna produzione di IFN- $\gamma$ . (Figura 27)

In un esperimento rappresentativo l'aggiunta di Tregs autologhi, ottenuti parallelamente in una co-coltura di linfociti T e DCs maturate mediante ICD ed esperimenti IDO1, come descritto nel paragrafo 11, ha determinato l'inibizione della produzione di IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  nella condizione di interesse, ossia TL-DNR vs HL60-DCs (Figura 28). In seguito ad aggiunta di Tregs, la percentuale di cellule  $CD3^+IFN-\gamma^+$  passa da 4,3% a 0,1%, la percentuale di cellule  $CD4^+IFN-\gamma^+$  passa da 8,7% a 0,3% e infine la percentuale di cellule  $CD8^+IFN-\gamma^+$  passa da 4,5% a 0,0%.

Questi esperimenti mettono in risalto il ruolo immunomodulatore della chemioterapia immunogenica, responsabile dell'attivazione di una forte risposta immunologica antitumorale da un lato e dell'induzione di pathway inibitori della stessa dall'altro.



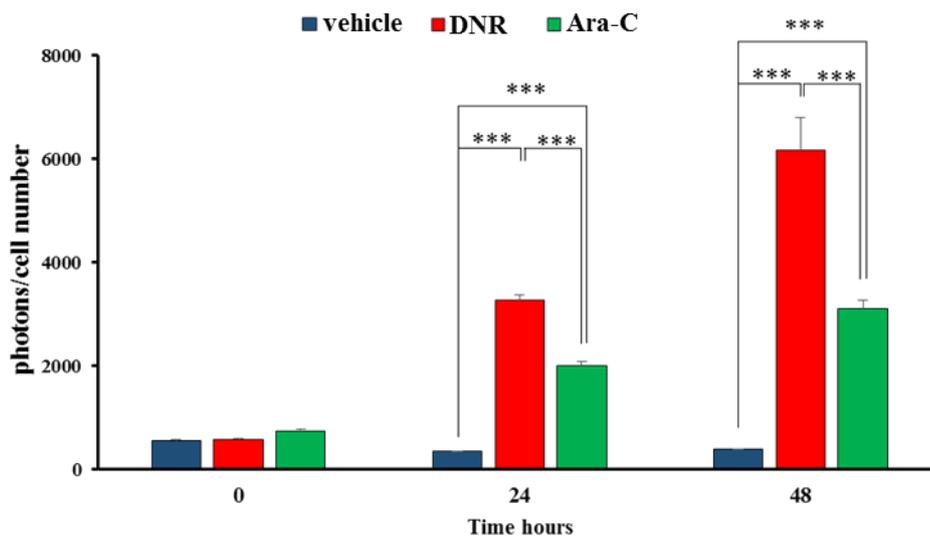
**Figura 27.** Test della secrezione di IFN- $\gamma$  da parte di linfociti T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) leucemia-specifici stimolati e restimolati da DCs caricate con cellule HL-60 trattate con DNR (TL DNR) per 2 settimane. Come target sono state utilizzate iDCs autologhe non caricate (controllo negativo), DCs autologhe caricate con lisato di THP-1 (controllo negativo della specificità) e DCs autologhe caricate con lisato di HL-60. Come linfociti T effettori di controllo sono stati utilizzati linfociti T CD3<sup>+</sup> non stimolati (controllo negativo; TL) e linfociti T CD3<sup>+</sup> stimolati e restimolati da DCs caricate con cellule HL-60 trattate con Ara-C (controllo negativo dell'ICD; TL Ara-C). Medie  $\pm$  SEM di 2 esperimenti. \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0,001.



**Figura 28.** Secrezione di IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, stimolati e restimolati da DCs caricate con cellule HL-60 trattate con DNR per 2 settimane, in assenza e in presenza di Tregs autologhi, indotti in una co-coltura di 5 giorni di linfociti CD3<sup>+</sup> e DCs IDO1<sup>+</sup> (caricate con cellule HL-60 trattate con DNR), separati e messi in co-coltura (rapporto T<sub>eff</sub>:T<sub>regs</sub> 1:10) per 5 giorni. Analisi citofluorimetrica di un esperimento rappresentativo.

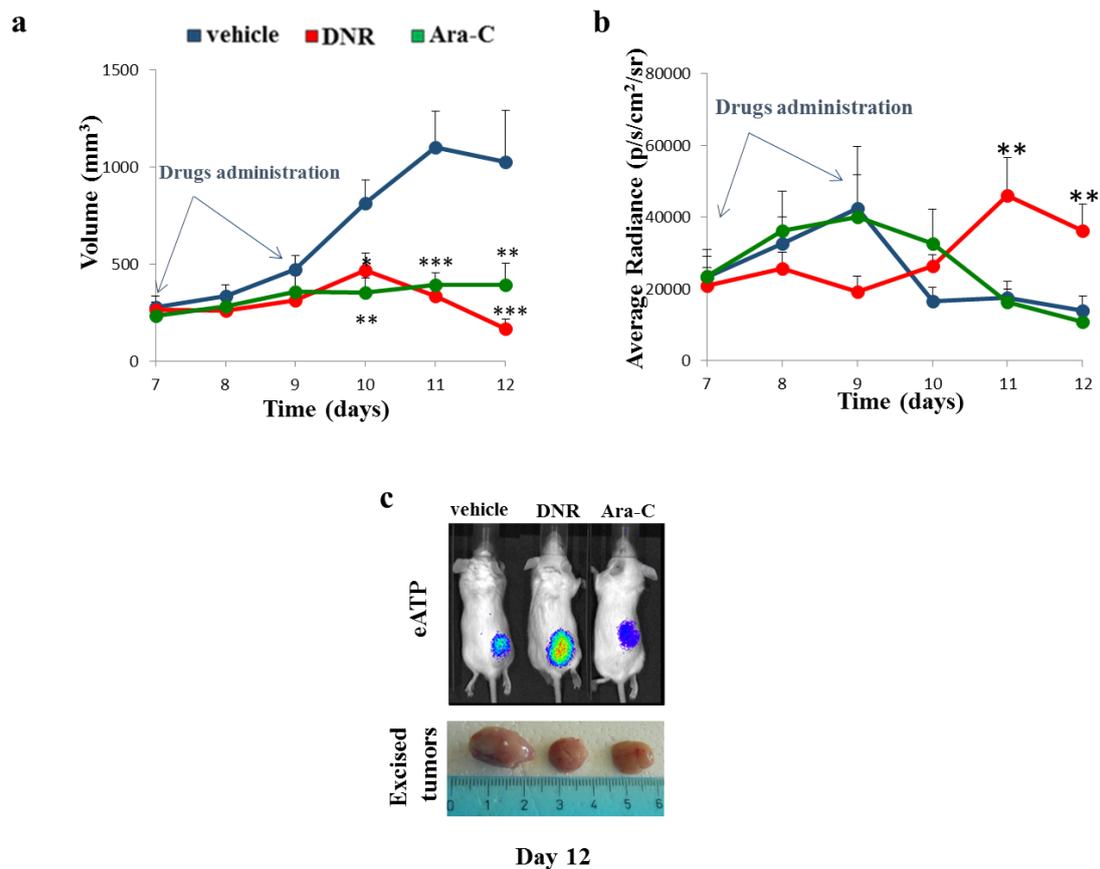
## **15. La daunorubicina fa aumentare *in vivo* il rilascio di ATP extracellulare e di citochine antitumorali e determina una modificazione dell'infiltrato tumorale di cellule del sistema immunitario**

Per valutare se la DNR può indurre il rilascio di ATP dalle cellule leucemiche anche *in vivo*, come già visto *in vitro*, abbiamo ottenuto dei cloni stabili di cellule WEHI-3B che esprimessero stabilmente una sonda per l'ATP extracellulare, la PmeLUC. PmeLUC è una sonda derivata dalla luciferasi, progettata per essere espressa sul lato esterno della membrana plasmatica [118] ed utilizzata per rilevare l'eATP in diversi modelli di malattia tumorale *in vivo* [122] [123]. La WEHI-3B è una linea di cellule murine mielomonocitiche, che ci ha permesso di misurare l'effetto dei chemioterapici sul rilascio di eATP in un modello murino singenico immunocompetente (topi BALB/cJ). Le cellule WEHI-3B PmeLUC, stimulate *in vitro* sia con DNR (177 nM) sia con Ara-c (60  $\mu$ M), hanno rilasciato livelli più elevati di ATP rispetto al controllo non trattato, tuttavia l'eATP rilasciato in seguito a trattamento con DNR era pari quasi al doppio di quello rilasciato in seguito a trattamento con Ara-c. Il numero di fotoni emesso dal surnatante delle cellule trattate con DNR, infatti, era pari a  $3274,35 \pm 105,36$  dopo 24 ore e a  $6162,18 \pm 633,11$  dopo 48 ore. Il numero di fotoni emesso dal surnatante delle cellule trattate con Ara-C, invece, era pari a  $2013,56 \pm 64,47$  dopo 24h e a  $3109,91 \pm 149,47$  dopo 48h (Figura 29).



**Figura 29.** Rilascio di ATP da parte di cellule WEHI-3B PmeLuc. I livelli di eATP sono stati misurati ai diversi time point, mediante luminometria dopo aggiunta di luciferina (200  $\mu$ M). Blu: PBS, Rosso: DNR 177 nM, Verde: Ara-C 60  $\mu$ M. I dati riportati indicano il numero totale di fotoni emessi durante un'acquisizione 5 minuti normalizzata sul numero di cellule per campo microscopico 20x. I dati riportati rappresentano una media  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,001$

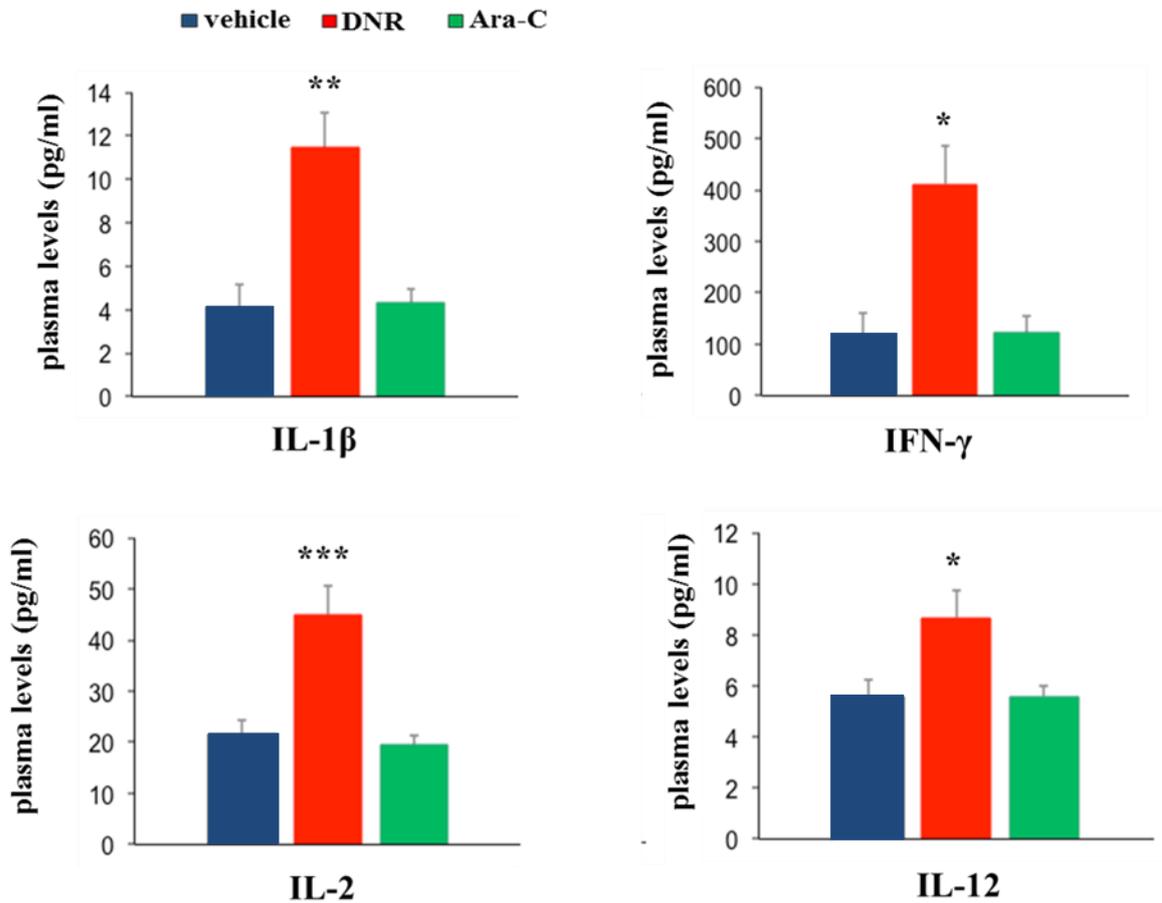
*In vivo*, il trattamento sistemico con DNR (3 mg/kg) e Ara-c (50 mg/kg) ha causato, come previsto, una significativa riduzione dei tassi di crescita tumorale e delle dimensioni finali della massa (Figura 30a, c). Tuttavia, solo il trattamento con DNR ha indotto un aumentato rilascio di eATP, mentre nei topi trattati Ara-c i livelli di eATP sono risultati paragonabili a quelli misurati per i controlli trattati con placebo (Figura 30b,c).



**Figura 30.** Quantificazione *in vivo* di eATP dopo trattamento con DNR e Ara-C. I topi BALB/cJ sono stati inoculati nel fianco posteriore destro con cellule WEHI-3B PmeLUC ( $2 \times 10^6$ ). DNR (600  $\mu\text{g/ml}$ ) e Ara-C (10  $\text{mg/ml}$ ) sono state somministrate i.p. nei giorni 7 e 9 post-inoculo. **a.** Il volume della massa tumorale è stata valutata *in vivo* con un calibro ai tempi indicati; **b.** la misurazione dei livelli eATP è stata effettuata sulla base delle emissioni di luminescenza della sonda PmeLUC ( $\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$ ), acquisita mediante un luminometro IVIS; **c.** immagini rappresentative dell'emissione di luminescenza da parte di PmeLUC in topi BALB/cJ trattati e dei tumori escissi al giorno 12 post-inoculo. I dati rappresentati corrispondono a medie  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs placebo.

E' interessante notare che i livelli di eATP elevati nei topi trattati con DNR sono associati ad un aumento sistemico, statisticamente significativo, di citochine pro-infiammatorie, ampiamente accettate come marcatori di morte cellulare immunogenica [124] e riconosciute per essere rilasciate in caso di attivazione del pathway di segnalazione

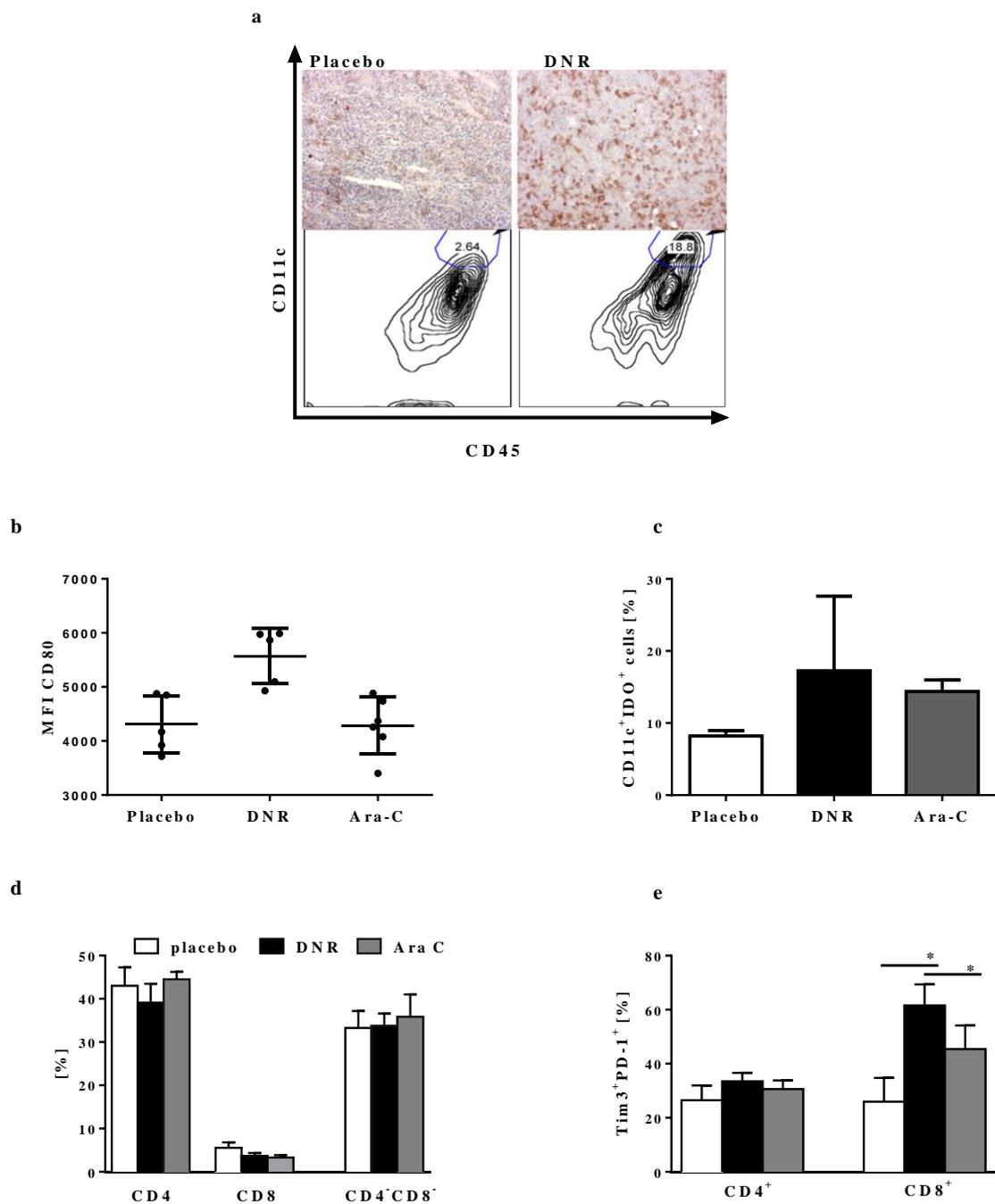
purinergico [125]: IL-1 $\beta$  (11,46  $\pm$  1,61 pg/ml; **\*\***p<0,01 vs placebo), IFN- $\gamma$  (411,53  $\pm$  75,02 pg/ml; \*p<0,05 vs placebo), IL-12 (8,69  $\pm$  1,05 pg/ml; \*p<0,05 vs placebo) e IL-2 (45,04  $\pm$  5,56 pg/ml; **\*\*\***p<0,001 vs placebo) (Figura 31).



**Figura 31.** Livelli plasmatici di citochine proinfiammatorie nei topi BALB/cJ. I topi sono stati inoculati con cellule WEHI-3B PmeLUC e trattati con i farmaci DNR e Ara-C come descritto nella Figura 30. Le citochine IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12 sono state valutate in campioni di plasma ottenuti al giorno 12 post-inoculo. I dati sono media  $\pm$  SEM dei valori ottenuti da 6 topi per la condizione placebo e 8 topi per le condizioni di trattamento con DNR (e Ara-C). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0,001 (vs placebo).

L'analisi immunohistochimica di preparati istologici delle masse tumorali, inoltre, ha evidenziato una maggiore infiltrazione di DCs CD11c<sup>+</sup> nei topi BALB/cJ trattati con DNR rispetto ai topi trattati con placebo (Figura 32a). Anche nel modello murino le DCs maturate in corso di ICD sembrano essere più mature, come evidenziato da una maggiore espressione di CD80 nelle DC di topi trattati con DNR (MIF pari a  $5571 \pm 230,40$ ) rispetto ai topi non trattati (MIF pari a  $4306 \pm 238,20$ ) e ai topi trattati con Ara-C (MIF pari a  $4287 \pm 215,60$ ) (Figura 32b). Come mostrato in figura 32c, le DCs infiltranti il tumore nei topi trattati con DNR esprimono anche livelli più elevati della proteina IDO1 ( $16,00 \pm 1,14\%$  CD11c<sup>+</sup>IDO<sup>+</sup>) rispetto alle DCs dei topi trattati con placebo ( $10,44 \pm 1,14\%$  CD11c<sup>+</sup>IDO<sup>+</sup>) o Ara-C ( $14,8 \pm 0,00\%$  CD11c<sup>+</sup>IDO<sup>+</sup>).

L'analisi dell'infiltrato linfocitario non ha evidenziato differenze tra le percentuali di linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> presenti in topi trattati con DNR ( $39,10 \pm 4,36\%$  e  $3,70 \pm 0,66\%$ , rispettivamente) e quelle riscontrate nei topi trattati con placebo ( $43,00 \pm 4,25\%$  di cellule CD4<sup>+</sup> e  $5,57 \pm 1,22\%$  di cellule CD8<sup>+</sup>) o con Ara-C ( $44,50 \pm 1,72\%$  di cellule CD4<sup>+</sup> e  $3,33 \pm 0,54\%$  di cellule CD8<sup>+</sup>) (Figura 32d). Tuttavia anche nel modello murino, come *ex vivo* nell'uomo, il trattamento con antracicline sembra essere responsabile dello stabilirsi di un fenotipo exhausted nei linfociti T CD8<sup>+</sup> citotossici, caratterizzato da un'elevata espressione di superficie dei recettori co-inibitori PD-1 e TIM-3. L'espressione di questi marcatori sui linfociti CD8<sup>+</sup> presenti nell'infiltrato tumorale passa da  $25,94 \pm 8,82\%$  nei topi trattati con placebo a  $61,55 \pm 7,85\%$  nei topi trattati con DNR. L'espressione sui CD8<sup>+</sup> dell'infiltrato di topi trattati con Ara-C è inferiore rispetto ai topi trattati con DNR ed è pari a  $41,02 \pm 1,88\%$  (Figura 32e).



**Figura 32.** Analisi dell'infiltrato tumorale nei topi trattati con placebo, DNR o Ara-C (come descritto nella figura 30). **a.** Analisi immunocitochimica e citofluorimetrica delle DCs nei topi trattati con DNR o placebo in due campioni rappresentativi. **b.** MFI di CD80 e **c.** espressione di IDO1 al FACS nelle cellule DCs CD11c<sup>+</sup> di topi trattati con placebo, DNR o Ara-C. E' rappresentata la media  $\pm$  SEM dei valori ottenuti da due campioni per ciascuna condizione. **d.** Analisi citofluorimetrica dell'infiltrato di linfociti T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. **e.** Analisi citofluorimetrica dell'espressione dei marcatori di exhaustion Tim3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> nei subset CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dei linfociti T. Sono stati analizzati 5 topi per condizione (medie  $\pm$  SEM); \*p<0,05.

## *Discussione*

La leucemia acuta mieloide è una malattia molto eterogenea. Anche se la sua prognosi può essere estremamente diversa in base a fattori clinici e biologici specifici, complessivamente i pazienti adulti affetti da LAM mostrano una prognosi severa. In questo contesto, appare sempre più urgente identificare nuovi approcci terapeutici volti a migliorare l'*outcome* clinico dei pazienti.

La classica nozione, secondo cui la chemioterapia determina un abbassamento delle difese immunitarie, è stata recentemente superata da alcune importanti osservazioni che vedono il sistema immunitario attivato dopo terapia con particolari farmaci chemioterapici. Questo fenomeno, conosciuto come *morte cellulare immunogenica* o *ICD*, è dovuto ad una serie di segnali, detti DAMPs, trasmessi dalle cellule tumorali morenti alle altre cellule presenti nel microambiente tumorale, che si traducono in un'attivazione del sistema immunitario.

Anche se numerosi studi sostengono il ruolo della ICD, sia nei tumori solidi che, di recente, nelle leucemie [31], valutazioni più complete indicano anche che alcuni farmaci antitumorali, nell'innescare il processo di ICD, inducono l'espansione di linfociti Tregs. [126] Le DCs svolgono un ruolo chiave nella regolazione dell'immunità adattativa, potendo al tempo stesso promuovere o sopprimere le risposte immunitarie mediate da cellule T. Uno dei meccanismi soppressori più rilevanti comporta l'espressione dell'enzima IDO1, che svolge un ruolo importante nell'induzione della tolleranza immunologica proprio attraverso l'espansione di linfociti Tregs. L'induzione IDO1-mediata di Tregs, in particolare, rappresenta un meccanismo importante attraverso cui le cellule leucemiche, creando un microambiente immunosoppressivo riescono ad evitare l'efficace attivazione della risposta immunitaria anti-leucemica. [19] [106]

Nel contesto delle LAM, molti studi dimostrano un ruolo di meccanismi inibitori nell'instaurarsi di uno stato di tolleranza immunologica. Capire se l'inibizione di tali meccanismi, e in particolare del pathway di IDO, sia utile per potenziare l'immunogenicità della morte cellulare indotta da chemioterapia e per attivare più efficacemente il sistema immunitario contro la leucemia rappresenta un importante obiettivo e può contribuire allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici di tipo immunologico nella cura delle LAM.

Lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare nella LAM la ICD indotta da antracicline, in particolare dalla DNR e, nel contempo, valutare gli effetti dell'instaurarsi di pathway inibitori che coinvolgono le DCs, come l'espressione dell'enzima IDO1.

La morte cellulare immunogenica è caratterizzata da una serie di eventi, tra cui la traslocazione di calreticulina dal nucleo alla superficie cellulare, il legame delle HSPs agli antigeni tumorali che così vengono trasportati all'esterno della cellula, il rilascio del fattore pro-infiammatorio HMGB1 nel mezzo extracellulare e la secrezione di ATP. Questi eventi, nel loro insieme, sono in grado di attivare la risposta immunitaria permettendo un efficiente *pulsing* di antigeni tumore-associati nelle cellule dendritiche, che a loro volta possono avviare una risposta antitumorale mediata da cellule T.

Mediante esperimenti *in vitro* sulla linea leucemica umana HL-60 e su campioni primari di cellule blastiche leucemiche, abbiamo dimostrato che, anche nelle LAM, il trattamento con DNR, parallelamente all'apoptosi, induce tutte le modificazioni caratteristiche della ICD: la traslocazione della calreticulina e delle heat shock protein 70/90 sulla superficie cellulare, il rilascio del fattore pro-infiammatorio HMGB1 e di ATP. Pensiamo che questo fenomeno sia alla base di quanto osservato nei pazienti LAM, dopo chemioterapia d'induzione a base di DNR. Il monitoraggio *ex vivo* dei pazienti, infatti, ci ha permesso di

evidenziare, nel 65% dei casi, una risposta immunitaria leucemia-specifica basata sulla produzione di IFN- $\gamma$ . Contemporaneamente, è stato osservato anche un aumento indipendente di linfociti Tregs, che potrebbe essere il segnale di un'attivazione, anche in senso tollerogenico, del sistema immunitario.

D'altro canto i pazienti in cui non è stata riscontrata produzione di IFN- $\gamma$  dopo chemioterapia potrebbero essere portatori di mutazioni genetiche loss of function a carico dei pathway coinvolti nel processo di ICD, come ad esempio quella a carico del TLR4, che si è visto essere correlata, in pazienti affetti da carcinoma mammario, a un maggior tasso di ricaduta dopo chemio- o radioterapia rispetto all'allele normale.

Mccubbin et al. sono stati i primi a dimostrare che le antracicline sono agenti molto efficaci nell'induzione di risposte anti-tumorali mediate da CTL. [127] Nei tumori solidi, inoltre, si è visto recentemente che le antracicline stimolano la proliferazione di cellule T CD8<sup>+</sup> tumore-specifiche a livello linfonodale e, allo stesso tempo, promuovono l'infiltrazione tumorale prima da parte di cellule T  $\gamma\delta$  secernenti IL-17 e poi da parte di cellule T CD8<sup>+</sup> attivate secernenti IFN- $\gamma$ . [128] [129]

Un'analisi immunofenotipica approfondita dei linfociti T CD8<sup>+</sup> attivati emergenti dopo chemioterapia ha evidenziato come questi linfociti siano arricchiti nelle subpopolazioni effector memory ed effector memory esprimenti RA, che dovrebbero essere quelle maggiormente differenziate verso il fenotipo citotossico. La valutazione dell'attività citotossica sui blasti autologhi, infatti, ha evidenziato la capacità dei CTL CD8<sup>+</sup> di riconoscere ed uccidere le cellule leucemiche esprimenti gli antigeni specifici contro cui essi sono stati attivati in corso di chemioterapia. Proprio i subset effettori però, rispetto ai central memory e ai naïve, esprimono sulla superficie cellulare elevati livelli di PD-1 e

Lag-3, molecole note come “exhaustion markers”. Questi recettori inibitori, quando presenti, riducono l'intensità della risposta immunitaria innalzando le soglie di attivazione, arrestando la proliferazione, favorendo l'apoptosi o inibendo il differenziamento verso funzioni effettrici delle cellule del sistema immunitario. [130] Le cellule T reattive agli antigeni tumorali possono avere un impatto enorme sul controllo della crescita del tumore, ma esse sono spesso rese anergiche o “exhausted” a seguito dell'esposizione agli antigeni tumorali. Per questo motivo è importante rafforzare la loro attività mediante l'impiego di strategie adatte a promuovere la rottura della tolleranza e la funzione immunitaria adattativa nelle cellule T da un lato, l'uptake e l'efficace presentazione di antigeni tumorali da parte delle DCs dall'altro.

D'altra parte abbiamo visto che cellule dendritiche caricate con antigeni leucemici, provenienti da blasti trattati con DNR, raggiungono un elevato grado di maturazione, legato in particolare all'espressione delle molecole co-stimolatorie CD83, CD80, CD86. Parallelamente le cellule dendritiche così maturate esprimono quantità rilevabili della proteina IDO1, che risulta essere biologicamente attiva nell'induzione dei linfociti Tregs. L'ATP riveste un ruolo molto importante nel meccanismo della ICD. È noto, infatti, che attraverso il recettore P2X7 determina nelle DCs la produzione di IL-1 $\beta$ , che è fondamentale per la corretta polarizzazione dei linfociti verso il fenotipo Th1, mentre agendo attraverso i recettori P2Y permette il reclutamento e la maturazione delle DCs. [64] [65] [66] In questo lavoro lo studio degli effetti dell'ATP sulle DCs ha evidenziato come la maturazione delle DCs sia in gran parte mediata dall'azione del nucleotide trifosfato sul recettore purinergico P2Y11. Prendendo spunto da un dato di letteratura piuttosto recente, abbiamo dimostrato che anche l'espressione di IDO1 è dipendente, e potrebbe esserlo

anche nel contesto della ICD, dalla stimolazione del recettore P2Y<sub>11</sub> da parte dell'ATP. [67] L'ATP extracellulare, in più, potrebbe essere una fonte di agenti immunosoppressivi come l'adenosina, portando allo sviluppo di un microambiente che riduce l'efficacia delle risposte immunitarie anti-tumorali.

Esperimenti di co-cultura ci hanno permesso di evidenziare come le cellule dendritiche maturate in corso di ICD ed esprimenti IDO1 siano in grado di indurre una popolazione di linfociti T regolatori CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> che, come dimostrato, svolgono un'attività soppressiva. La dipendenza di tale fenomeno dall'induzione del pathway di IDO1 è stata confermata dal fatto che può essere abrogato dall'aggiunta dell'inibitore dell'enzima, l'1-metiltriptofano.

L'aspetto interessante di questo studio è che le DCs maturate in presenza di HL-60 trattate con DNR si sono dimostrate efficienti nell'indurre una popolazione di linfociti T CD3<sup>+</sup> secernenti IFN- $\gamma$  in risposta ad antigeni leucemici specifici, ossia quelli della linea HL-60. La produzione di IFN- $\gamma$  è stata valutata in risposta a due target differenti, DCs autologhe caricate con lisato di HL-60, contro cui i linfociti T sono stati attivati, e DCs autologhe caricate con lisato di cellule THP-1, che non hanno indotto alcuna risposta. La produzione della citochina è abolita dai linfociti Tregs autologhi, espansi dalle DCs esprimenti IDO1 e maturate sotto lo stimolo della ICD. Questa popolazione di Tregs, dotata sicuramente di specificità antigenica, svolge un ruolo critico negativo nella modulazione della risposta allo stimolo immunogenico ed è per questo che il pathway di IDO1 non può essere sottovalutato.

Per ottenere un quadro completo del meccanismo di ICD nella LAM è stato impiegato anche un modello murino, in cui la leucemia è stata indotta mediante inoculo di cellule

leucemiche murine della linea WEHI-3B esprimenti la luciferasi di membrana PmeLUC. *In vivo*, la terapia con DNR, contemporaneamente alla riduzione del volume della massa tumorale, ha determinato un elevato rilascio di ATP da parte del tumore, rispetto ai topi trattati con placebo ma anche rispetto a quelli trattati con Ara-C, confermando il risultato ottenuto *in vitro*. Nei topi sottoposti a trattamento con DNR, inoltre, sono stati riscontrati elevati livelli plasmatici di citochine rispetto ai controlli, fornendo indicazione di un maggiore stato di coinvolgimento del sistema immunitario in corso di chemioterapia. Questo dato rispecchia quanto già riscontrato *ex vivo* nell'analisi della produzione di IFN- $\gamma$  nei pazienti con LAM dopo chemioterapia d'induzione. Analogamente ai risultati ottenuti *ex vivo* e *in vitro*, anche nel modello murino, l'analisi dell'infiltrato tumorale di topi trattati con DNR ha rivelato una maggiore infiltrazione di DCs mature che sembravano esprimere livelli più elevati dell'enzima IDO1 e la presenza di linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> caratterizzati da un fenotipo "exhausted".

I nostri dati confermano che la ICD indotta da chemioterapia risulta attiva anche nelle LAM e si traduce nell'attivazione di una risposta immunitaria cellulo-mediata contro la leucemia. La profonda caratterizzazione delle cellule T emergenti dopo la chemioterapia, *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*, tuttavia, ha evidenziato un fenotipo "exhausted" e l'espansione di una popolazione di linfociti Tregs, che può derivare dall'induzione di pathway inibitori nelle cellule dendritiche, come quello di IDO1, responsabili dello stabilirsi di uno stato di tolleranza. Complessivamente i dati ottenuti suggeriscono che la combinazione della chemioterapia con inibitori farmacologici di IDO1, può rappresentare un approccio interessante per potenziare l'effetto immunogenico della chemioterapia ed indurre

un'augmentata risposta immunologica contro le cellule leucemiche, contrastando l'induzione concomitante di pathway tollerogenici.

## Bibliografia

- [1] M. Tura, *Corso di malattie del sangue e degli organi emopoietici*, Bologna: Esculapio, 2003.
- [2] M. Sant, «Incidence of Hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of HAEMACARE project,» *Blood*, vol. 116, n. 19, pp. 3724-34, 2010.
- [3] B. W. Stewart, «World Cancer Report,» IARC Press, Lyon, 2003.
- [4] J. Vardiman, «The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms,» *Blood*, vol. 100, n. 7, pp. 2292 - 2302, 2002.
- [5] M. Smith, «Adult acute myeloid leukaemia,» *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 50, n. 3, pp. 197-222, 2004.
- [6] E. Estey, «Acute myeloid leukaemia,» *The Lancet*, vol. 368, n. 9550, pp. 1894 - 1907, 2006.
- [7] D. Grimwade, «Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials,» *Blood*, vol. 116, n. 3, pp. 354-65, 2010.
- [8] A. Burnett, «Therapeutic advances in Acute Myeloid Leukemia,» *J Clin Oncol.*, vol. 29, n. 5, pp. 487-94, 2011.
- [9] D. Chen, «Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle,» *Immunity*, vol. 39, pp. 1-10, 2013.
- [10] L. Zitvogel, «Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion,» *Nature Rev. Immunol.* , vol. 6, p. 715–727 , 2006.
- [11] D. W. H. Barnes, «Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow,» *Br. Med. J.*, vol. 2, pp. 626-627, 1956.
- [12] P. L. Weiden, «Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts,» *N. Engl. J. Med.*, vol. 300, pp. 1068-1073 , 1979.
- [13] P. L. Weiden, «Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease. Contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation,» *N. Engl. J. Med.*, vol. 304, pp. 1529-1533, 1981.
- [14] R. Champlin, «T-cell depletion for bone marrow transplantation: effects on graft rejection, graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, and survival,» *Cancer Treat Res.* , vol. 50, pp. 99-111, 1990.
- [15] J. Galea-Lauri, «Immunological weapons against acute myeloid leukaemia,» *Immunology*, vol. 107, n. 1, p. 20–27, 2002.
- [16] J. Greiner, «Leukemia-Associated Antigens Are Critical for the Proliferation of Acute Myeloid Leukemia Cells,» *Clin Cancer Res*, vol. 14, n. 22, pp. 7161-7166, 2008.
- [17] L. Zhang, « PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model,» *Blood*, vol. 114, pp. 1545-1552, 2009.
- [18] Q. Zhou, «Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia,» *Blood*, vol. 117, n. 17, pp. 4501 - 4510, 2011.

- [19] A. Curti, «Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25<sup>-</sup> into CD25<sup>+</sup> T regulatory cells,» *Blood*, vol. 109, n. 7, pp. 2871-2877, 2007.
- [20] F. Mussai, «Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment,» *Blood*, vol. 122, n. 5, pp. 749 - 758 , 2013.
- [21] L. Galluzzi, «Cell death modalities: Classification and pathophysiological implication,» *Cell Death and Differentiation*, vol. 14, n. 7, pp. 1237-43, 2007.
- [22] J. Kerr, «Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics,» *Br J Cancer*, vol. 26, n. 4, pp. 239-257, 1972.
- [23] R. Gonzalez-Polo, «The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death,» *J Cell Sci*, vol. 118, n. 14, pp. 3091-3102, 2005.
- [24] A. Edinger, «Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy,» *Curr Opin Cell Biol*, vol. 16, n. 6, pp. 663-669, 2004.
- [25] N. Casares, «Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death,» *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 202, n. 12, pp. 1691-1701, 2005.
- [26] D. R. Green, «Immunogenic and tolerogenic cell death,» *Nature Reviews Immunology* , vol. 9, pp. 353-363, 2009.
- [27] A. Tesniere, «Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin,» *Oncogene*, vol. 29, n. 4, pp. 482-491, 2010.
- [28] H. Inoue, «Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments,» *Cell Death and Differentiation*, vol. 21, n. 1, pp. 39-49, 2014.
- [29] G. Schiavoni, «Cyclophosphamide Synergizes with Type I Interferons through Systemic Dendritic Cell Reactivation and Induction of Immunogenic Tumor Apoptosis,» *Cancer research*, vol. 71, n. 3, pp. 768-78, 2011.
- [30] A. Tesniere, «Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm,» *Current opinion in immunology*, vol. 20, n. 5, pp. 504-11, 2008.
- [31] J. Fucikova, «Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response,» *Cancer Research*, vol. 71, n. 14, pp. 4821-4833, 2011.
- [32] E. Vacchelli, «Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers,» *Oncoimmunology*, vol. 1, n. 2, pp. 179-188, 2012.
- [33] N. Haynes, «Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept,» *Curr Opin Immunol*, vol. 20, n. 5, pp. 545-57, 2008.
- [34] M. Michalak, «Calreticulin: one protein, one gene, many functions,» *Biochemical Journal*, vol. 344, n. 2, pp. 281-292, 1999.
- [35] K. Nakamura, «Functional specialization of calreticulin domains,» *The Journal of Cell Biology*, vol. 154, n. 5, pp. 961-972, 2001.
- [36] P. Gelebart, «Calreticulin, a Ca<sup>2+</sup>-binding chaperone of the endoplasmic reticulum,» *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 37, n. 2, pp. 260-6, 2005.
- [37] E. Trombetta, «The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis,» *Glycobiology*, vol. 13, n. 9, pp. 77R-91R, 2003.

- [38] B. Gao, «Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin,» *Immunity*, vol. 16, n. 1, pp. 99-109, 2002.
- [39] W. Wang, «Calreticulin signaling in health and disease,» *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 44, n. 6, pp. 842-6, 2012.
- [40] T. Panaretakis, «Mechanism of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death,» *The EMBO Journal*, vol. 28, pp. 578-590, 2009.
- [41] M. Obeid, «Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death,» *Nat Med*, vol. 13, n. 1, pp. 54-61, 2007.
- [42] L. Zitvogel, «Immune response against dying tumor cells,» *Adv Immunol.*, vol. 84, pp. 131-79, 2004.
- [43] M. Obeid, «Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy,» 2007, vol. 220, pp. 22-34, Immunological Review.
- [44] L. Zitvogel, «Immunological aspects of anticancer chemotherapy,» *Bull Acad Natl Med. 2008 Oct;192(7):1469-87*, vol. 192, n. 7, pp. 1469-87, 2008.
- [45] G. Goodwin, «A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids,» *Eur J Biochem. 1973 Sep 21;38(1):14-9.*, vol. 38, n. 1, pp. 14-9, 1973.
- [46] R. Palumbo, «High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment,» *Biochem Pharmacol.*, vol. 68, n. 6, pp. 1165-70, 2004.
- [47] H. Wang, «HMGB1 as a Late Mediator of Lethal Systemic Inflammation,» *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 164, n. 10, pp. 1768-1773, 2001.
- [48] D. Messmer, «High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization,» *The Journal of Immunology*, vol. 173, pp. 307-313, 2004.
- [49] O. Kepp, «Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment,» *Cell Death and Disease*, vol. 14, n. 4, pp. 364-375, 2009.
- [50] P. Scaffidi, «Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation,» *Nature*, vol. 418, n. 6894, pp. 191-5, 2002.
- [51] C. Gardella, «The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle mediated secretory pathway,» *EMBO reports*, vol. 3, n. 10, pp. 995-1001, 2002.
- [52] L. Apetoh, «The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy,» *Immunological Reviews*, vol. 220, pp. 47-59, 2007.
- [53] E. Schmitt, «Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy,» *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 81, n. 1, pp. 15-27, 2007.
- [54] M. Jaattela, «Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells,» *International journal of cancer*, vol. 60, n. 5, pp. 689-93, 1995.
- [55] S. Gurbuxani, «Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells,» *Oncogene*, vol. 20, n. 51, pp. 7478-85, 2001.
- [56] R. Binder, «Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides,» *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, n. 16, pp. 6128-6133, 2004.
- [57] R. Spisek, «Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells:

- therapeutic implications,» *Blood*, vol. 109, n. 11, pp. 4839-45, 2007.
- [58] V. Salvestrini, «Purinergic signaling inhibits human acute myeloblastic leukemia cell proliferation, migration, and engraftment in immunodeficient mice,» *Blood*, vol. 119, n. 1, pp. 217-226, 2012.
- [59] I. Martins, «Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death,» *Cell death and differentiation*, vol. 21, n. 1, pp. 79-91, 2014.
- [60] O. Krysko, «Many faces of DAMPs in cancer therapy,» *Cell death and disease*, vol. 4, n. e631, 2013.
- [61] M. Idzko, «Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors,» *Blood*, vol. 100, n. 3, pp. 925-32, 2002.
- [62] D. Myrtek, «Chemotactic activity of extracellular nucleotides on human immune cells,» *Purinergic Signal*, vol. 3, n. 1, pp. 5-11, 2007.
- [63] A. La Sala, «Dendritic cells exposed to extracellular adenosine triphosphate acquire the migratory properties of mature cells and show a reduced capacity to attract type 1 T lymphocytes,» *Blood*, vol. 99, n. 5, pp. 1715-1722, 2002.
- [64] M. Elliott, «Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance,» *Nature*, vol. 461, n. 7261, pp. 282-6, 2009.
- [65] Y. Ma, «Anticancer Chemotherapy-Induced Intratumoral Recruitment and Differentiation of Antigen-Presenting Cells,» *Immunity*, vol. 38, n. 4, pp. 729-741, 2013.
- [66] F. Wilkin, «The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells,» *Journal of Immunology*, vol. 1661, n. 12, pp. 7172-7, 2001.
- [67] F. Marteau, «Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells,» *Journal of leukocyte biology*, vol. 76, n. 4, pp. 796-803, 2004.
- [68] L. Aymeric, «Tumor Cell Death and ATP Release Prime Dendritic Cells and Efficient Anticancer Immunity,» *Cancer Research*, vol. 70, n. 3, pp. 855-858, 2010.
- [69] S. Gebremeskel, «Concepts and mechanisms underlying chemotherapy induced immunogenic cell death: impact on clinical studies and considerations for combined therapies,» *Oncotarget*, vol. 6, n. 369, pp. 41600-41619, 2015.
- [70] F. Ghiringhelli, «Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors,» *Nature Medicine*, vol. 15, n. 10, pp. 1170-8, 2009.
- [71] C. Berthon, «In acute myeloid leukemia, B7-H1 (PD-L1) protection of blasts from cytotoxic T cells is induced by TLR ligands and interferon-gamma and can be reversed using MEK inhibitors,» *Cancer Immunol Immunother.*, vol. 59, n. (12), pp. 1839-49, 2010.
- [72] M. Keir, «PD-1 and its ligands in tolerance and immunity,» *Annu Rev Immunol.*, vol. 26, pp. 677-704, 2008.
- [73] K. Tanaka, «PDL1 is required for peripheral transplantation tolerance and protection from chronic allograft rejection,» *J Immunol.*, vol. 179, n. 8, pp. 5204-10, 2007 .

- [74] Q. Zhou, «Program death-1 signaling and regulatory T cells collaborate to resist the function of adoptively transferred cytotoxic T lymphocytes in advanced acute myeloid leukemia,» *Blood*, vol. 116, n. 14, pp. 2484-93, 2010.
- [75] L. Zhang, «PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model,» *Blood*, vol. 114, n. 8, pp. 1545-52, 2009.
- [76] C. Chambers, «CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy,» *Annu Rev Immunol*, vol. 19, pp. 565-94, 2001.
- [77] D. Leach, «Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade,» *Science*, vol. 271, n. 5256, pp. 1734-6, 1996.
- [78] A. van Elsas, «Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied,» *J Exp Med*, vol. 190, n. 3, pp. 355-66, 1999.
- [79] P. Prieto, «CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma,» *Clin Cancer Res*, vol. 18, n. 7, pp. 2039-47, 2012.
- [80] J. Brahmer, «Harnessing the immune system for the treatment of non-small-cell lung cancer,» *J Clin Oncol. Mar 10*; vol. 31, n. 8, pp. 1021-8, 2013 .
- [81] A. Pérez-García, «CTLA-4 genotype and relapse incidence in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after induction chemotherapy,» *Leukemia*, vol. 23, n. 3, pp. 486-91, 2009.
- [82] A. Tonks, «CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia,» *Leukemia*, vol. 21, n. 3, pp. 566-8, 2007.
- [83] D. Damiani, «Clinical impact of CD200 expression in patients with acute myeloid leukemia and correlation with other molecular prognostic factors,» *Oncotarget*, vol. 6, n. 30, pp. 30212-21, 2015.
- [84] S. Coles, «The immunosuppressive ligands PD-L1 and CD200 are linked in AML T-cell immunosuppression: identification of a new immunotherapeutic synapse,» *Leukemia*, vol. 29, n. 9, p. 1952, 2015.
- [85] S. Coles, «Expression of CD200 on AML blasts directly suppresses memory T-cell function,» *Leukemia*, vol. 26, n. 9, pp. 2148-51, 2012.
- [86] S. Coles, «CD200 expression suppresses natural killer cell function and directly inhibits patient anti-tumor response in acute myeloid leukemia,» *Leukemia*, vol. 25, n. 5, pp. 792-9, 2011.
- [87] L. Gorczynski, «Evidence that an OX-2-positive cell can inhibit the stimulation of type 1 cytokine production by bone marrow-derived B7-1 (and B7-2)-positive dendritic cells,» *J Immunol*, vol. 162, n. 2, pp. 774-81, 1999.
- [88] M. Kisielow, «Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells,» *Eur. J. Immunol.*, vol. 35, pp. 2081-2088, 2005.
- [89] S. Blackburn, «Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection,» *Nat Immunol*, vol. 10, pp. 29-37, 2009.

- [90] M. Gandhi, «Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma,» *Blood*, vol. 108, n. 7, pp. 2280-2289, 2006.
- [91] C. Workman, «Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3),» *Eur J Immunol.*, vol. 32, n. 8, pp. 2255-2263, 2002.
- [92] L. Maçon-Lemaître, «The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells,» *Immunology*, vol. 115, n. 2, pp. 170-178, 2005.
- [93] J. Grosso, «LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems,» *J Clin Invest.*, vol. 117, n. 11, pp. 3383-3392, 2007.
- [94] O. Takikawa, «Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase,» *J Biol Chem*, vol. 261, p. 3648–3653, 1986.
- [95] A. Mellor, «Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation?,» *Immunol Today*. 1999 Oct;20(10):469-73., vol. 20, n. 10, pp. 469-73, 1999.
- [96] G. Frumento, «Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase,» *J Exp Med*, vol. 196, n. 4, pp. 459-68, 2002.
- [97] U. Grohmann, «Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO,» *Trends Immunol*, vol. 24, n. 5, pp. 242-8, 2003.
- [98] F. Fallarino, «T cell apoptosis by kynurenines,» *Adv Exp Med Biol*, vol. 527, pp. 183-90, 2003.
- [99] D. Munn, «GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase,» *Immunity*, vol. 22, n. 5, pp. 633-42, 2005.
- [100] A. Schmidt, «The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease,» *EMBO J*, vol. 17, n. 23, pp. 6924-31, 1998.
- [101] D. Munn, «Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism,» *Science*, vol. 281, n. 5380, pp. 1191-3, 1998.
- [102] L. Catani, «Decreased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in dendritic cells contributes to impaired regulatory T cell development in immune thrombocytopenia,» *Ann Hematol*, vol. 92, n. 1, pp. 68-78, 2013.
- [103] G. Brandacher, «Implications of IFN-gamma-mediated tryptophan catabolism on solid organ transplantation,» *Curr Drug Metab*, vol. 8, n. 3, pp. 273-82, 2007.
- [104] D. Munn, «Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance,» *J Clin Invest*, vol. 117, n. 5, pp. 1147-54, 2007.
- [105] A. Curti, «Acute myeloid leukemia cells constitutively express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase,» *Leukemia*, vol. 21, n. 2, pp. 353-5, 2007.
- [106] A. Curti, «The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology,» *Blood*, vol. 113, n. 11, pp. 2394-401, 2009.
- [107] A. Mellor, «IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism,» *Nat Rev Immunol*, vol. 4, n. 10, pp. 762-74, 2004.
- [108] O. Takikawa, «Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism,» *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 338, n. 1, pp. 12-

19, 2005.

- [109] S. Thomas, «Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway,» *Redox Rep*, vol. 4, n. 5, pp. 199-220, 1999.
- [110] G. Prendergast, «IDO recruits Tregs in melanoma,» *Cell Cycle*, vol. 8, n. 12, pp. 1818-1819, 2009.
- [111] M. Takao, «Increased synthesis of indoleamine-2,3-dioxygenase protein is positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of, ovarian cancer,» *Oncol Rep*, vol. 17, n. 6, pp. 1333-9, 2007.
- [112] G. Brandacher, «Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells,» *Clin Cancer Res*, vol. 12, n. 4, pp. 114-1151, 2006.
- [113] A. Curti, «Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing leukemic dendritic cells impair a leukemia-specific immune response by inducing potent T regulatory cells,» *Haematologica*, vol. 95, n. 12, pp. 2022-30, 2010.
- [114] Z. Fehérvári, «CD4<sup>+</sup> Tregs and immune control,» *J Clin Invest*, vol. 114, n. 9, pp. 1209-17, 2004.
- [115] M. Chamuleau, «High INDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) mRNA level in blasts of acute myeloid leukemic patients predicts poor clinical outcome,» *Haematologica*, vol. 93, n. 12, pp. 1894-8, 2008.
- [116] M. Ciciarello, «Nuclear reformation after mitosis requires downregulation of the Ran GTPase effector RanBP1 in mammalian cells,» *Chromosoma*, vol. 119, pp. 651-668, 2010.
- [117] M. Aluigi, «Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells,» *Stem Cells*, vol. 24, n. 2, pp. 454-461, 2005.
- [118] P. Pellegatti, «A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion,» *Mol Biol Cell*, vol. 16, pp. 3659-3665, 2005.
- [119] E. Adinolfi, «Accelerated tumor progression in mice lacking the ATP receptor P2X7,» *Cancer Res.*, vol. 75, n. 4, pp. 635-644, 2015.
- [120] C. Kanakry, «Early lymphocyte recovery after intensive timed sequential chemotherapy for acute myelogenous leukemia: peripheral oligoclonal expansion of regulatory T cells,» *Blood*, vol. 117, n. 2, pp. 608-617, 2011.
- [121] S. Reinke, «Terminally differentiated CD8<sup>+</sup> T cells negatively affect bone regeneration in humans,» *Sci Transl Med.*, vol. 5, n. 177, p. 177, 2013.
- [122] P. Pellegatti, «Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase,» *PLoS One*, vol. 3, n. 7, 2008.
- [123] M. Michaud, «Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice,» *Science*, vol. 334, pp. 1573-1577, 2011.
- [124] O. Kepp, «Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death,» *Oncoimmunology*, vol. 3, n. 9, 2014.
- [125] F. Di Virgilio, «P2X receptors and inflammation,» *Curr Med Chem*, vol. 22, pp. 866-877, 2015.

- [126] H. Bugaut, «Bleomycin exerts ambivalent antitumor immune effect by triggering both immunogenic cell death and proliferation of regulatory T cells,» *PLoS One*, vol. 8, n. 6, 2013.
- [127] D. Maccubbin, «Indomethacin modulation of adriamycin-induced effects on multiple cytolytic effector functions,» *Cancer Immunol Immunother.*, vol. 31, n. 6, pp. 373-380, 1990.
- [128] S. Mattarollo, «Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors,» *Cancer Res.*, vol. 71, n. 14, pp. 4809-4820, 2011.
- [129] Y. Ma, «Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy,» *J Exp Med.*, vol. 208, n. 3, pp. 491-503, 2011.
- [130] J. Perez-Gracia, «Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations,» *Curr Opin Immunol.*, vol. 27, pp. 89-97, 2014.