

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

BIOTECNOLOGIE CELLULARI E MOLECOLARI

Ciclo XX

Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/10

TITOLO TESI

**MARCATURA DI MOLECOLE BIOLOGICHE
A FUNZIONE ANTIGENICA PER LO STUDIO E LA
CARATTERIZZAZIONE DI PROTOCOLLI DI
VACCINOTERAPIA IN ONCOLOGIA MEDICA**

Presentata da: Valentina Ancarani

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. **Lanfranco Masotti**

Chiar.mo Prof. **Paolo Neyroz**

Esame finale anno 2008

INDICE	Pg.
1. INTRODUZIONE	1
1.1. CELLULE DENDRITICHE	1
➤ Caratteristiche principali	2
➤ Captazione dell'antigene	3
➤ Elaborazione dell'antigene	4
➤ Localizzazione	6
➤ Sottogruppi	7
➤ Maturazione	7
➤ Migrazione <i>in vivo</i>	8
➤ Applicazione in campo clinico	9
1.2. VACCINOTERAPIA NEL MELANOMA	10
1.3. VACCINOTERAPIA NEL MIELOMA MULTIPLO	11
1.4. MICROSCOPIA CORRELATIVA	12
2. SCOPO	14
3. MATERIALI E METODI	15
3.1. PURIFICAZIONE DELL'IDIOTIPO	15
3.2. MARCATURA FLUORESCENTE DELL'IDIOTIPO	15
3.3. MARCATURA DOPPIA DELL'IDIOTIPO	17
3.4. METODI DI VERIFICA DELLE MARCATURE	18
➤ Elettroforesi	18
➤ Calcolo del Grado di Coniugazione	20
3.5. ESTRAZIONE DEL LISATO TUMORALE	21
➤ Elettroforesi in gradiente	21
3.6. MARCATURA FLUORESCENTE DEL LISATO TUMORALE	22
3.7. COLTURA DI CELLULE DENDRITICHE	22
3.8. CAMPIONI PER MICROSCOPIA DI FLUORESCENZA	23
3.9. CAMPIONI PER CITOFUORIMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA	23

4. RISULTATI E DISCUSSIONE	25
4.1. IDIOTIPO	
4.1.1. ESTRAZIONE E MARCATURA	25
➤ Estrazione	25
➤ Marcatura fluorescente	26
➤ Doppia marcatura	28
4.1.2. CINETICA DI CAPTAZIONE	30
4.1.3. LOCALIZZAZIONE	34
4.1.4. ANALISI FENOTIPICA DELLE CELLULE DENDRITICHE	36
4.2. LISATO TUMORALE	
4.2.1. ESTRAZIONE E MARCATURA	37
➤ Estrazione	37
➤ Marcatura fluorescente	38
4.2.2. CINETICA DI CAPTAZIONE	39
4.2.3. LOCALIZZAZIONE	45
5. CONCLUSIONI	52
6. BIBLIOGRAFIA	54

1. INTRODUZIONE

1.1. CELLULE DENDRITICHE

Nel campo dell'immunologia lo studio di antigeni e linfociti è stato per lungo tempo unico oggetto di attenzione, senza considerare che la mera presenza di queste due componenti non sempre conduce all'immunità. Una terza componente, rappresentata dalle cellule dendritiche (DC), che appartengono al sistema di cellule presentanti l'antigene (*Antigen Presenting Cells, APCs*), gioca il ruolo di iniziatore e di modulatore della risposta immunitaria [1]. Le DC sono capaci di stimolare in modo efficiente sia linfociti B che i linfociti T [2]. Le cellule B, precursori delle cellule secernenti anticorpi, sono capaci di riconoscere direttamente antigeni "nativi", attraverso recettori presenti sulle loro membrane. I linfociti T, invece, necessitano che gli antigeni vengano processati e presentati a loro da una APC. I recettori presenti sulle cellule T (TCR) riconoscono frammenti di antigeni legati alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) presente sulla superficie delle APC. Le proteine che legano i peptidi si distinguono in molecole MHC di classe I e molecole MHC di classe II, e sono in grado di stimolare rispettivamente linfociti T citotossici (CTL) e linfociti T helper (T_H) [1].

Localizzate in molti tessuti, le DC svolgono il ruolo di sentinelle mobili, in grado di catturare e processare antigeni, e in secondo luogo, di formare e distribuire sulla loro membrana citoplasmatica numerosi complessi peptide-MHC (**Figura 1**). Dal sito di contatto con l'antigene le DC migrano agli organi linfoidi, alla milza, ai tele linfonodi, dove stimolano e attivano cellule T specifiche per l'antigene [1].

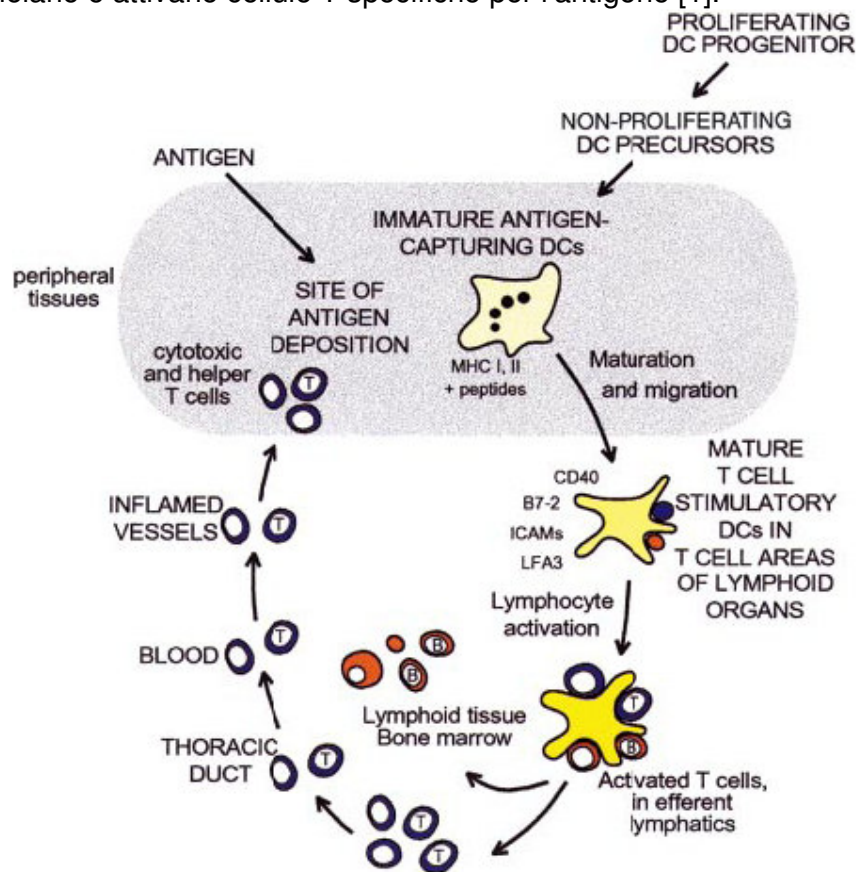


Figura 1

➤ **Caratteristiche principali**

Nessun'altra tipologia di cellula del sangue esibisce caratteristiche di forma e di motilità simili alle DC; ed è da queste peculiarità che deriva il termine "dendritica" (dal greco 'dendron', albero) [3]. Quando isolate e fissate su vetrino, le DC mostrano dendriti molti fini, che al microscopio elettronico, appaiono lunghi (0.10mm) e sottili. Quando vitali e visualizzate con microscopio a contrasto di fase, le DC stendono larghi e delicati processi o veli, che si estendono in molte direzioni.

La forma e la motilità delle DC rispecchiano le loro funzioni di captazione degli antigeni e selezione di cellule T antigene-specifiche. In particolare, si distinguono DC completamente differenziate, definite DC mature (mDC) che sono capaci di attivare il sistema delle cellule T, che a sua volta è in grado di completare la risposta immunitaria per interazione con altre cellule, come le cellule B per la formazione di anticorpi, i macrofagi per il rilascio di citochine, e con molecole bersaglio per la lisi. Si distinguono inoltre, DC non differenziate, denominate DC immature (iDC), che risultano molto meno potenti nel processo di stimolazione della risposta immunitaria, ma sono maggiormente specializzate nella captazione e nell'elaborazione degli antigeni, per formare i complessi MHC-peptide.

In sintesi, due sono le funzioni chiave svolte dalle DC, che si sviluppano in momenti diversi: la manipolazione degli antigeni come iDC e, a distanza di uno o due giorni, la stimolazione delle cellule T come mDC [1].

L'incapacità delle iDC di stimolare la risposta da parte delle cellule T è fondamentalmente legata alla mancanza di segnali accessori necessari, come CD40, CD54 e CD86 (**Figura 2**) [1].

D'altro canto, ad oggi non è ancora stata identificata una singola specifica molecola capace di spiegare l'efficacia delle DC nel legare e attivare le cellule T; tuttavia tali "effetti speciali" sembrano essere solo correlati ad aspetti quantitativi e al sistema di regolazione delle DC stesse. Per esempio, i prodotti MHC e i complessi MHC-peptidi [4] sono da 10 a 100 volte più numerosi sulle DC rispetto a qualsiasi altra cellula APC, come cellule B e monociti. Le mDC resistono agli effetti inibitori dell' IL-10, ma sintetizzano alti livelli di IL-12 [5-7] che aumenta sia l'immunità innata (cellule *natural killer*, NK) che l'immunità acquisita (cellule B e T). Inoltre le DC esprimono molte molecole accessorie che interagiscono con i recettori sulle cellule T [8,9] per aumentare l'adesione e la co-stimolazione, per esempio LFA-3/CD58, ICAM-1/CD54, B7-2/CD86 (**Figura 2**). Tutte queste proprietà come l' espressione di molecole MHC, di molecole di co-stimolazione e secrezione di IL-12, sono sovraespresse ad un giorno di distanza dall'esposizione a fattori di stress e danno, inclusi i prodotti microbici.

A seconda delle condizioni, le DC possono stimolare la crescita e l'attivazione di diverse tipologie di cellule T, che influenzano in modo diverso la risposta immunitaria. In generale, la comunicazione tra DC e cellule T sembra essere un dialogo piuttosto che un monologo nel quale le DC rispondono alle cellule T e viceversa [1].

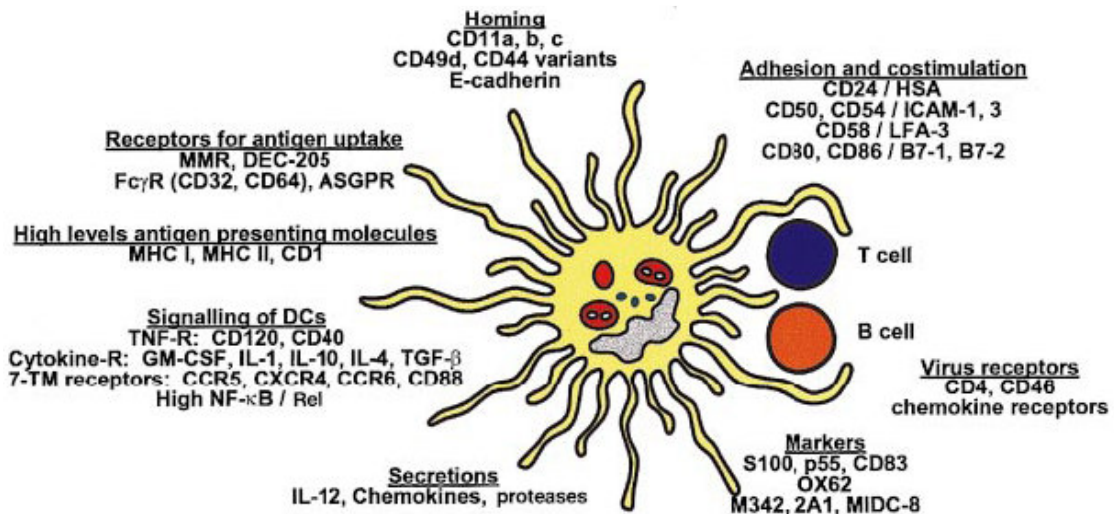


Figura 2 Alcune caratteristiche delle DC, comprese quelle espresse *ex vivo* a partire dai precursori. Alcune molecole indicate sono utilizzate per l'identificazione delle DC. Ad esempio, CD83, un membro della superfamiglia delle immunoglobuline; S 100b una proteina citosolica legante Ca; DEC-205 una multilectina nelle DC; anticorpi denominati M342, 2A1 and MIDC-8 che riconoscono antigeni nei granuli intracellulari di DC di topo.

➤ Captazione dell'antigene

Ma cos'è che rende una DC una buona APC? Le iDC sono dotate di almeno tre diversi sistemi che permettono la captazione e la successiva elaborazione dell'antigene. Primo, possono inglobare particelle e microbi per fagocitosi [33-38]. Secondo, possono formare larghe vescicole pinocitotiche nelle quali i fluidi extracellulari e i soluti vengono campionati, in un processo chiamato macropinocitosi [38]. Terzo, possiedono un sistema d'endocitosi specializzato [39,40], con diversi recettori che mediano la captazione dell'antigene. Molti di questi recettori sono lectine con capacità di riconoscimento dei carboidrati [41]. Alcuni recettori, come LY75 (DEC-205/CD205) e recettori per il mannosio MRC1/CD206, sono proteine transmembrana con domini multipli contigui di lectina. La maggior parte dei recettori finora conosciuti, come DC-SIGN/CD209, langerina/CD207, ASGPR, OLR1/LOX-1 [41] e CLEC4A/DCIR [21], è rappresentata da proteine di tipo II con un singolo dominio esterno di lectina.

La letteratura iniziale sulle DC diede per scontato la captazione dell'antigene, senza realizzare che il legame con i recettori per l'*uptake*, aumenta di circa 100 volte l'efficienza con la quale gli antigeni vengono distribuiti al sistema immunitario *in vivo* [43,44,24]. Indirizzare i vaccini a questi recettori delle DC potrebbe migliorare in modo significativo l'efficacia della mobilitazione delle cellule T.

Inoltre, la macropinocitosi e la captazione degli antigeni mediata da recettori rende la presentazione così efficiente che concentrazioni picomolari e nanomolari di antigene risultano sufficienti, a differenza di altre APC che impiegano livelli micromolari.

➤ Elaborazione dell'antigene

Una volta captato, l'antigene entra nella via endocitica della cellula. Nei macrofagi la maggior parte dei substrati proteici è diretta ai lisosomi, organelli con solo poche molecole MHCII, dove l'antigene è completamente digerito in amminoacidi. Questo non accade nelle DC, in cui nello stadio immaturo, si ha una larga produzione di complessi peptide-MHC II. Gran parte di questo successo probabilmente è dovuto alla presenza di compartimenti specializzati, ricchi di molecole MHCII (*MHC class II-rich compartments*, MIICs), particolarmente abbondanti nelle iDC [45-48]. I compartimenti MIIC sono strutture endosomiali tardive che contengono prodotti HLA-DM o H-2M, che aumentano e costruiscono il legame del peptide alla molecole MHCII. Durante la maturazione delle DC, i compartimenti MIIC si convertono in vescicole non lisosomiali che portano i complessi MHCII-peptidi, formati al loro interno, sulla membrana cellulare [48,49].

I meccanismi biochimici e le vie intracellulari responsabili della generazione dei complessi glicoproteici tra peptide e MHC, sono molto eterogenei ed hanno profonda influenza sulla specificità dell'immunità adattativa e della tolleranza, così come sul contesto e le conseguenze del riconoscimento dell'antigene ad opera delle cellule T nel timo e in periferia [50].

La via di presentazione dell'antigene ad opera di MHCI è attiva in quasi tutti i sistemi cellulari, dove provvede a mostrare in superficie i peptidi formati dalle proteine che continuamente vengono sintetizzate nella cellula. Pertanto, il proteoma interno consente il meccanismo di "sorveglianza" da parte delle cellule T CD8+ (citolitiche), che hanno la capacità di riconoscere e uccidere le cellule che esprimono proteine virali o antigeni tumorali.

Al contrario, la via che coinvolge le molecole MHCII è costitutivamente attiva solo nelle APC, incluso le DC, cellule B, macrofagi e cellule epiteliali del timo. La formazione dei complessi peptidi-MHCII e l'espressione di molecole di co-stimolazione e citochine è altamente regolata, riflettendo il ruolo critico svolto dalle cellule T CD4+ nella regolazione di quasi tutti i componenti dell'immunità adattativa. I peptidi presentati sulle molecole MHCII derivano da proteine che entrano selettivamente nei compartimenti endosomiali; questo consente alle cellule T CD4+ di rispondere ad antigeni esogeni che sono stati internalizzati dalle APC attraverso i meccanismi di endocitosi descritti in precedenza.

Per formare i complessi le proteine del sistema MHC di classe I e di classe II utilizzano domini strutturali di legame per il peptide molto simili (**Figura 3**) [51]. Per entrambe le classi, i peptidi sono principalmente inseriti in una solco di legame specifico e il peptide rappresenta una parte integrale delle proteina correttamente ripiegata. I peptidi sono trattenuti nel sito di legame da due tipi di interazioni non covalenti: primo, le interazioni sequenza-dipendenti tra le catene laterali dei peptidi (ancore) e i sottositi o tasche situate nel sito di legame per il peptide; secondo, una rete di ponti a idrogeno formati dagli amminoacidi non polimorfi delle proteine MHCII e le catene principali degli atomi che costituiscono i peptidi legati [50].

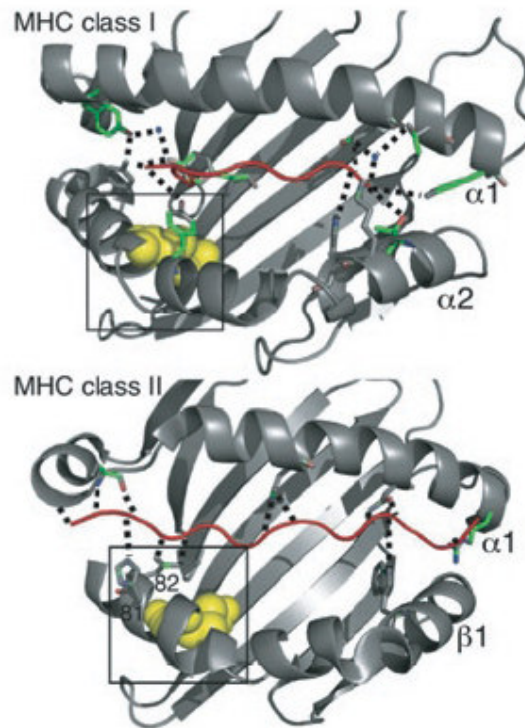


Figura 3 Domini di legame per i peptide delle molecole MHC di classe I e di classe II. I peptidi legati sono rappresentati in rosso; i ponti disolfuro sono in giallo. Le linee tratteggiate indicano i ponti a idrogeno tra le catene laterali degli aminoacidi della molecola MHC e i peptidi legati. Le regioni corrispondenti, rappresentate dal dominio $\alpha 2$ nella molecola MHC di classe I e dal dominio $\beta 1$ nella molecola MHC di classe II (sottolineati) possono rappresentare i bersagli per la regolazione dello scambio del peptide mediata da PD1 (MHC di classe I) o da HLA-DM (MHC classe II).

Le molecole MHC di classe I acquisiscono i peptidi durante l'assemblaggio iniziale nel reticolo endoplasmatico [52-54]. Peptidi corti vengono generati dal catabolismo di proteine endogene nel citoplasma attraverso l'azione di proteasomi e di altri enzimi, e successivamente vengono attivamente trasportati nel lume del reticolo endoplasmatico da trasportatori eterodimerici associati all'elaborazione dell'antigene, denominati TAP (*transporter associated with antigen processing*). La catena pesante dell' MHC I assembla prima la $\beta 2$ -microglobulina e poi il peptide attraverso una serie di orchestrati eventi che coinvolgono i componenti del complesso MHC I che carica i peptidi.

Al termine della fase di caricamento del peptide, le molecole MHC I vengono rilasciate dal complesso e vengono trasportate attraverso le cisterne del Golgi alla superficie cellulare attraverso la via di secrezione costitutiva.

L'eterodimero $\alpha\beta$ che costituisce le molecole di classe II conta su una chaperonina trans membrana specializzata di tipo II, denominata catena invariante (Ii), per un assemblaggio stabile nel reticolo endoplasmatico [55-57]. Ii contiene un segmento non strutturato che si incastra nel sito di legame per il peptide dell'MHC II, agendo da surrogato del peptide per stabilizzare la proteina. Il dominio citoplasmatico dell' Ii contiene un segnale di selezione e ritenzione endosomiale. Le molecole di classe II sono relativamente concentrate in compartimenti endosomiali tardivi multi vescicolari

e multi lamellari, MIIC. Il viene rilasciato attraverso una serie di eventi di taglio proteolitico che liberano l'eterodimero $\alpha\beta$ dalla porzione citoplasmatica terminale di Ii [50]. Questo evento lascia un piccolo peptide da Ii, denominato CLIP (*MHC class II-associated invariant-chain peptide*), legato alla tasca di legame del peptide, dove risulta protetto dall'azione delle proteasi. Ogni molecola MHC di classe II comincia con un proprio singolo peptide, il CLIP appunto, che deve essere rimpiazzato da altri peptidi nella via endosomiale per permettere al sistema di funzionare. Per molte molecole MHCII il grado di dissociazione di CLIP è troppo lento per permettere un caricamento del peptide quantitativamente rilevante prima della distribuzione alla superficie cellulare. L' HLA-DM, una chaperonina catalitica, ha una funzione chiave nell'accelerare il grado di rilascio di CLIP e lo scambio con il peptide nei compartimenti MHCII. HLA-DM è un eterodimero MHC di classe II non polimorfo che contiene un proprio segnale di bersaglio endosomiale. Non lega peptidi, ma interagisce direttamente con i complessi MHCII-peptidi per facilitare lo scambio del peptide [50]. L'insieme dei peptidi antigenici disponibili deriva essenzialmente dall'azione di proteasi endosomiali su qualsiasi proteina esogena o endogena che ha accesso alla via endosomiale. Il meccanismo fisico che sta alla base dello scambio del peptide mediato dall'HLA-DM rimane non completamente chiarito.

È importante ricordare che recentemente diversi studi hanno dimostrato un ruolo attivo dell'autofagia, nel processo di elaborazione dell'antigene. L'autofagia è un processo che le cellule utilizzano per degradare le proteine citosoliche e o organelli per il riciclo degli amminoacidi. Tradizionalmente è stato considerato un processo non selettivo attivato principalmente da condizioni di danno.

In uno studio di recente pubblicazione è stata studiata la presentazione di un antigene virale nucleare di Epstein-Barr (EBNA-1) da parte del sistema MHCII. È stato dimostrato che il blocco dell'acidificazione lisosomiale porta all'accumulo di EBNA-1 in vescicole intracellulari positive per il trasportatore 1 associata a membrana dei lisosomi (LAMP-1) e colocalizza con la monodansilcadaverina, un marcatore fluorescente specifico per gli autofagosomi. Inoltre utilizzando un inibitore selettivo dell'autofagia la presentazione alle cellule T dell'antigene endogeno EBNA-1 ad opera delle molecole MHCII è ridotto dal 30 al 70%.

Da questo e altri studi il ruolo dell'autofagia, in particolare della macroautofagia, è stato rivisto, proponendolo come meccanismo costitutivamente attivo nelle APC, per i meccanismi che coinvolgono la presentazione degli antigeni, compresi quelli tumorali.

➤ Localizzazione

Come accennato in precedenza, le DC si trovano localizzate in molti punti dell'organismo, in particolare in quelli più esposti all'ambiente esterno, come pelle, faringe, esofago prossimale, vagina, ectocervice e le così dette superfici mucosali interne o interne del sistema respiratorio e gastrointestinale [10]. Questa peculiare localizzazione le rende il primo bersaglio di stimoli patogeni rilevanti.

La migrazione agli organi linfoidi è un processo guidato dalle chemochine [11,12], che può essere aumentato dalla vaccinazione. Recentemente uno studio eseguito su tessuti linfoidi integri ha mostrato come le DC creino un sistema intricato nelle aree ricche di cellule T, in cui sondano l'ambiente circostante attraverso la continua formazione e ritrazione dei dendriti [13] ed inoltre, mostrano gli antigeni necessari a iniziare risposte appropriate da parte di cloni di cellule T specifiche [14,15]. Ricerche

recenti hanno inoltre mostrato l'interazione delle DC nei tessuti linfoidi con altre classi di linfociti, con cellule B e cellule *natural killer* [1].

➤ Sottogruppi

Esistono diversi sottogruppi di DC, distinti per marcatori e funzioni [17]. Le DC 'plasmacitoidi', così denominate poiché simili dal punto di vista citologico alle plasma cellule deputate alla produzione di anticorpi, nel loro stato immaturo possono essere coinvolte nel processo di tolleranza. Per la maturazione queste cellule esprimono i recettori FcR così come il TLR7 e il TLR9. Quando legano e ingeriscono immunocomplessi contenenti DNA o RNA, esprimono livelli potenzialmente patogeni di interferone di tipo I [18,19]. Anche un secondo sottogruppo di DC, denominate 'mieloidi', produce interferoni di tipo I. Queste possono essere ulteriormente suddivise sulla base dell'espressione di certi marcatori e delle funzioni che svolgono nei diversi tessuti. Ad esempio, nel caso della cute, le DC localizzate nell'epidermide (cellule di Langerhans) esprimono *langerin/CD207* e *DEC-205/CD205/LY75* e inducono potenti risposte da parte delle cellule T *killer*. Alcuni tipi di DC localizzate nel derma esprimono *DC-SIGN/CD209* e *mannose receptor/CD206*; inoltre possono attivare le cellule B, stimolando così la formazione di anticorpi. Popolazioni distinte di DC che risiedono a livello della cute migrano ad aree linfonodali diverse [20]. Per questo motivo l'esito della vaccinazione a livello cutaneo può dipendere dalla lectina e dal sottotipo di DC che carica il vaccino. A livello della milza, nel topo, un sottotipo di DC esprime il DEC-205 ed è particolarmente efficiente per la presentazione crociata (*cross-presentation*) di antigeni sull'MHCI [21], incluse le cellule tumorali e per l'induzione della produzione di IFN- γ e cellule T helper 1 (T_{H1}) [22, 23, 24].

Un secondo sottotipo esprime DCIR2/CLEC4A4 e altre lectine e risulta più efficiente nel processo di elaborazione dell'antigene per la presentazione sulle molecole MHCII. Nei linfonodi che drenano i tessuti della mucosa, la presenza di una integrina, CD103/ITGAE, distingue un sottotipo di DC che presenta in modo crociato sulle molecole MHCII [25] ma che inoltre sintetizza acido retinoico per il differenziamento di FOXP3⁺ da parte delle cellule T regolatorie (T_{reg}) [26]. I sottotipi di DC comunicano gli uni con gli altri, per esempio le DC plasmacitoidi producono interferoni e molecole costimolatorie legate alla membrana che reclutano altre tipologie di DC per partecipare alla risposta immunitaria [27].

La produzione dei vari sottogruppi di DC è controllata allo 'stato stazionario' da FLT3LG (*cytokine FLT3 ligand*) [28,29], mentre durante gli stadi di infiammazione e infezione altre citochine come il GM-CSF mobilizzano quantità crescenti di DC derivate da monociti [30]. Allo stato non infiammatorio, le DC presenti nei tessuti linfoidi liberano cellule progenitrici dal midollo al sangue [31] ma non monociti [17,32]; anche se i monociti danno origine alle DC in alcuni tessuti non linfoidi nello stato non infiammatorio [32] e in molti siti durante l'infiammazione [17].

➤ Maturazione

La maturazione delle DC è un evento cruciale per l'innescare della risposta immunitaria. Le DC differenziano e maturano in risposta a uno spettro di stimoli ambientali ed endogeni. Stimolano la maturazione delle DC prodotti infiammatori e microbici come batteri interi, LPS (componente della parete cellulare microbica) e citochine come IL-1, GM-CSF e TNF- α . Al contrario, altri segnali come l'IL-10 la

bloccano. La ceramide, che è indotta dai segnali di maturazione, può arrestare la captazione dell'antigene da parte delle DC.

La via di maturazione seguita aiuta a designare quale funzione linfocitaria verrà indotta e quali prodotti verranno generati dalle DC e dai linfociti [58,59]. Nello stato non infiammatorio in completa assenza di stimoli di maturazione, le DC possono indurre tolleranza quando catturano antigeni *self* o esterni [44]. Il mantenimento della tolleranza può richiedere il PD-L1/CD274 (ref.10) così come il FAS (ref. 93) sulle DC. A seguito di infezione o di altre cause che stimolano la maturazione, le DC si ridistribuiscono; ma non è ancora stato chiarito il motivo per cui il differenziamento sia così rapido ed esteso. Un fattore potrebbe essere l'alto livello di proteine della famiglia delle NFkB, in cui ogni membro della famiglia è in grado di controllare le diverse risposte delle DC.

La maturazione delle DC può indurre diversi tipi di cellule T CD4⁺, come T_H1, T_H2 o T_H17, ad aumentare la resistenza. Altri stimoli possono produrre DC definite "tolerogeniche", capaci di indurre silenziamento della risposta immunitaria per mezzo di Tr1 e FOXP3⁺ delle cellule T_{reg} [17]. Inoltre la maturazione esprime *in vivo* più IL-15, infiammazione attiva e cellule *natural killer*.

Quando le DC maturano in risposta a prodotti microbici, l'espressione di centinaia di geni è alterata, portando alla sintesi di citochine come per esempio, l'IL-12 e interferone di tipo I, che aumentano la resistenza innata e adattativa. Inoltre le citochine a loro volta possono indurre alcuni componenti del processo di maturazione delle DC. Le DC che entrano direttamente a contatto con i ligandi di origine microbica sono quelle più attive dal punto di vista immunologico. I tipi di citochine sono influenzati dalla tipologia e dalla modalità di attivazione delle DC. Diverse chemochine sono secrete a gruppi per volta, richiamando in successione cellule di tipologie differenti verso il sito di maturazione delle DC, ad esempio fagociti, linfociti T di memoria e linfociti T "nativi" (*naive*). Numerosi meccanismi inoltre ammortizzano la risposta delle DC nei confronti dei prodotti microbici. La maturazione regola l'elaborazione dell'antigene attraverso la diminuzione del pH delle vescicole endocitiche, l'attivazione della proteolisi e il trasporto dei complessi MHC-peptidi alla superficie della membrana.

È importante ricordare inoltre che la maturazione rimodella la superficie delle DC, mediante l'espressione di molte molecole di co-stimolazione associate alla membrana, tra cui membri delle famiglie B7, TNF e Notch. Un punto critico non ancora chiarito è la definizione dei cambiamenti nelle DC che collegano l'immunità innata con quella adattativa *in vivo*. La visione comune che la combinazione del complesso peptide-MHC (*signal one*) con alti livelli di B7-2/CD86 sia sufficiente a guidare l'immunità da parte delle cellule T, è troppo semplificata. Per influenzare il differenziamento delle cellule T, le DC hanno bisogno di produrre citochine come IL-12 e interferone di tipo 1; oppure recettori associati a membrana per la famiglia dei TNF, come CD40 e recettori per la linfo tossina (LT) ed inoltre membri della famiglia dei TNF, come CD70 e OX40L per indurre le cellule TH1 (ref. 38) e TH2 (ref.100), rispettivamente.

➤ **Migrazione *in vivo***

Come le DC conoscano la strada da percorrere è ancora sconosciuto. L' LPS stimola diversi tipi di cellule a produrre citochine e chemochine, per esempio GM-CSF, TNF- α , IL-1, MIP-1 α e β . Questi prodotti sono conosciuti come modulatori del processo di migrazione e maturazione delle DC. Un danno a cellule ricche di citochine, come i

cheratinociti o i mastociti, indotto da un antigene potrebbe avere come effetto il rilascio di mediatori precostituiti come GM-CSF, TNF- α e IL-4. Attualmente l'attenzione è focalizzata sui recettori a sette domini trans membrana accoppiati a proteina G, una famiglia di proteine in continua crescita, che include recettori per peptidi correlati al gene per calcitonina, C5 α e chemiochine. Questi peptidi e i loro recettori possono mediare molte delle fasi richieste per la migrazione e il bersagliamento delle DC: fuori uscita dal tessuto, movimento direzionato o chemiotassi e mantenimento della vitalità.

➤ **Applicazione in campo clinico**

Dato il loro ruolo centrale nel sistema di controllo dell'immunità, le DC rappresentano il bersaglio più logico per molte applicazioni cliniche che coinvolgono le cellule T: trapianto, malattie autoimmuni, resistenza a infezioni e tumori, immunodeficienza e vaccini [1].

Molte componenti tumorali non stimolano una risposta T antigene specifica nei pazienti, evento che potrebbe essere dovuto all'assenza di DC funzionali nei tumori. Nel cancro al colon e alle cellule basali della pelle sono state riscontrate DC infiltranti, prive di CD80 e CD86 [1], con ridotta attività di stimolazione delle cellule T. D'altra parte, i tumori possono secernere fattori come IL-10, TGF- β e VEGF (*vascular endothelial growth factor*), che riducono lo sviluppo e la funzione delle DC. Comunque sia, più le DC infiltrano il tumore migliore è la prognosi.

Nel repertorio del sistema immunitario sono comprese cellule T tumore reattive, specialmente i CTL, ma esiste una minima evidenza che queste cellule T siano attivate *in vivo*. Tuttavia, quando gli antigeni tumorali vengono caricati sulle DC *ex vivo* e le DC vengono successivamente reinfuse, si realizza una immunità specifica.

Negli animali così come nell'uomo questa strategia può condurre alla protezione contro i tumori ed anche a riduzione della massa tumorale. Sono stati considerati molti veicoli di trasporto degli antigeni alle DC: vettori virali, DNA nudo o plasmidico, RNA, liposomi con acido nucleico o proteina, lisati tumorali, cellule apoptotiche e peptidi.

A livello fisiologico, molte caratteristiche delle DC necessitano di essere studiate con dettaglio maggiore per consentire una manipolazione di successo del sistema immunitario. Quali segnali portano alla maturazione e alla migrazione delle DC, come fanno a sapere dove andare e come arricchiscono le aree linfatiche, le aree ricche di cellule T e B? quali sono i ruoli dei diversi sottotipi di DC, inclusi gli effetti sulle cellule B e la tolleranza? Le DC possiedono un repertorio più vasto di prodotti di secrezione rispetto a quello conosciuto fino ad ora? Inoltre alcuni di questi come l' IL-12, sono degli immunomodulatori? Infine, cosa determina se una DC stimola o al contrario deprime il sistema immunitario?

In generale è possibile affermare che sono quattro le caratteristiche specializzate delle DC che contribuiscono alla loro capacità di controllare il riconoscimento da parte delle cellule T e il grado di risposta e quindi o prevenire o generare malattia. 1 le DC sono posizionate per catturare gli antigeni causa di malattia e presentarli ai linfociti negli organi linfoidi, i siti per la generazione di immunità e tolleranza; 2 le DC hanno un sistema endocitico che è dedicato ai linfociti; 3 le DC differenziano o maturano in risposta ad uno spettro di stimoli , permettendo loro di portare risposte innate o adattative che sono potenti e qualitativamente legate all'agente causa di malattia; 4 le DC comprendono sottotipi che si differenziano tra loro in termini di localizzazione, presentazione degli antigeni e maturazione.

1.2. VACCINOTERAPIA NEL MELANOMA

Il melanoma è tra le tipologie di cancro più immunogeniche e molte strategie per aumentare l'immunità specifica e non specifica nei pazienti affetti da melanoma sono state esplorate in diversi studi clinici [61]

Come ampiamente descritto nei paragrafi precedenti le DC sono le sentinelle del sistema immunitario. È stato proposto che quando il tumore raggiunge una certa dimensione e causa un danno ai tessuti circostanti con il rilascio di prodotti dal microambiente, le DC localizzate sono attivate e di seguito il sistema immunitario è allertato [63]. Dipende dalla dimensione del tumore e dalle sue caratteristiche immunomodulatorie se il sistema immunitario è in grado di eradicare il tumore. Spesso la crescita del tumore è un processo lento e silenzioso che non genera un segnale di pericolo sufficiente a provocare l'attivazione del sistema immunitario.

L'obiettivo della vaccinazione con DC è quello di riparare alla mancanza di immunosorveglianza nei confronti della crescita tumorale, utilizzando DC "educate" *ex vivo*. La possibilità di generare DC su larga scala per usi clinici ha accelerato la ricerca clinica in questo campo e sono state riportate risposte cliniche e immunologiche in pazienti affetti da melanoma trattati con vaccinazione. In un lavoro di recente pubblicazione [64], sono stati riassunti i risultati e le modalità di diversi trial clinici, impiegati nel trattamento del melanoma metastatico (**Tabella 1**).

DCn culture method	Antigens	Ag-loading method	Route	No. pts	Clinical responses	Immunological response	Reference
IL-4/GM-CSF/FCS moDC	Tyrosinase, gp100, MART-1, MAGE-1, MAGE-3 or lysate	Peptides/lysate	in	16	2 CR, 2 PR	Not tested	[49]
IL-4/GM-CSF/FCS moDC	MAGE-3A.2, tyrosinase, gp100, MART-1 or lysate	Peptides/lysate	in	33	PR, 1MR, 6 SD	13	[93]
IL-4/GM-CSF moDC	MART-1, gp100	MHC-I peptides	iv	10	1 PR	1	[85]
IL-4/GM-CSF moDC	Autologous peptides	Autologous peptides	id	22	1 CR, 2 PR	Not tested	[96]
IL-4/GM-CSF moDC	Lysate	Lysate	id	14	1 PR, 1 SD	4	[91]
IL-4/GM-CSF moDC	MART-1, gp100, tyrosinase	MHC-I peptides	iv	16	1 CR, 2 PR, 2 MR	5	[76]
IL-4/GM-CSF moDC	MART-1	MHC-I peptides	id	4	1 CR ^b , 1SD ^b , 1 MR	4	[86]
IL-4/GM-CSF/FCS moDC	Lysate	Lysate	In/sc	4	1 PR, 1 CR	3	[94]
IL-4/GM-CSF moDC	gp100/tyrosinase	MHC-1 peptides	s iv/id	9	-	-	[52]

Tabella 1 Risultati pubblicati di trial clinici che hanno impiegato vaccini con DC immature su pazienti con metastasi distali e grado di malattia valutabile. *Abbreviazioni:* IL, interleuchina; GM-CSF, fattore stimolante la crescita macrofagica; FCS, siero fetale; moDC, DC derivate da monociti; sc, sottocutaneo; in, intranodale; id, intradermico; iv, intravenoso; CR, risposta completa; PR, risposta parziale; MR, risposta mista; SD, malattia stabile(>4 mesi).

Come si può osservare dalla Tabella c'è molta eterogeneità nella procedura di allestimento di un vaccino, che coinvolge la natura delle DC (iDC o mDC), il cocktail di citochine utilizzato per la maturazione, il tipo di antigene caricato (RNA, DNA, peptidi, proteine, listai interi, residui apoptotici).

In generale si può affermare che la vaccinazione con DC ha dimostrato di essere praticabile e non tossica. Sono state osservate risposte immunologiche frequenti, così come sono state riportate risposte cliniche, anche se con incidenza bassa.

È cruciale a questo punto capire quali siano i passaggi critici nel processo di preparazione di un vaccino con DC. Necessitano di risposte domande attualmente aperte: qual è il metodo ottimale di maturazione, di caricamento dell'antigene, di somministrazione del vaccino; qual è la tipologia di DC migliore da impiegare.

In merito al tipo di antigene tumorale è importante ricordare che la forma di antigene scelta è uno dei parametri più importanti quando si delinea una strategia di vaccinazione, poiché influenza l'accesso ai sistemi MHCI e MHCII e quindi di indurre le risposte da parte delle cellule CD4+ e CD8+, rispettivamente.

Pertanto è fondamentale considerare anche altri fattori come la quantità di antigene da caricare, l'efficienza del caricamento, il tempo di contatto tra DC e antigene e il tempo necessario affinché venga presentato [67].

il lavoro condotto nella presente tesi è nato dalla necessità di chiarire alcuni di questi interrogativi, in particolare sulla fase di caricamento dell'antigene tumorale sulle DC.

1.3. VACCINOTERAPIA NEL MIELOMA MULTIPLO

Il Mieloma Multiplo (MM) è una malattia neoplastica della linfocitopoiesi B caratterizzata dall'accumulo nel midollo osseo di plasmacellule e di cellule B ad avanzato stadio di differenziamento dedicate alla produzione di una immunoglobulina monoclonale nel siero (comunemente IgG o IgA) o di sole catene leggere che vengono eliminate con le urine. L'immunoglobulina monoclonale nel MM rappresenta l'antigene tumore associato e viene denominata genericamente idiotipo (Id). Il MM è ancora una malattia ad esito mortale nonostante l'ampia varietà di opzioni chemioterapiche. Per i pazienti affetti da MM, l'uso di terapie ad alte dosi seguite da trapianto di cellule progenitrici del sangue periferico (PBPC) offre dei vantaggi rispetto alla terapia convenzionale classica. Nonostante questo, la maggior parte dei pazienti è recidivante dopo PBPC.

L'ID rappresenta nelle malattie linfoproliferative l'antigene paziente-specifico e come tale viene usato come *target* di una immunoterapia attiva e specifica.

Nel MM, le plasmacellule hanno scarsa o nulla espressione di Ig sulla membrana ed un alto livello di secrezione. Quindi è necessario indurre una risposta immunitaria anticorpo-mediata che non venga bloccata dall'alto titolo di ID circolante, e che non dipenda dall'espressione dell'intera proteina idiotipica sulla superficie delle cellule mielomatose, necessaria invece per una citolisi anticorpo mediata.

La risposta immunitaria anti-ID T-mediata infatti non riconosce l'intera proteina sulla membrana, ma è specifica per peptidi dell'ID processati intracellularmente e presentati con le molecole del MHC di classe I (cellule CD8+) e di classe II (cellule CD4+). Quindi il vantaggio di stimolare una risposta cellulare T è rappresentato nel

MM dal fatto che essa non è bloccata dall'ID circolante e non è dipendente dall'espressione dell'intera proteina dell'ID sulla membrana. Quindi la strategia ottimale per una vaccinoterapia contro il MM richiede attualmente lo stimolo di linfociti T-citotossici (CTL) specifici per peptidi tumore-specifici. Questo risultato può essere raggiunto attraverso l'uso di cellule specializzate nel presentare l'antigene (APC).

The adaptive immune system evolved to protect the host from infectious pathogens in part by evolving mechanisms to generate a diverse repertoire of antigen-specific T and B cells that can respond to almost any antigen to which they are exposed. The downside of such diversity is that the antigen-specific T and B cell repertoire contains cells able to recognize and attack the host's own tissues. However, such cells are controlled and prevented from responding to self tissues by several mechanisms that collectively render the immune system tolerant of these self antigens. Both immunity and tolerance are controlled by a network of professional APCs, the most important of which are known as DCs (1, 2).

Tissue-resident DCs that capture pathogen-encoded antigens are activated by stimuli generated in the course of a pathogen-induced inflammatory response. Activation of DCs occurs in two phases, maturation and licensing, and is an essential step that enables the antigen-loaded DCs to migrate to the draining lymph nodes where they can activate T cells that recognize the antigens they are presenting (cognate T cells) (3). Unlike infectious pathogens, tumors do not induce an effective inflammatory response conducive for optimal activation of DCs, and as a result the ensuing immune response is weak and ineffective. The primary purpose of vaccinating individuals with cancer is to overcome this "defect" by channeling tumor antigens into DCs and providing the conditions for their optimal maturation into potent immunostimulatory APCs.

1.4. MICROSCOPIA CORRELATIVA

Negli ultimi anni si è potuto assistere ad un impressionante impiego di tecniche microscopiche mirate a determinare una relazione struttura-attività seguendo i percorsi di specifiche molecole marcate con reagenti immunologici modificati con gruppi fluorescenti all'interno di cellule fissate, o in cellule vive mediante l'espressione di proteine specifiche legate geneticamente a residui fluorescenti, come ad esempio le varianti della *green fluorescent protein* (GFP)[26, 27, 28]. Queste tecniche hanno offerto importanti risultati per approfondire conoscenze di biologia molecolare e cellulare. Una grande quantità di nuove informazioni sulla struttura e funzione di molti organelli sono emerse studiando come, dove e quando, due o più fattori interagiscono tra loro, o come un determinato fattore si muove da un dominio ad un altro, o la tendenza con la quale alcune molecole proteiche si muovono attraverso il citoplasma o il nucleoplasma. A dispetto delle potenzialità e dell'enorme valore di queste tecniche di microscopia di fluorescenza, è chiara la necessità di approfondire e rivelare gli aspetti molecolari che sono all'origine di localizzazioni e interazioni intracellulari. La nuova frontiera delle tecniche d'indagine microscopica per riuscire a comprendere i meccanismi molecolari responsabili del complesso funzionamento cellulare è appunto rappresentata dallo sviluppo di metodiche a più elevata risoluzione. Risoluzione intesa non solo come parametro spaziale (per es. nell'intervallo dei μm o dei nm), ma anche come maggiore capacità investigativa delle relazioni morfologia/funzione a livello ultrastrutturale.

Al fine di caratterizzare specifici fattori all'interno delle ultrastrutture degli organelli cellulari sono state ampiamente utilizzati reagenti immunochimici marcati con oro, ma definire una localizzazione intracellulare, orientandosi nel ristretto campo microscopico della microscopia elettronica, è difficile se non impossibile. L' utilizzo della microscopia correlativa permette di stabilire una connessione tra la mappa spaziale, ottenuta in un campo allargato (evidenziabili con la microscopia di fluorescenza), e le basi ultrastrutturali fondamentali per l' organizzazione della mappa stessa (evidenziabili con la microscopia elettronica). In questo modo, la microscopia correlativa offre il vantaggio di osservare specifiche caratteristiche strutturali, o funzionali, a livello molecolare e *in situ*, all'interno della singola cellula o di una popolazione di cellule [61].

Inoltre, la microscopia di fluorescenza e quella elettronica possiedono altre caratteristiche complementari per quello che riguarda gli studi a livello cellulare. Grazie alle moderne tecnologie di fluorescenza è infatti possibile ottenere immagini anche di un singolo fluoroforo con un'alta risoluzione temporale, permettendo la risoluzione di importanti informazioni sulle cinetica di cellule vive. Ciò nonostante, questi vantaggi vengono offerti all'interno di una risoluzione spaziale limitata ai 400-500 nm.

Al contrario, la microscopia elettronica permette di ottenere una elevatissima risoluzione spaziale ma solo per ciò che riguarda immagini statiche, quindi non è applicabile a cellule viventi.

La microscopia correlativa rappresenta, quindi, il metodo più efficace per riuscire a combinare i vantaggi di queste due tecniche e collegare strutture e dinamiche cellulari [62]. Grazie all' applicazione di questa tecnica è stato possibile determinare l'esatta struttura e dimensione di organelli e intermedi intracellulari, nonché lo studio di molte caratteristiche dinamiche cruciali per le funzioni cellulari [63].

Visto la crescente importanza di questo tipo di metodologia, negli ultimi anni vi è stato un notevole aumento della ricerca di sonde tali da permettere una più semplice ed efficace applicazione della microscopia correlativa. Tra i primi tentativi vi fu la conversione del segnale fluorescente in una forma elettrone-densa attraverso la foto-ossidazione delle amminobenzidine. Un approccio alternativo alla microscopia correlativa fu tentato con lo sviluppo di sonde costituite da oro colloidale (utili per la microscopia elettronica) marcate con un fluoroforo [65]. Questa metodologia permetteva di ottenere sonde ideali per la microscopia correlativa con prezzi contenuti, ciò nonostante non venne molto utilizzata a causa della tendenza dell'oro colloidale a diminuire il segnale di fluorescenza, e della frequente dissociazione tra fluoroforo e la regione contenente oro.

Un notevole incremento delle potenzialità di questo metodo d'analisi si ebbe con la realizzazione di sonde che presentano sia una regione elettrone-densa (indispensabile per la microscopia elettronica) che un fluoroforo (necessario per la microscopia di fluorescenza), note sotto il nome di FluoroNanogold™. Tali sonde possiedono caratteristiche molto vantaggiose rispetto a quelle precedentemente usate:

- Il segnale fluorescente non risulta ridotto dalla vicinanza delle particelle d'oro;
- Il fluoroforo non presenta tendenza a dissociarsi donando così stabilità alla sonda;
- La capacità di penetrazione all' interno delle cellule di anticorpi marcati con FluoroNanogold™ risulta superiore a quella delle precedenti sonde utilizzate;

- La precisa relazione uno ad uno tra il segnale fluorescente e quello ottenuto grazie alle particelle d'oro con la microscopia elettronica, rende queste sonde ideali per una microscopia correlativa ad alta risoluzione.

In questa tesi è stato creato un prodotto utilizzabile in microscopia correlativa marcando un antigene tumorale (l'idiotipo del MM) direttamente con una sonda fluorescente e una elettrondensa. La scelta di non utilizzare un prodotto commerciale è stata indotta dalla necessità di creare una molecola di dimensioni ridotte per seguire i normali processi di elaborazione dell'antigene da parte delle DC e per evitare metodologie di riconoscimento indirette con anticorpi secondari.

Un aspetto comunque non secondario che limita l'utilizzo di queste sonde è il prezzo ancora molto elevato.

Nonostante l'indiscusso e riconosciuto valore della microscopia correlativa, le sue potenzialità non sono ancora state completamente esplorate.

2. SCOPO

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di creare degli strumenti d'indagine della captazione e della localizzazione di antigeni tumorali da parte delle DC, applicabili alle metodiche di allestimento di vaccini antitumorali, con lo scopo di aumentarne l'efficacia clinica.

In particolare, nella fase iniziale del progetto è stato oggetto di studio l'antigene tumore specifico del MM, che come già evidenziato nei paragrafi introduttivi, è rappresentato da una immunoglobulina monoclonale (prevalentemente IgG o IgA) definita idiotype. Questa ricerca è nata da una collaborazione avviata dal Prof. Neyroz della Sezione di Biochimica Farmaceutica del Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi" con l'Istituto di Ematologia e Oncologia medica "L. e A. Seragnoli" del policlinico S. Orsola di Bologna per la necessità. Questo studio nasce infatti dall'idea di mettere a punto un metodo standardizzato di purificazione dell'anticorpo monoclonale dal siero dei pazienti e da impiegare nell'allestimento di vaccini antitumorali autologhi. Le IgG e le IgA purificate, sono state modificate chimicamente, sia con una singola sonda fluorescente per applicazioni in microscopia di fluorescenza e citofluorimetria, sia con una sonda fluorescente ed una elettrondensa (nano-particella d'oro), per applicazioni in microscopia correlativa fluorescenza-elettronica.

In una fase successiva del dottorato, una seconda attività di collaborazione, sviluppata con il laboratorio di Immunoterapia e Terapia Cellulare dell'Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST) di Meldola (FC), si è affiancata a quella già in atto. Presso questo laboratorio pazienti affetti da melanoma in stadio avanzato vengono trattati con vaccini antitumorali autologhi allestiti con lisati interi estratti da tessuti tumorali, ottenuti per asportazione chirurgica.

Data la scarsità di informazioni disponibili sulla natura biochimica del lisato preparati ed utilizzati per l'allestimento dei vaccini, è stato avviato uno studio che impiega derivati fluorescenti del lisato, per acquisire informazioni utili a standardizzare la metodica attualmente impiegata. A questo scopo, l'esperienza acquisita con lo studio delle procedure di marcatura dell'anticorpo monoclonale è stata trasferita all'insieme di proteine che costituiscono il lisato. Come per l'anticorpo monoclonale, con i derivati fluorescenti del lisato sono state eseguite indagini in microscopia a fluorescenza e in citofluorimetria, per valutare i tempi e le quantità più opportune per la fase di stimolazione (*pulsing*), di cellule dendritiche.

3. MATERIALI E METODI

3.1. PURIFICAZIONE DELL'IDIOTIPO

La purificazione di immunoglobuline umane dal siero è stata condotta seguendo una metodica messa a punto nel nostro laboratorio che comprende i seguenti passaggi:

1. Precipitazione del siero in una soluzione satura di solfato d'ammonio (50%);
2. Centrifugazione della sospensione risultante a 12000 rpm per 30 min;
3. Centrifugazione del sedimento risospeso in tampone sodio fosfato a 12000 rpm per 10 min;
4. Dialisi del campione in tampone sodio fosfato 0.02 M pH 7;
5. Separazione cromatografica per affinità su proteina G;
6. Dialisi del non assorbito in tampone TRIS-HCl 0.02 M pH 7;
7. Separazione con cromatografia a scambio anionico;
8. Analisi SDS-PAGE.

In dettaglio, il siero del paziente, conservato a -20°C , è stato scongelato a temperatura ambiente e sottoposto a precipitazione in soluzione satura di solfato d'ammonio al 50%, a pH 6-7, aggiunta goccia a goccia in un rapporto 1:1 (v:v), mantenendo il campione in un bagno di ghiaccio e sotto continua agitazione. Nelle medesime condizioni è stato lasciato al buio per circa 18 ore a 4°C . In seguito la soluzione è stata centrifugata a 12000 rpm per 30 minuti a 4°C e il precipitato, contenente le IgG, una volta risospeso nel tampone di corsa cromatografico (tampone fosfato, Na_2HPO_4 0.02M pH 7.0) è stato sottoposto ad una seconda centrifugazione a 12000 rpm per 10 minuti. Il surnatante contenente le IgG è stato raccolto e dializzato in tampone fosfato sia per eliminare il solfato d'ammonio residuo, potenzialmente dannoso per la matrice della colonna cromatografica, che per avere il campione pronto per la successiva fase del processo di purificazione. La purificazione delle immunoglobuline da tutte le altre proteine sieriche, in particolare albumina, è stata eseguita utilizzando l'apparecchiatura BioLogic System (Bio-Rad Laboratories) e colonne Hi-Trap Protein G da 1 ml (Amersham Pharmacia Biotech). Come tampone di corsa è stato utilizzato tampone fosfato e tampone glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, 0.1 M pH 2.7) per l'eluizione. Il pH acido di questo secondo tampone rende necessaria l'aggiunta di NaOH o Tris-HCl a pH 8 per riportare la soluzione eluita e raccolta nelle frazioni ad un pH neutro, più adatto alla conservazione delle immunoglobuline. La colonna è stata infine riequilibrata con il tampone di corsa per riportarla alle condizioni iniziali e poter effettuare un successivo processo cromatografico. Alla fine dei processi la colonna è stata lavata con acqua ed etanolo per impedire lo sviluppo microbico.

3.2. MARCATURA FLUORESCENTE DELL'IDIOTIPO

Per la derivatizzazione delle molecole IgG monoclonali sono state impiegate due comuni sonde fluorescenti, la Fluorescina isotiocianato (FITC) e la Tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC). La reazione di coniugazione avviene tra il

gruppo isotiocianato della sonda e i gruppi amminici alifatici non protonati, interni e terminali della proteina. In **Figura 5** sono riportate le strutture chimiche di FITC (**A.**) e TRITC (**B.**) e lo schema di reazione (**C.**).

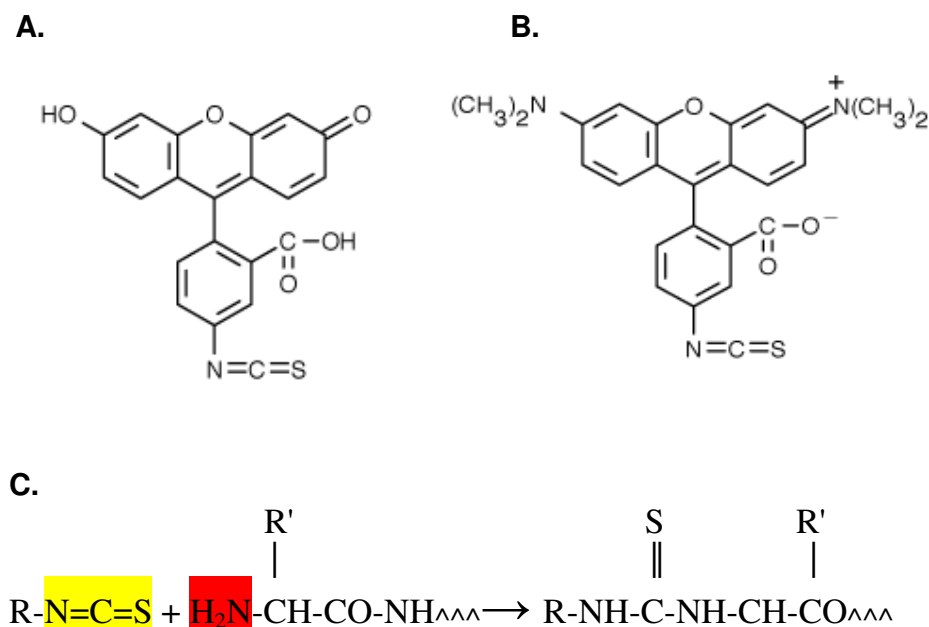


Figura 5 Strutture chimiche delle sonde fluorescenti utilizzate e schema di reazione con i gruppi amminici interni e terminali della proteina. **A.** struttura chimica della Fluoresceina Isotiocianato, FITC; **B.** struttura delle Tetrametilrodamina Isotiocianato, TRITC; **C.** reazione chimica di coniugazione tra il gruppo isotiocianato (giallo) della sonda fluorescente e il gruppo amminico della proteina (rosso)

Per la reazione di coniugazione è importante che il tampone in cui si trova la proteina non contenga gruppi amminici primari (es. Tris, glicina) che potrebbero competere per la reazione di coniugazione con la proteina. Inoltre, affinché reagiscano i gruppi amminici interni nella forma non protonata, avendo questi un valore di pK_a di circa 10.5, è opportuno che la reazione avvenga ad un pH basico.

Il campione è stato dializzato in tampone contenente fosfato di sodio 20 mM e NaCl 150 mM pH 7.5, addizionato di una soluzione 1 M di sodio carbonato (NaHCO_3) pH 8.5, in ragione del 10% rispetto al volume totale. La sonda fluorescente è stata preparata ad una concentrazione pari a 5mg/ml in dimetilsolfossido (DMSO), immediatamente prima dell'uso e al riparo dalla luce. Per ogni milligrammo di proteina sono stati aggiunti 100 μg di FITC, corrispondenti a 20 μl della soluzione stock e ad un rapporto mole/mole di circa 10-20 volte in eccesso della sonda. L'incubazione è stata eseguita al buio in agitazione, a temperatura ambiente per 2 ore.

La proteina coniugata è stata separata dalla sonda fluorescente libera, utilizzando una cromatografia di gel filtrazione su colonna Sephadex G-25. Come tampone di eluizione è stato utilizzato sodio fosfato 20 mM a pH 7. La prima banda fluorescente corrispondente alla frazione esclusa, rappresenta il coniugato; la seconda banda, che eluisce in un tempo maggiore, rappresenta la sonda che non si è legata.

Il rapporto finale molecole di sonda/molecola di proteina (grado di marcatura, D.O.L.) è stato calcolato secondo l'Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Haugland R.P., 2002).

3.3 MARCATURA DOPPIA DELL' IDIOTIPO

Il protocollo per la doppia marcatura di IgG è stato studiato considerando la presenza di gruppi amminici e di ponti disolfuro sulla stessa molecola. In **Figura 6** è riportata la struttura schematizzata di una immunoglobulina, in cui in rosso sono stati evidenziati i gruppi amminici terminali e in giallo i ponti disolfuro.

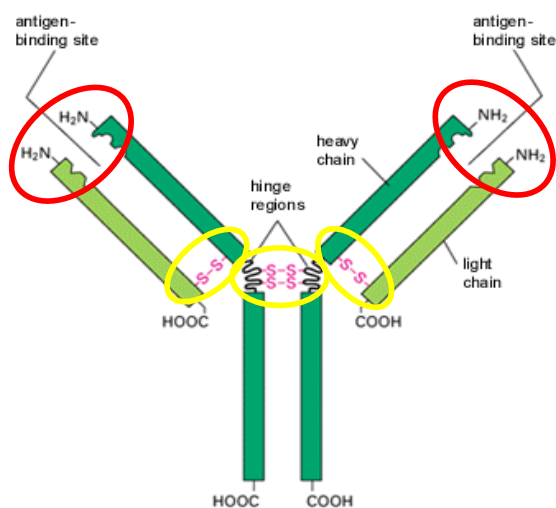


Figura 6 Rappresentazione schematica di una immunoglobulina. Si distinguono le catene pesanti (in verde scuro), le catene leggere (verde chiaro), i ponti disolfuro (evidenziati in giallo) e i gruppi amminici (evidenziati in rosso) nella porzione terminale, che rappresenta anche il sito di legame per l'antigene. In questa figura non sono stati evidenziati i gruppi amminici interni della proteina, che partecipano al legame con la sonda fluorescente.

Per la reazione di doppia coniugazione sono stati utilizzati un derivato elettrofilo della maleimide (NANOGOLD[®] Monomaleimide, Nanoprobes Inc.) in grado di reagire con i gruppi tiolici e un derivato fluorescente la fluorescina isotiocianato, che reagisce con i gruppi amminici della proteina. In **Figura 7** è riportata a destra la struttura della sonda NANOGOLD[®] impiegata e lo schema di reazione.

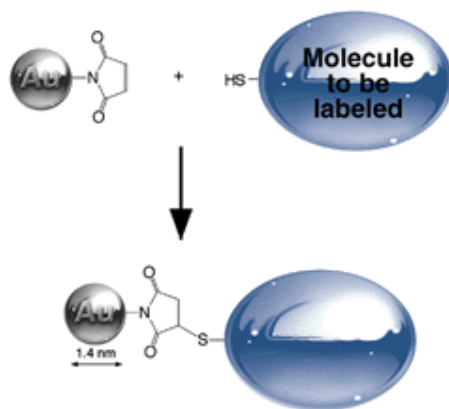


Figura 7 Schema di reazione tra il gruppo chimico Monomaleimide della sonda NANOGOLD[®] e il gruppo sulfidrilico (-SH) della proteina.

Per la riduzione dei ponti disolfuro a gruppi tiolici liberi, un campione di IgG monoclonali è stato sottoposto a dialisi in tampone contenente sodio fosfato 20 mM ed EDTA 5 mM a pH 6.0. a questo valore di pH i gruppi tiolici della proteina sono sufficientemente nucleofili per reagire in modo selettivo con il reagente senza competere con i gruppi amminici, che si trovano invece nello stato protonato e quindi non reattivo. Inoltre la presenza dell'EDTA riduce al minimo la possibilità di riformazione dei ponti disolfuro.

Al termine della dialisi per ridurre i ponti disolfuro delle proteine è stato impiegato il TCEP [Tris (2-carbossi-etil) fosfina], un agente riducente non volatile, inodore, resistente all'azione ossidante dell'aria che non contiene gruppi tiolici liberi, che possono competere con quelli della proteina per il legame con la sonda. Il TCEP è stato aggiunto in concentrazione 10 volte superiore rispetto a quella della soluzione contenente la proteina (5,7 μ M proteina/49 μ M TCEP), ed è stato incubato al buio per 1 ora a temperatura ambiente senza agitazione.

Al termine della reazione di riduzione, un vial contenente 6 nmol liofilizzate di monomaleimide nanogold è stato ricostituito in 20 μ l di isopropanolo e 180 μ l di acqua bi distillata. L'intero volume del reagente preparato è stato aggiunto alla soluzione contenente IgG ridotte e incubato over night a 4 °C.

Al termine dell'incubazione la sonda elettrodensa libera è stata separata dal coniugato utilizzando una colonna per cromatografia di gel filtrazione Sephadex G-25. Il tampone d'eluizione, Fosfato 20mM; NaCl 150 mM a pH 8.6, a questo valore di pH i gruppi amminici si trovano nello stato non protonato, per cui il campione è eluito pronto per la successiva reazione di coniugazione con la sonda fluorescente. Prima di procedere con la seconda fase di marcatura l'effettiva formazione del complesso proteina-sonda nanogold è stata verificata mediante gel elettroforesi con procedura modificata, e calcolo del grado di coniugazione, riportati nel paragrafo metodi di verifica.

Per il secondo stadio di marcatura al campione marcato con nano particelle d'oro sono stati aggiunti 20 μ l di una soluzione FITC/DMSO 5mg/ml per ogni mg di proteina presente. L'incubazione è stata condotta per 2 ore a temperatura ambiente in agitazione, al termine della quale la sonda rimasta libera è stata separata da quella coniugata utilizzando nuovamente la colonna per gel filtrazione.

Infine per verificare la marcatura fluorescente il campione è stato sottoposto a gel elettroforesi con rivelazione per transilluminazione e analisi spettrofluorimetrica.

3.4 METODI DI VERIFICA DELLE MARCATURE

➤ Elettroforesi:

La verifica della coniugazione della sonda fluorescente con la soluzione proteica è stata effettuata mediante separazione elettroforetica dei campioni su gel di poliacrilammide (13%) in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE), eseguita secondo la metodica di Laemmli (Laemmli,1970), successivamente visualizzato per transilluminazione in luce di fluorescenza. Per la verifica della marcatura della IgG con la sonda nanogold, la metodica di Laemmli che include l'uso di agenti riducenti e temperature elevate per la preparazione dei campioni, è stata modificata per evitare la degradazione delle nano particelle d'oro ad opera di questi fattori. I campioni contenenti la proteina marcata con oro sono stati preparati in un tampone di corsa (sample buffer) privo di 2-mercaptoetanololo, senza essere trattati a 100 °C. Terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato accuratamente lavato in acqua bi distillata per

➤ Grado di Coniugazione:

Per determinare l'efficienza della reazione di coniugazione è stato calcolato il rapporto tra molecole di sonda e molecola di proteina (*Degree of Labeling*, DOL), misurando l'assorbanza della proteina a 280 nm e l'assorbanza della sonda alla propria lunghezza d'onda massima, come descritto nell' *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (Haugland R.P., 2002).

Applicando la legge di Lambert-Beer ($A = \epsilon \times \lambda \times \text{mg/ml}_{\text{prot}}$) è stato possibile determinare il numero approssimativo di particelle di sonda che si sono legate per molecola di proteina, apportando un fattore di correzione (CF) dovuto all'assorbanza della sonda a 280 nm. Inoltre, è stato assunto che la reazione di coniugazione non modifica lo spettro d'assorbanza UV/visibile né della sonda né della proteina.

Per calcolare la concentrazione della proteina e della sonda sono state applicate le seguenti formule:

$$moli_{\text{prot}} = \frac{[A_{280} - (A_{\text{max}} \times CF)]}{\epsilon_{\text{prot}}}$$

dove:

A_{280} =valore di assorbanza a 280 nm della proteina coniugata

A_{max} =valore di assorbanza misurato a λ_{max} della sonda

ϵ_{prot} =coefficiente di estinzione molare della proteina ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)

$CF = A_{\text{sonda libera}} / A_{\text{max sonda libera}}$

in particolare:

$\epsilon_{\text{IGG}} = 230.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

$CF_{\text{FITC}} = 0.3$

$CF_{\text{TRITC}} = 0.3$

$CF_{\text{GOLD}} = 2.1$

$$moli_{\text{sonda}} = \frac{A_{\text{max}}}{\epsilon_{\text{sonda}}}$$

dove:

ϵ_{sonda} = coefficiente di estinzione molare della sonda ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)

in particolare:

$\epsilon_{\text{FITC}} = 68.000$

$\epsilon_{\text{TRITC}} = 65.000$

$\epsilon_{\text{GOLD}} = 155.000$

Il DOL è stato infine calcolato dal rapporto tra moli della sonda e moli della proteina:

$$DOL = \frac{moli_{\text{sonda}}}{moli_{\text{prot}}}$$

3.5. ESTRAZIONE DEL LISATO TUMORALE

Il pezzo operatorio di tessuto tumorale già isolato e pulito dal tessuto non tumorale (tessuto adiposo, connettivo, ecc.) e da cui è già stato asportato il materiale necessario per l'esame istologico, viene trasferito in una piastra di Petri di plastica da 15 cm e utilizzando forbici e bisturi viene ulteriormente pulito dall'eventuale materiale non tumorale.

Un prelievo delle dimensioni di un'agobiopsia viene inviato all'Unità di Anatomia Patologica per la conferma istologica e la valutazione della concentrazione di cellule tumorali. Il restante pezzo viene disgregato meccanicamente con l'ausilio di bisturi e forbici fino ad ottenere una poltiglia. Questa viene distribuita in un numero adeguato di contenitori da 100ml in una quantità appena sufficiente da coprirne il fondo. Si aggiungono 80 ml di una miscela enzimatica composta da ialuronidasi, collagenasi, DNAsi, denominata "enzyme mix" (Sigma Aldrich) e si inserisce un'ancoretta magnetica sterile per ciascun contenitore preparato. Si lascia ad incubare in agitazione a 37°C per 3 ore, in seguito si lascia sedimentare il materiale non disgregato in assenza di agitazione. Il materiale disgregato viene raccolto e distribuito in quantità non superiore a 45 ml in provette da 50 ml. Al materiale non completamente disgregato viene aggiunto un ulteriore volume di "enzyme mix" uguale a quello iniziale. Si lascia in agitazione (da 12 a 16 ore) a temperatura ambiente (23°C), infine si raccoglie tutto il materiale disgregato e si procede con la centrifugazione a 1000 x g per 10 minuti nelle provette da 50 ml. Si rimuove il sovrantante e si risospende il *pellet* con terreno RPMI 1640. Si ricentrifuga e si risospende il *pellet* come sopra. Infine si ricentrifuga e si risospende il *pellet* in H₂O distillata in rapporto 1:5 (v/v).

Si lascia in incubazione per 30 minuti a 4°C e si controlla al microscopio l'avvenuta lisi cellulare tramite colorazione vitale.

Se necessario si prolunga il tempo di incubazione di ulteriori 30 minuti (4°C).

Si controlla di nuovo la lisi al microscopio e in presenza di cellule vive si aggiunge il 20% di H₂O distillata e si lascia in incubazione per ulteriori 12-16 ore a 4°C.

Per separare il contenuto proteico dal restante materiale si esegue una centrifugazione a 1000 g per 10 minuti, si raccoglie il sovrantante e si filtra con filtri da 0,2 µm. Sul lisato si esegue un dosaggio proteico con il metodo di Bradford modificato.

➤ Elettroforesi in gradiente

Per i lisati analizzati, i mini gel abitualmente impiegati nell'elettroforesi monodimensionale SDS-PAGE non hanno garantito una separazione sufficiente delle bande proteiche, per questo motivo è stata impiegata una gel elettroforesi su gradiente di concentrazione di acrilamide (dal 7.5% al 20%).

I gradienti vengono allestiti facendo scendere con una pompa peristaltica, nel sito di polimerizzazione del gel, soluzioni di acrilamide ad alta (20%) e bassa (7.5%) concentrazione, dopo essere state poste in un formatore di gradiente.

In tabella è riportata la ricetta seguita per la preparazione delle due soluzioni necessarie a formare il gradiente del *resolving gel* è:

	7.5% (15 ml)	20% (15 ml)
LGB 4x	3.75 ml	2.5 ml
Glicerolo 75%	-	2.5 ml
Acqua	7.5 ml	-
Sol. Acrilamide 30%	3.75 ml	10 ml
TEMED	4.9 µl	3 µl
APS 10%	33.75 µl	25 µl

Per la preparazione della soluzione dello *stacking* gel è stata utilizzata la ricetta normalmente seguita per la preparazione dei mini gel per SDS-PAGE, volume preparato 10ml. Per la formazione dei pozzetti è stato utilizzato un pettine da 1.5 mm. A causa del lungo tempo di corsa il gel è comunemente sottoposto a due differenti condizioni in voltaggio costante: 30V (per il periodo notturno); 150V- 200V per completare la corsa.

3.6. MARCATURA FLUORESCENTE DEL LISATO

La procedura di marcatura del lisato è stata condotta nelle stesse condizioni descritte nel paragrafo sulla “marcatura anticorpo monoclonale”. Nel caso di lisati ricchi di residui cellulari che creano sedimento a seguito di centrifugazione, i campioni sono stati sonicati per 10 minuti prima di sottoporli a coniugazione. Questo passaggio garantisce uno scorrimento corretto del campione attraverso la colonna di gel filtrazione durante il passaggio di separazione della sonda libera da quella coniugata.

3.7. COLTURA DI CELLULE DENDRITICHE

Le DC sono state preparate a partire da monociti di sangue periferico (PBMC) ottenuto per leucoaferesi senza previa mobilizzazione. Per ogni raccolta sono stati processati da 5 a 9 litri di sangue. I PBMC sono stati purificati per gradiente Ficoll-Paque. Una aliquota di PBMC è stata immediatamente utilizzata per la generazione di DC, la parte restante è stata congelata per essere utilizzata in date successive.

I PBMC sono stati incubati in fiasche per coltura cellulare con terreno CellGro DC (Cell Genix, Freiburg, Germany) a 10×10^6 cellule/ml per 2 h. Le cellule non aderenti sono state scartate mentre le cellule aderenti sono state incubate in terreno CellGro DC addizionato di 1000 IU/ml di rhIL-4 (Cell Genix, Freiburg, Germany) e di 1000 IU/ml di rhGM-CSF (Schering-Plough, Milan, Italy) per 7 giorni per generare una popolazione arricchita di DC.

Al sesto giorno il 90% delle DC in coltura sono state stimolate con il lisato tumorale (100mg/ml), mentre il restante 10% è stato trattato con KLH (50mg/ml). Entrambe le colture sono state incubate overnight. Al settimo giorno le cellule vengono identificate come cellule dendritiche immature (iDC). Dopo aver eliminato il precedente terreno, iDC pulsate sono state tenute in coltura per ulteriori 2 giorni con un cocktail di citochine (TNF α , IL-1 β , IL-6, Endogen, Pierce Biotechnology, Rockford, USA; PGE $_2$, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Al nono giorno sono state definite cellule dendritiche mature (mDC).

Il fenotipo delle iDC e delle mDC è stato determinato mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali fluorescenti specifici per molecole human CD1a, CD14, CD80, CD86, HLA-DR (Becton Dickinson), CD83 (Immunotech, Marseille, France) e CCR7 (BD Pharmingen, Milan, Italy). La fluorescenza è stata analizzata con citometro a flusso FACS Canto (Becton Dickinson, Milan, Italy).

3.8. CAMPIONI PER MICROSCOPIA DI FLUORESCENZA

iDC e mDC pulsate con lisato o anticorpo monoclonale fluorescente sono state prelevate a determinati intervalli di tempo dalle fiasche di coltura e seminate su vetrini coprioggetto (24 Ø, #1, Menzel-Glaser), pretrattati con polilisina (Poly-D-lysine hydrobromide, MW 30,000-70,000, γ -irradiated, Sigma Aldrich).

Al termine del tempo necessario per l'adesione delle cellule al vetrino (circa 45 minuti), il terreno è stato eliminato e le cellule sono state lavate due volte con PBS.

Per i campioni destinati all'osservazione della localizzazione del lisato o dell'anticorpo all'interno delle cellule, i vetrini sono stati trattati con paraformaldeide al 3% per 15' a temperatura ambiente, successivamente con PBS/Glicina 1M con due lavaggi da 5 minuti ognuno ed infine con PBS. Per l'osservazione sono stati montati su vetrino portaoggetto con soluzione montante contenente DAPI (ProLong[®] Gold antifade reagent with DAPI, Molecular Probes[™], Invitrogen[™]).

Per la determinazione della natura delle strutture coinvolte nell'elaborazione del lisato all'interno delle DC, le cellule dopo essere state lavate con PBS, sono state fissate e permeabilizzate con metanolo freddo a -20°C per qualche minuto. Successivamente sono state lavate con PBS e incubate per 1h in soluzione PBS/BSA all'1% a 37°C. È stato poi aggiunto l'anticorpo primario sempre in soluzione PBS/BSA per 1h. Dopo due successivi lavaggi con soluzione PBS/BSA, i vetrini sono stati trattati con l'anticorpo secondario fluorescente coniugato al TexasRed sempre per 1h. Infine sono stati lavati con PBS e montati con ProLong[®] Gold antifade reagent e conservati a -20°C fino al momento dell'analisi.

Per l'osservazione dei vetrini sono stati utilizzati un microscopio a fluorescenza NIKON ECLIPSE 90i, software ACT-2U e microscopio confocale NIKON C1.

3.9. CAMPIONI PER CITOFLUORIMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

Per valutare la cinetica di captazione del lisato o dell'anticorpo fluorescente, sono state misurate la variazione d'intensità di fluorescenza all'interno delle cellule e quella dell'intensità di fluorescenza residua nel terreno.

A questo proposito, iDC in coltura sono state pulsate e dopo circa 18 h sono state maturate con il cocktail di citochine. Nell'arco di tempo tra il *pulsing*, la maturazione e dopo la maturazione ad intervalli prestabiliti, circa 1×10^6 cellule sono state prelevate e centrifugate a 2000 rpm per 10'. Il sovrantante è stato rimosso e centrifugato per due volte consecutive a 10000 rpm per 10', per eliminare residui cellulari in grado di interferire con la misura della fluorescenza relativa al lisato residuo nel terreno.

Il precipitato cellulare invece, è stato sospeso in 0.5 ml di tampone PBS e centrifugato a 5000rpm per 10'. Il sovrantante è stato scartato e il precipitato è stato fissato per aggiunta di paraformaldeide al 2% goccia a goccia e in agitazione continua. Dopo 15' di incubazione la paraformaldeide è stata eliminata centrifugando a 5000 rpm per 10', mentre il pellet è stato risospeso in 0.5 ml di PBS e mantenuto a 4°C.

L'analisi dei campioni cellulari è stata condotta mediante citometria a flusso utilizzando il citometro FACS Canto (Becton Dickinson, Milan, Italy) dotato di laser a 488 nm e i campioni sono stati analizzati utilizzando una acquisizione in scala logaritmica. L'acquisizione dei dati e l'analisi sono state effettuate utilizzando il software FACS DIVA (Becton Dickinson).

Per la misura dell'intensità di fluorescenza dei sovranatanti è stato utilizzato lo spettrofluorimetro PTI QuantaMaster C60/2000 (Photon Technology International, Inc., NJ). I campioni sono stati analizzati mediante una lunghezza d'onda di eccitazione di 492nm e registrando l'intero spettro di emissione da 495nm a 600nm. Le misure sono state eseguite utilizzando fenditure con una banda passante di 2.5nm.

4. RISULTATI

4.1. IDIOTIPO

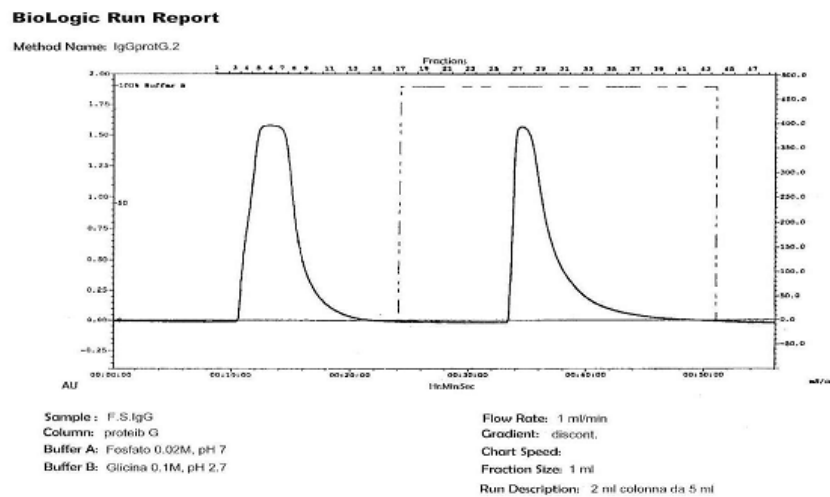
4.1.1. ESTRAZIONE E MARCATURA

➤ ESTRAZIONE

La purificazione di molecole IgG idiotipo a partire da siero di paziente affetto da MM, è stata condotta seguendo la metodica messa a punto nel nostro laboratorio in collaborazione con l'Istituto di Ematologia e Oncologia medica "L. e A. Seragnoli".

In **Figura 9** è presentata una tipica separazione cromatografica su proteina G, mentre in **Figura 10** è presentata l'analisi SDS-PAGE dei singoli passaggi della purificazione.

In sintesi, dalla prima sedimentazione è stato scartato il sovrantante e risospeso il pellet in tampone sodio fosfato 0.02 M a pH 7. Quest' ultimo è stato sottoposto alla seconda sedimentazione da cui si è ottenuto un pellet che rappresenta il prodotto di scarto e un sovrantante, contenente le IgG parzialmente purificate dalle altre proteine sieriche. Questo sovrantante è stato, quindi, sottoposto a dialisi e successiva purificazione finale per cromatografia d'affinità su proteina G.



XII

Figura 9 Cromatogramma relativo alla separazione su colonna d'affinità su proteina G delle IgG monoclonali. Il primo picco corrisponde al *washout*, cioè al campione contenente albumina e altre proteine non trattene dalla matrice della colonna, perché prive d'affinità per la proteina G; mentre il secondo picco è relativo all'eluito corrispondente alle IgG purificate.

La **Figura 10** rappresenta un gel riassuntivo dei singoli passaggi di purificazione. Nel pozzetto 1 sono stati caricati 0.5 μ l del siero del paziente prima della precipitazione in solfato d'ammonio: la serie di bande a diverso peso molecolare rappresenta l'insieme delle proteine sieriche. Nel pozzetto 2 sono stati caricati 2 μ l del sovrantante ottenuto dalla prima centrifugazione, in cui è possibile distinguere chiaramente una banda a circa 66 kDa corrispondente all'albumina sierica.

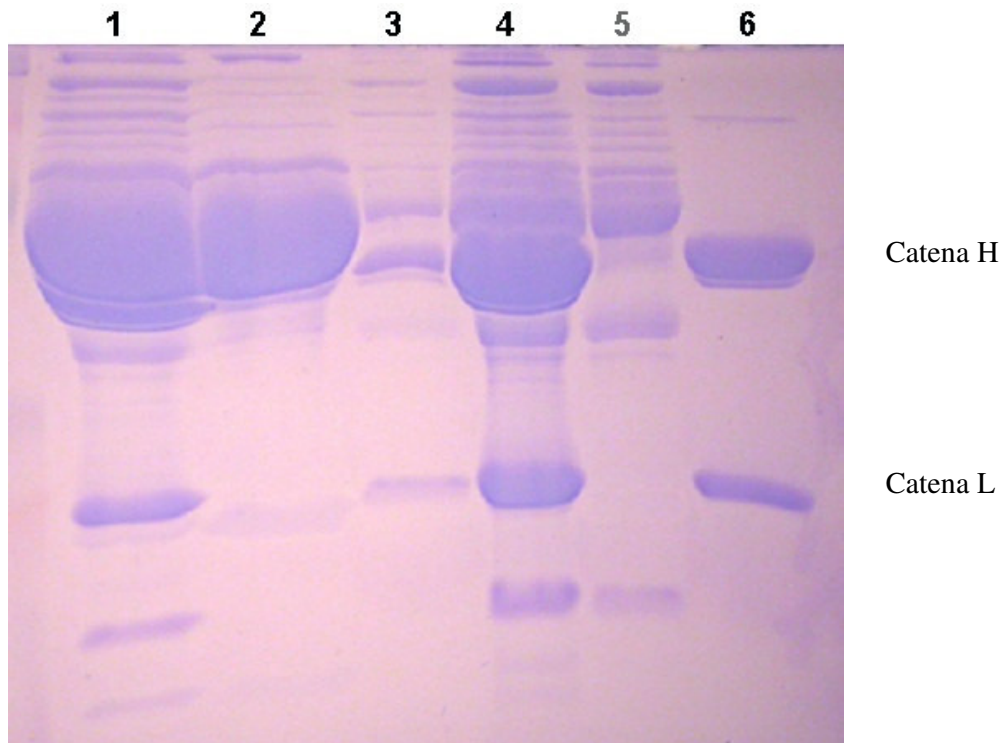


Figura 10 Gel elettroforesi SDS-PAGE al 15% di acrilamide riassuntivo dei passaggi di purificazione dell'anticorpo monoclonale a partire da siero di pazienti affetti da MM. Corsia 1 siero di partenza; corsia 2 albumina ed altre proteine ad alto peso molecolare; corsia 3 albumina e altre proteine ulteriormente scartate con le fasi di ultracentrifugazione; corsia 4 campione contenente immunoglobuline e altre proteine prima della cromatografia d'affinità; corsia 5 campione non trattenuto dalla colonna d'affinità su proteina G; corsia 6 campione trattenuto dalla colonna d'affinità corrispondente a IgG. In gel elettroforesi in condizioni riducenti le Ig si separano in catene pesanti (H) e catene leggere (L), come indicato in figura.

Nei pozzetti 3 e 4 sono stati caricati rispettivamente 2 e 3 μ l dei prodotti ottenuti dalla seconda centrifugazione, cioè il "pellet" risospeso in tampone fosfato e il sovrantante che rappresenta il campione prima della cromatografia su proteina G.

Nei pozzetti 5 e 6 sono stati caricati 5 μ l di due campioni corrispondenti rispettivamente al *washout* e all'eluato del processo cromatografico.

L'analisi SDS-PAGE è stata condotta in condizioni riducenti secondo la metodica di Laemmli (Laemmli 1970). Il 2-mercaptoetanol presente nel sample buffer idrolizza i legami disolfuro presenti all'interno della molecola IgG, che viene scissa in catene pesanti (H) di \approx 47 kDa e catene leggere (L) di \approx 24 kDa, come indicato nella figura.

➤ MARCATURA

La marcatura delle IgG con la FITC e la TRITC secondo le procedure riportate nella sezione Materiali e Metodi ha permesso di sintetizzare i derivati fluorescenti IgG-FITC e IgG-TRITC. L'analisi SDS-PAGE di tali prodotti è presentata in **Figura 11**. Il gel presenta la separazione elettroforetica dei campioni marcati e successivamente visualizzati per transilluminazione in luce di fluorescenza. Le bande verdi corrispondono ai derivati fluorescinati, mentre le bande arancioni indicano i derivati della tetrametilrodamina.

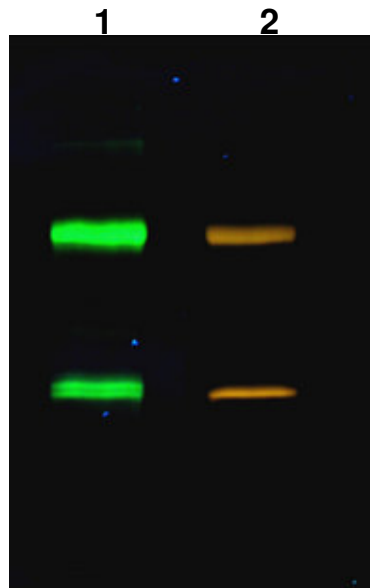


Figura 11 Gel elettroforesi SDS-PAGE dei derivati fluorescenti delle IgG purificate. Nella corsia 1 è stato caricato un campione di IgG coniugato con FITC, nella corsia 2 un campione di IgG coniugato con TRITC. Il gel è stato rivelato e fotografato per transilluminazione.

Inoltre, per valutare le caratteristiche spettrofluorimetriche delle IgG derivatizzate, sono stati misurati gli spettri di eccitazione e di emissione, presentati in **Figura 12**.

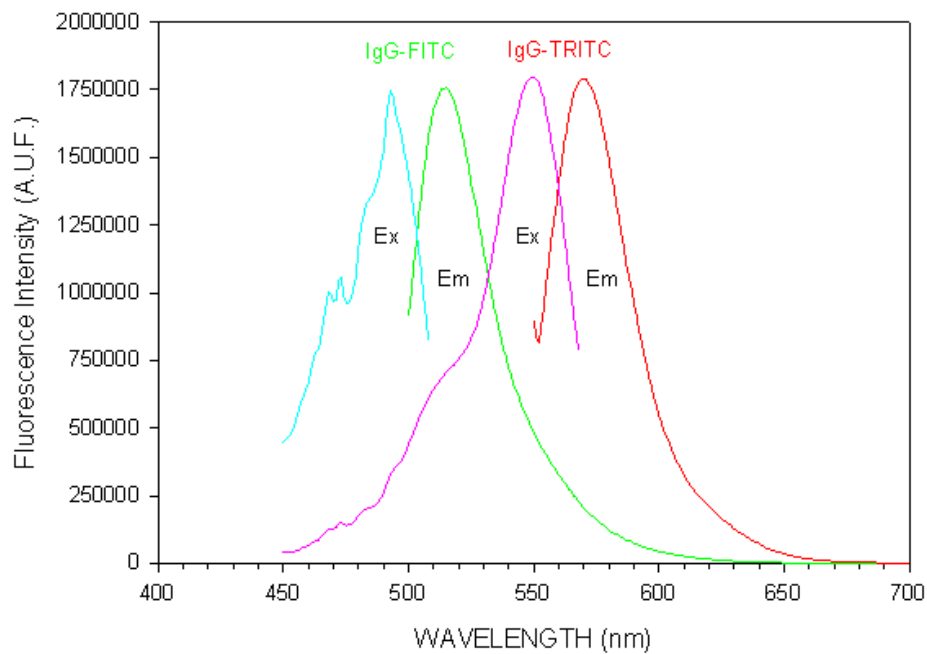


Figura 12 Rappresentazione degli spettri di assorbimento dei derivati fluorescenti delle IgG. A sinistra sono riportati gli spettri di emissione (verde) e di eccitazione (azzurro) delle IgG coniugate a FITC; a destra gli spettri di emissione (rosso) e di eccitazione (rosa) delle IgG coniugate a TRITC.

Per le IgG coniugate a FITC i valori massimi di lunghezza d'onda di emissione e di eccitazione misurati sono rispettivamente, 514nm e 494nm. Per le IgG coniugate a TRITC la lunghezza d'onda massima di emissione misurata è 580nm, mentre quella di eccitazione è 555nm. Le bande spettrali ottenute per i prodotti coniugati corrispondono a quelle delle originali sonde fluorescenti, mostrando caratteristiche fotofisiche simili; questo rende possibile il loro utilizzo per applicazioni in microscopia di fluorescenza convenzionale e confocale e in citofluorimetria.

➤ **DOPPIA MARCATURA**

Le IgG ottenute per marcatura con Monomaleimido-NanoGold sono state analizzate mediante gel elettroforesi con metodica di Laemmli modificata.

In **Figura 13** è mostrato il risultato dell'elettrotrasferimento di un campione di IgG marcate con Monomaleimido-NanoGold.

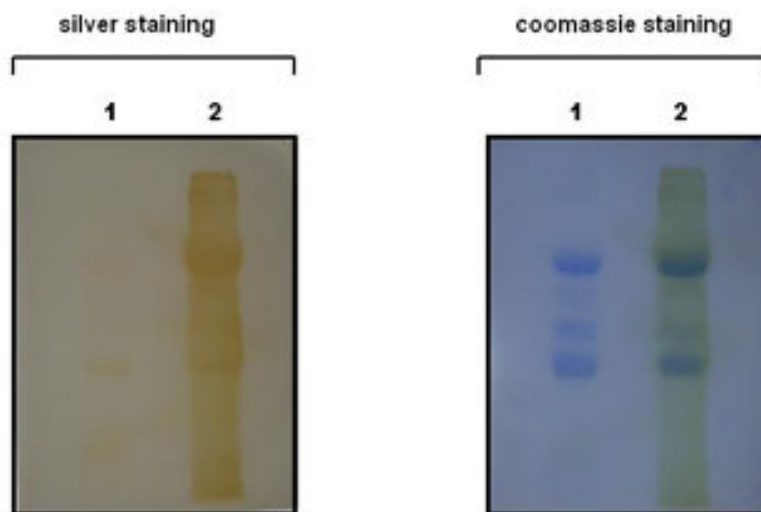


Figura 13 Gel elettroforesi di un campione di IgG marcate con una sonda Monomaleimido NanoGold. Nel gel a sinistra è stato caricato nel pozzetto 1 un campione di IgG non marcate (controllo) e nel pozzetto 2 un campione di IgG coniugato alla sonda Monomaleimido Nanogold. Le nano particelle d'oro sono state rivelate con LI Silver (bande color ruggine). A destra lo stesso gel è stato successivamente colorato anche con soluzione di Coomassie R-250 per rivelare le bande proteiche (bande blu).

In **Figura 13** nel gel riportato a sinistra sono stati caricati nel pozzetto 1 un campione di IgG non marcate preparate, secondo la metodica di Laemmli, in condizioni riducenti (*sample buffer* contenete 2mercapetanol e bollitura); mentre nel pozzetto 2 è stata caricata una frazione di IgG-Gold raccolta dalla colonna per gel filtrazione (Sephadex G-25), preparata con *sample buffer* privo di 2 mercaptoetanolo e senza bollitura per evitare la degradazione delle nano particelle d'oro. Al termine della corsa elettroforetica condotta a 150V costanti, il gel è stato accuratamente lavato in acqua bidistillata ed esposto a rivelazione con una soluzione fresca di *LI silver* per circa 1 minuto. Alla comparsa della colorazione brunastra il gel è stato

immediatamente immerso in acqua facendo più lavaggi per arrestare la colorazione. Per verificare la specificità della colorazione per le nano particelle d'oro, lo stesso gel è stato successivamente immerso in una soluzione di Coomassie blue per la rivelazione di tutte le bande proteiche, come riportato nel gel a destra in **Figura 13**.

È stata misurata l'assorbanza a 280nm e a 420nm (λ_{\max} della NanoGold) della frazione di IgG-Gold e successivamente questa è stata incubata con una soluzione di FITC 5mg/ml in DMSO per 2 ore a temperatura ambiente.

Al termine la sonda coniugata è stata separata da quella libera con colonna gel filtrazione (Sephadex G-25).

Sul campione ottenuto è stata misurata nuovamente l'assorbanza a 280 (λ_{\max} della IgG) quella a 494 (λ_{\max} della FITC) e l'intensità di fluorescenza con analisi spettro fluorimetrica.

Le misure di assorbanza e del grado di coniugazione (DOL) effettuate sulle sonde dopo la prima e la seconda fase di marcatura sono riassunti in **Tabella 2**, dove con IgG-Gold si intende il campione dopo la coniugazione con sonda nanogold e IgG-Gold-FITC, il campione IgG-Gold dopo la seconda marcatura con FITC.

	A₂₈₀	A₄₂₀	A₄₉₄	DOL
IgG-Gold	1.28	0.49	–	3.6
IgG-Gold-FITC	0.41	–	0.25	2.5

Tabella 2 Le misure di assorbanza delle IgG marcate con sonda NanoGold e con sonda NanoGold e FITC hanno rilevato un elevato grado di efficienza di doppia coniugazione della metodica messa a punto. È stata misurata l'assorbanza a 280nm e a 420nm per le IgG dopo il primo passaggio di marcatura (coniugazione con nano particella d'oro) e l'assorbanza a 280nm e a 494nm dopo il secondo passaggio di marcatura (coniugazione con FITC). Dai valori ottenuti sono state calcolate le molecole di sonda coniugate per molecola di proteina (DOL).

Il valore di DOL (3.6) ottenuto per la reazione di coniugazione tra i gruppi sulfidrilici della proteina e la sonda Monomaleimido NanoGold indica un alto grado di efficienza di reazione. Il DOL ottenuto dal legame delle molecole di FITC per molecola di IgG-Gold indica che la presenza della sonda all'oro sulla molecola ha interferito in minima parte con la reazione di coniugazione delle molecole di FITC ai gruppi amminici.

Per valutare l'eventuale interferenza delle nano particelle d'oro sulla reazione di legame della FITC con la proteina e le qualità spettroscopiche della proteina doppiamente marcata, il prodotto IgG-Gold-FITC è stato paragonato a un prodotto marcato solo con FITC. Quest'ultimo è stato ottenuto mantenendo invariati i fattori di reazione utilizzati per la doppia marcatura: concentrazione della soluzione proteica, volume, quantità di FITC aggiunta, tempo di coniugazione.

Il DOL calcolato per le IgG-FITC ha evidenziato un grado di coniugazione maggiore di molecole di FITC per molecole di proteina rispetto a quello del prodotto IgG-Gold-FITC: 3.8 delle IgG-FITC contro 2.5 delle IgG-Gold-FITC. Da questo dato si evince che la presenza delle particelle d'oro legate ai gruppi sulfidrilici interferisce, anche se in minima parte, con la reazione del gruppo isotiocianato della FITC, presumibilmente con i gruppi amminici interni della proteina. Inoltre, l'analisi spettro

fluorimetrica dei due campioni in esame, riportata in **Figura 14**, rivela una minore intensità di fluorescenza del prodotto IgG-Gold-FITC, ma una banda spettrale uguale a quella del prodotto IgG-FITC, mostrato in **Figura 14** dalla perfetta sovrapposizione dello spettro di emissione delle IgG-FITC (verde) con quello normalizzato delle IgG-Gold-FITC (tratteggiato nero).

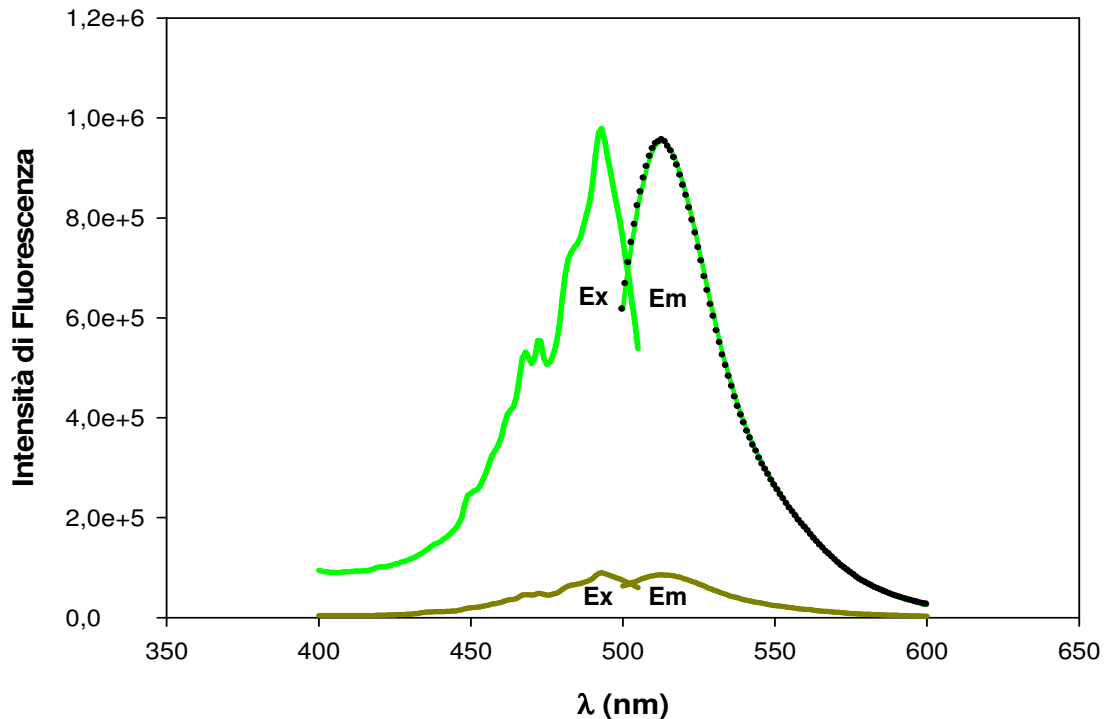


Figura 14 L'analisi spettrofluorimetrica del campione di IgG marcato con sonda NanoGold e sonda FITC ha mostrato caratteristiche spettroscopiche simili tra il prodotto doppiamente marcato (IgG-Gold-FITC) e quello marcato solo con FITC (IgG-FITC). In verde sono riportati gli spettri di emissione (Em) e di eccitazione (Ex) delle IgG-FITC, in oro gli spettri di emissione e di eccitazione delle IgG-Gold-FITC. La linea tratteggiata nera indica lo spettro ottenuto normalizzando i valori di emissione delle IgG-Gold-FITC per quelli delle IgG-FITC.

Nonostante l'efficienza di fluorescenza del prodotto IgG-Gold-FITC risulti minore di quella del prodotto IgG-FITC, il segnale misurato è sufficiente per applicazioni in microscopia correlativa.

4.1.2. CINETICA DI CAPTAZIONE

Uno dei parametri più rilevanti e dibattuti nella preparazione dei vaccini antitumorali è la fase di caricamento o "*pulsing*" delle iDC con l'antigene tumorale.

Con i derivati fluorescenti dell' idiotipo sono stati eseguiti esperimenti di cinetica per valutare il tempo necessario per la captazione dell'antigene.

Il grafico di **Figura 15** si riferisce ad un esperimento in cui iDC sono state pulsate con IgG-FITC ($50\mu\text{g}/10^6$ cellule) e valutate nell'intervallo tra 0 e 8h con prelievi a 15', 30', 45', 60', 90', 2h, 4h, 6h e 8h. L'intensità di fluorescenza dei campioni cellulari fissati è stata misurata con citofluorimetro FACS CANTO (Becton Dickinson), utilizzando

un'amplificazione logaritmica. I valori medi di fluorescenza sono stati riportati in grafico in funzione del tempo espresso in ore. Come si rileva dal grafico si ha un aumento di fluorescenza rilevante già nei primi 15' dal pulsing con un massimo a 60' che si mantiene pressoché costante fino alle 8h.

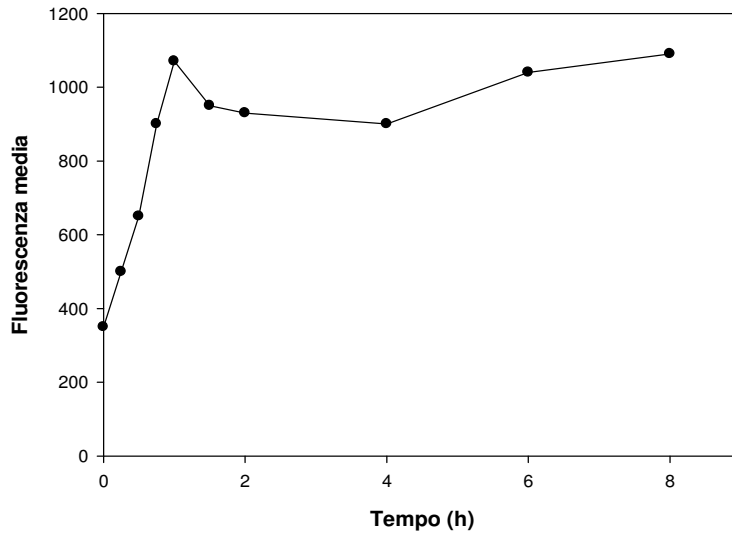


Figura 15 La cinetica di iDC caricate con IgG-FITC mostra un elevato grado di captazione entro le prime ore dal *pulsing*. iDC caricate con circa $50\mu\text{g}/10^6$ cellule di IgG-FITC sono state fissate in paraformaldeide al 2% e analizzate in citofluorimetria. A 1 ore dal *pulsing* si raggiunge un massimo di intensità media di fluorescenza che si mantiene nelle ore successive.

In un successivo esperimento condotto con iDC pulsate con IgG-FITC a $100\mu\text{g}/10^6$ cellule, l'intervallo di campionamento dal pulsing è stato allungato fino alle 34h. I dati ottenuti sono riportati in grafico di **Figura 16**.

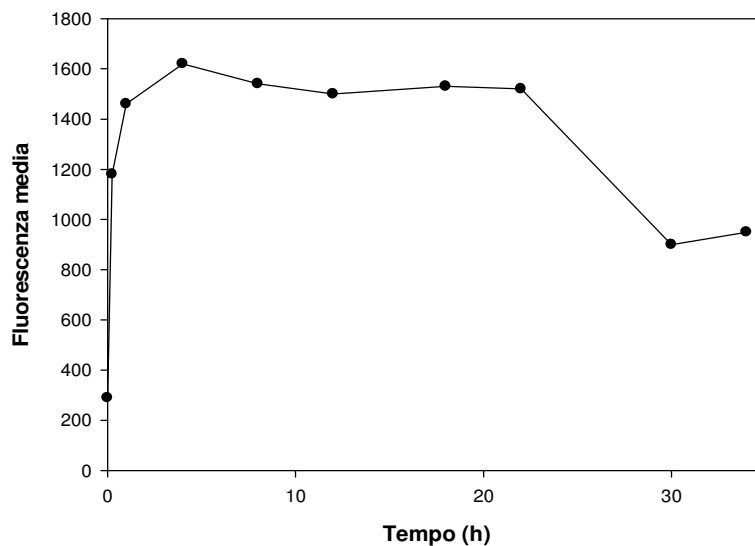


Figura 16 La cinetica di iDC caricate con IgG-FITC mostra un elevato grado di captazione entro le prime ore dal *pulsing*. iDC caricate con circa $100\mu\text{g}/10^6$ cellule di IgG-FITC sono state fissate in paraformaldeide al 2% e analizzate in citofluorimetria. I punti presenti in grafico corrispondono ai prelievi eseguiti a 0', 15', 30', 45', 60', 4h, 18h, 22h, 30 e 34h dal *pulsing*. Si osserva un rapido aumento di intensità di fluorescenza media entro i primi 60', che tende a mantenersi fino a 22h e poi diminuisce bruscamente da 22h a 30h.

I punti riportati corrispondono ai prelievi eseguiti a 15', 30', 45', 60', 4h, 18h, 22h, 30 e 34h. Come nel caso precedente si osserva un rapido aumento di fluorescenza nelle prime ore dal *pulsing*. In particolare, con una quantità doppia di anticorpo marcato ($100\mu\text{g}/10^6$ vs $50\mu\text{g}/10^6$), si osserva un netto aumento rispetto al controllo negativo nel primo campione esaminato (15'). Mentre non è stata valutata una variazione rilevante nell'intensità media di fluorescenza da 1h fino alle 22h, dopo tale periodo i campioni restanti mostrano una sensibile diminuzione di fluorescenza. In **Figura 17** sono riportati gli spettri ottenuti con il campione a 15' (B.) e il campione a 30h (C.) rispetto al controllo negativo (A.).

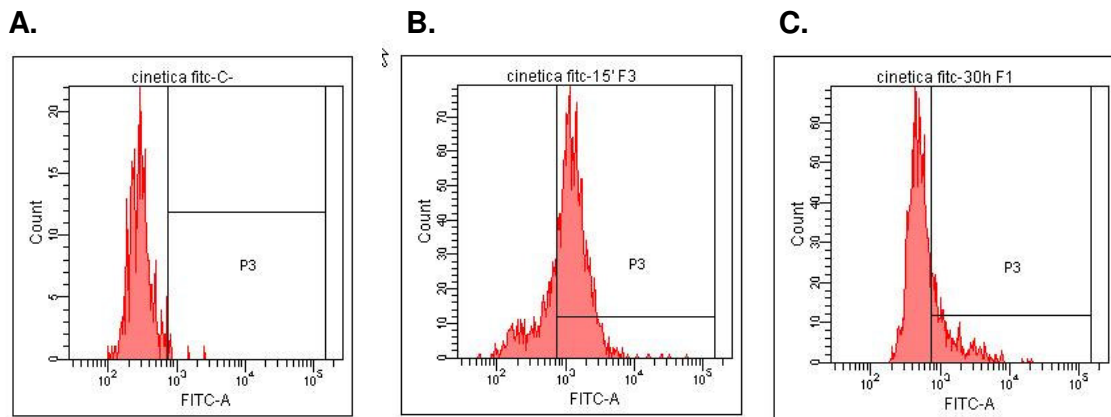


Figura 17 L'intensità media di fluorescenza misurata nelle iDC aumenta in modo significativo a 15' dal caricamento e diminuisce a 30h. **A.** Spettro di iDC non stimolate con IgG-FITC. **B.** Spettro di iDC a 15' dal caricamento con IgG-FITC a $100\mu\text{g}/10^6$ cellule. **C.** Spettri di iDC a 30h dal caricamento con IgG-FITC a $100\mu\text{g}/10^6$ cellule.

Durante lo stesso esperimento, in modo parallelo è stata valutata la variazione di intensità di fluorescenza cellulare in iDC sottoposte ad un *pulsing* di 18h e maturate con il *cocktail* di citochine. La variazione è stata seguita da 0 a 34h, dallo stimolo di maturazione e i campionamenti sono stati eseguiti, come per la cinetica delle iDC, ogni 15' da 0 a 1h; ogni 30' da 1h a 2h; ogni 2h da 2h a 14h; ogni 4h da 14h a 34h. I dati ottenuti sono stati riportati in **Figura 18**, in cui si rileva una importante diminuzione di intensità di fluorescenza entro le prime 10 ore dallo stimolo di maturazione.

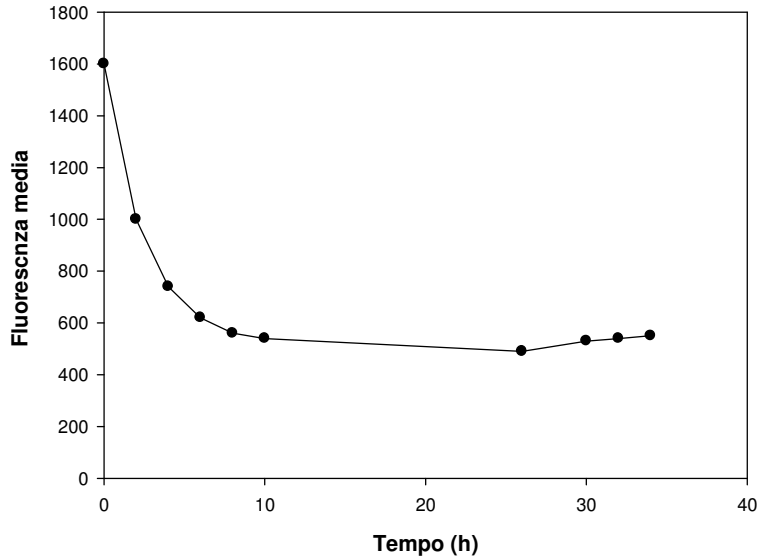


Figura 18 La cinetica di mDC mostra una elevata diminuzione di intensità di fluorescenza a 10h dallo stimolo di maturazione. iDC caricate con $100\mu\text{g}/10^6$ cellule di IgG-FITC a 18h dal *pulsing* (punto 0') sono state maturate con $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , PGE_2 e analizzate in citofluorimetria. I punti riportati corrispondono ai prelievi eseguiti a 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 26h, 30h, 32h e 34h dallo stimolo con *cocktail* di citochine di maturazione.

In **Figura 19** sono stati riportati tre spettri campione, relativi alla fluorescenza cellulare a 0' (A.), a 4h (B.) e a 34h (C.) dallo stimolo di maturazione.

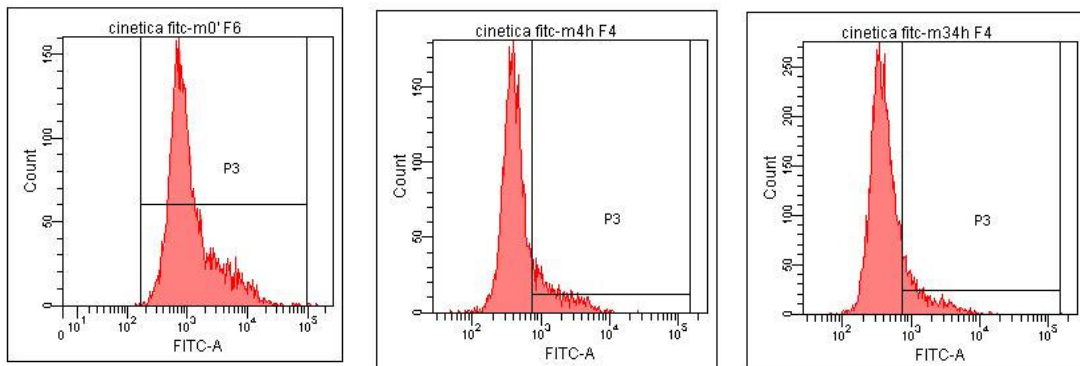
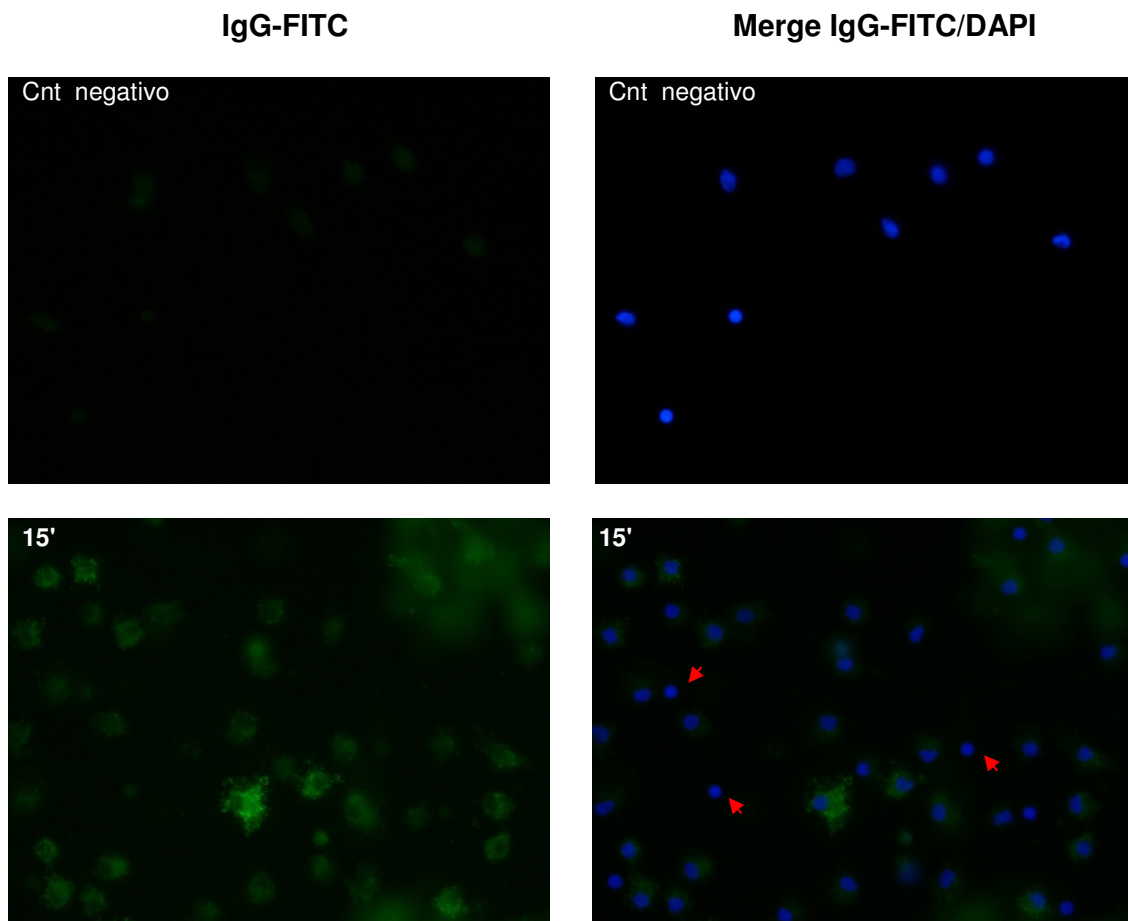


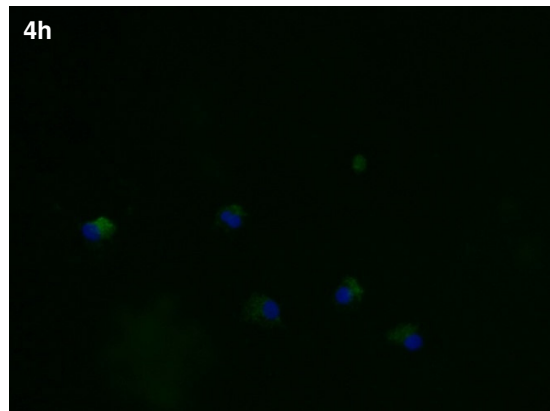
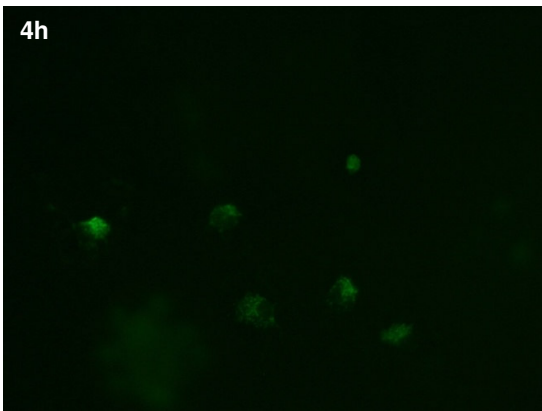
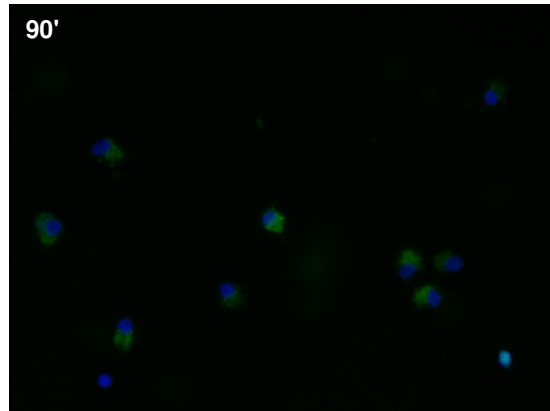
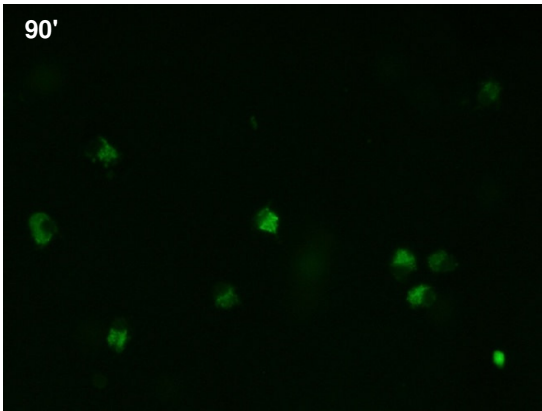
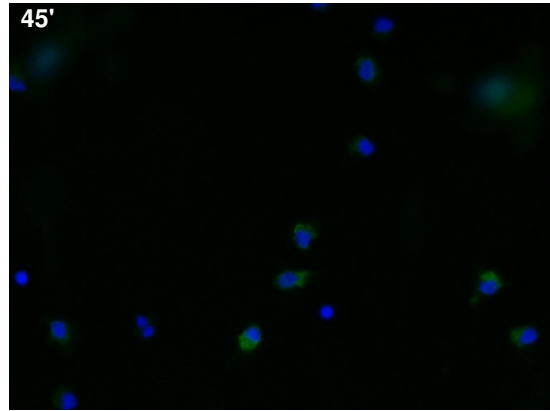
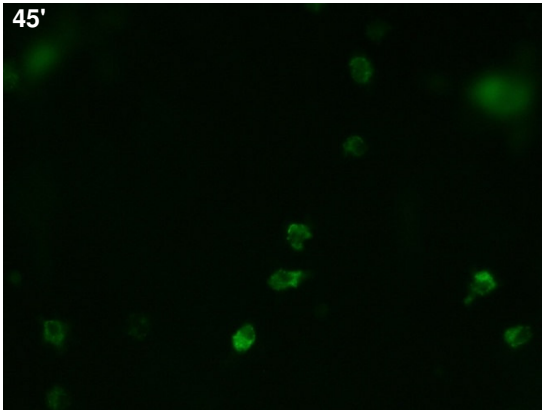
Figura 19 L'intensità media di fluorescenza misurata nelle mDC diminuisce in modo significativo a 4h dallo stimolo di maturazione. A. Spettro di iDC a 18h dal *pulsing* con IgG-FITC a $100\mu\text{g}/10^6$ cellule. B. Spettro di mDC a 4h dallo stimolo di maturazione. C. Spettro di mDC a 34h dallo stimolo di maturazione.

La diminuzione di intensità di fluorescenza cellulare che si osserva a seguito dello stimolo con le citochine di maturazione è presumibilmente legata ai meccanismi di elaborazione delle IgG-FITC da parte delle mDC. In un normale processo di presentazione dell'antigene, le mDC elaborano le proteine riducendole a peptidi per la formazione dei complessi MHCII e il successivo trasporto sulla membrana citoplasmatica.

4.1.3 LOCALIZZAZIONE

Dall' esperimento condotto per definire le cinetiche presentate in figura x e y, sono stati preparati anche i campioni per le indagini di microscopia di fluorescenza. I campionamenti sono stati eseguiti come per la citofluorimetria secondo lo schema seguente: ogni 15' da 0 a 1h; ogni 30' da da 1h a 2h; ogni 2h da da 2h a 14h; ogni 4h da 14h a 34h. In **Figura 20** sono riportate alcune delle immagini più significative. In particolare, la colonna di sinistra è formata dalle immagini delle iDC caricate con IgG-FITC corrispondente alla fluorescenza verde e prelevate ai tempi indicati; mentre, nella colonna di destra sono riportate le immagini ottenute per sovrapposizione (merge) delle corrispondenti, in cui è stato anche marcato il nucleo (blu) con il DAPI. Le immagini sono state ottenute con microscopio di fluorescenza NIKON ECLIPSE 90i, con obiettivo ad ingrandimento 60x, mantenendo Invariato il tempo di esposizione (1"); le sovrapposizioni sono state elaborate con software ACT-2U.





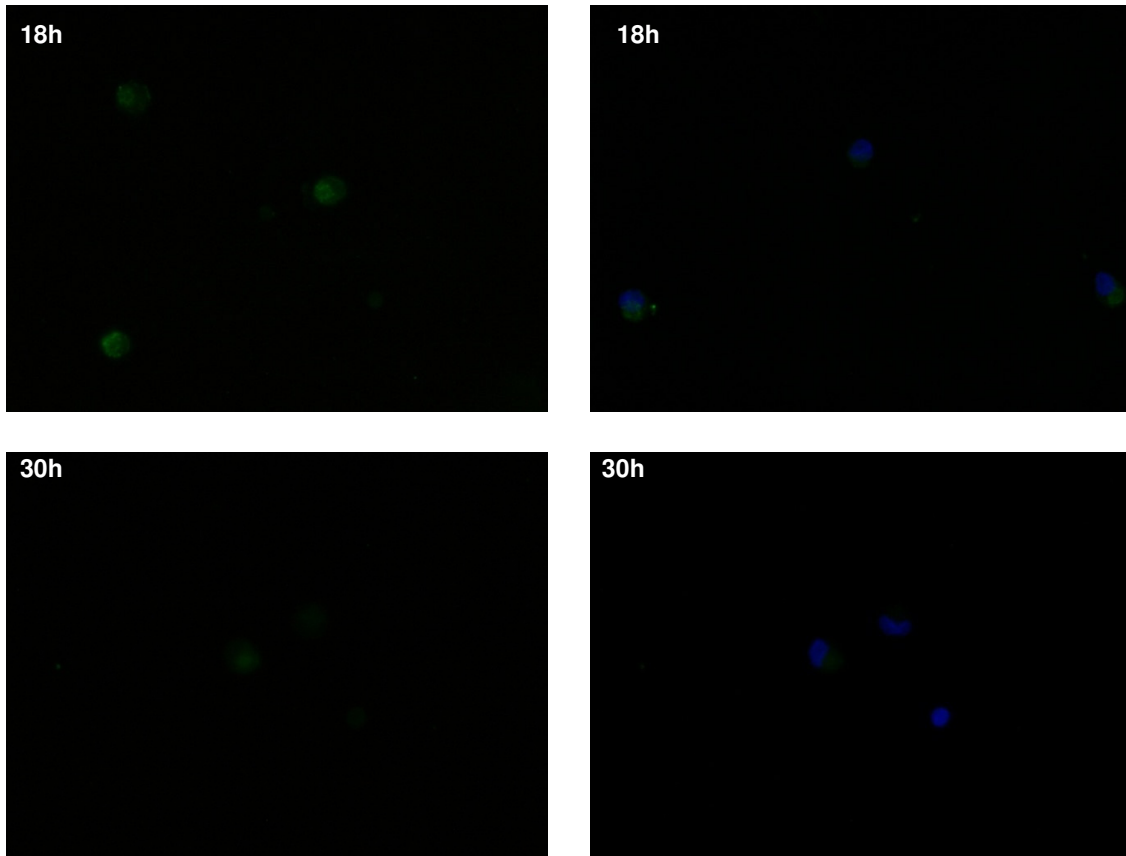


Figura 20

Nelle immagini a 15' si osserva una fluorescenza intensa e distribuita in modo pressochè uniforme a livello citoplasmatico, in quasi tutte le cellule dendritiche immature presenti nel campo d'osservazione. Non risultano fluorescenti nel verde cellule di diversa natura, come i linfociti, che appaiono invece con la successiva marcatura con il DAPI (freccia rossa). A 45' dall'esposizione alle IgG-FITC l'intensità di fluorescenza aumenta e la localizzazione dell'anticorpo comincia ad organizzarsi. Questo aspetto diviene più definito a 90' in cui si osserva una precisa localizzazione perinucleare puntiforme. A 4h si osserva la stessa morfologia ma con minore intensità; a 18h ma soprattutto a 30h tale emissione appare notevolmente diminuita. Nelle immagini riportate in **Figura p** sono state riportate le immagini di mDC osservate ai tempi indicati nella cinetica di **Figura y**.

4.2. ANALISI FENOTIPICA

Le DC utilizzate in tutti gli esperimenti di cinetica e microscopia sono state analizzate valutando l'espressione di una serie di marcatori di superficie, che caratterizzano le iDC e le mDC. I dati ottenuti da analisi citofluorimetrica sono riportati in **Tabella 3**. Le mediane sono state calcolate sulla base dei valori ottenuti dalla caratterizzazione fenotipica di DC di cinque diversi pazienti.

Marcatori	iDC Mediana % (intervallo)	mDC Mediana % (intervallo)
CD14	5 (0-10)	2 (0-10)
CD80	20 (10-30)	75 (65-90)
CD83	3 (0-10)	51 (45-63)
CD86	30 (10-76)	80 (72-93)
HLA-DR	86 (70-92)	90 (84-96)
CCR7	2 (0-6)	38 (12-71)

Tabella 3

Il fenotipo ottenuto per le iDC e le mDC è simile a quello descritto in letteratura. Livelli medio alti di molecole CD80, CD86 e CCR7 rivelano un buon grado di differenziamento dallo stadio immaturo a quello maturo delle DC.

4.3 LISATO

4.3.1 ESTRAZIONE E MARCATURA

➤ ESTRAZIONE

Alcuni dei lisati estratti ed utilizzati per la marcatura fluorescente sono stati analizzati con gel elettroforesi SDS-PAGE in gradiente di concentrazione di acrilamide. Nel gel di **Figura 21** sono stati caricati in corsia 1 un campione di albumina, come controllo; in corsia 2 un lisato ottenuto da tessuto di carcinoma renale; in corsia 3 e 4 due lisati ottenuti da tessuto di melanoma di due pazienti diversi.

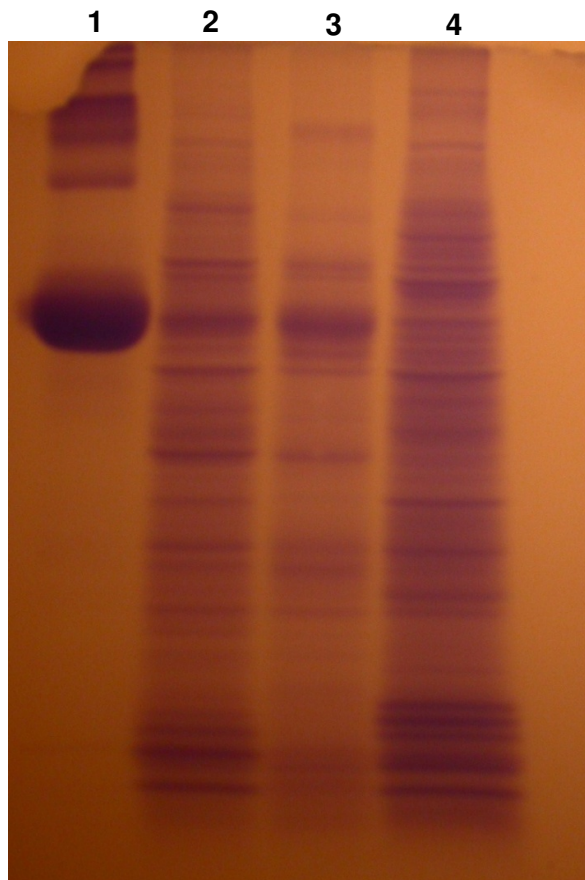


Figura 21 Il gel elettroforesi in gradiente di concentrazione di acrilamide di lisati tumorali mostra una notevole complessità nel *pattern* proteico. Corsia 1 albumina(3.6 mg/ml); corsia 2 lisato da carcinoma renale (4mg/ml); corsia 3 lisato da melanoma (0.9mg/ml); corsia 4 lisato da melanoma (4.96mg/ml).

Dal confronto tra i diversi campioni si evince una notevole complessità proteica, inoltre colpisce la differenza nel pattern proteico tra i due campioni provenienti da tessuto di melanoma (corsia 3 e 4).

➤ MARCATURA

La marcatura effettiva del lisato con FITC è stata verificata con gel a gradiente; il gel è stato prima visualizzato con transilluminatore e poi colorato con soluzione di Coomassie R-250. In **Figura 22** a sinistra è riportata la separazione elettroforetica di un lisato di melanoma coniugato a FITC, rivelata per trans illuminazione; a destra è riportato lo stesso gel successivamente colorato con Coomassie per verificare la specificità della marcatura fluorescente.

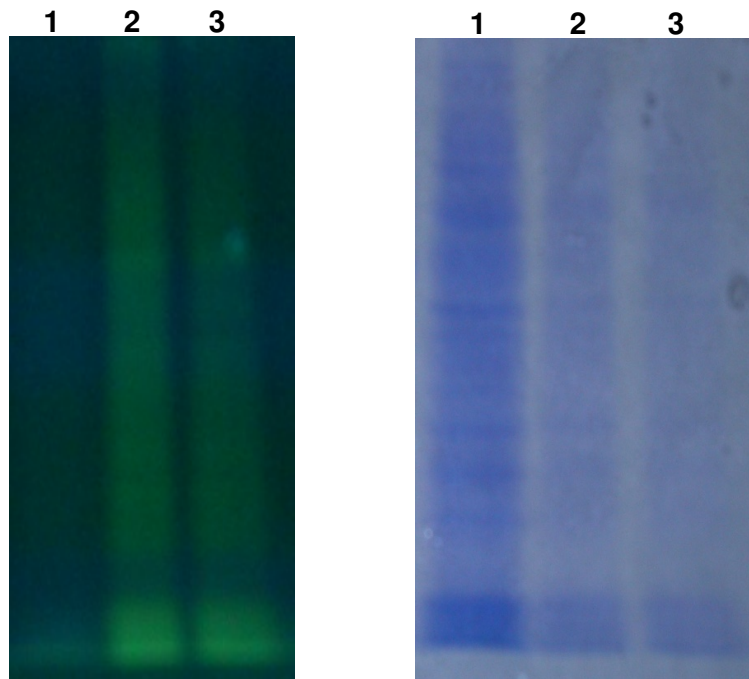


Figura 22 Il gel in gradiente di concentrazione di acrilamide rivela l'ottimo grado di coniugazione del lisato con la sonda FITC. A. Gel elettroforesi in gradiente di concentrazione di acrilamide su cui sono stati caricati in corsia 1 un campione di lisato non marcato, corsia 2 e corsia 3 due frazioni del campione di lisato marcato con FITC. Il gel è stato rivelato per trans illuminazione e fotografato. Non appare fluorescente la corsia **B.** Gel di figura A. successivamente colorato con soluzione di Coomassie. Appare colorata la corsia 1.

Dal gel si deduce la completa marcatura delle proteine del lisato, evidenziando l'efficienza della metodica di marcatura applicata.

4.3.2 CINETICA DI CAPTAZIONE

Come per l'idiotipo anche per il lisato sono state eseguite diverse cinetiche di captazione, i cui risultati sono riportati nei grafici di seguito. Per verificare la riproducibilità dei dati, per ogni esperimento eseguito sono state utilizzate cellule provenienti da pazienti diversi, mantenendo costante il lisato utilizzato. L'obiettivo di questa parte del lavoro era stabilire i tempi e le quantità migliori per la fase di *pulsing* e non la localizzazione, per la quale invece sono stati impiegati lisati e DC autologhe.

Nel grafico in **Figura 23** sono stati riportati i dati ottenuti dall'intensità media di fluorescenza dei campioni cellulari analizzati, in funzione del tempo. In particolare iDC pulsate con lisato-FITC ($50\mu\text{g}/10^6$ cellule), sono state analizzate a 0-15'-30'-45'-60'-90'-2h-4h-6h-8h dal *pulsing*.

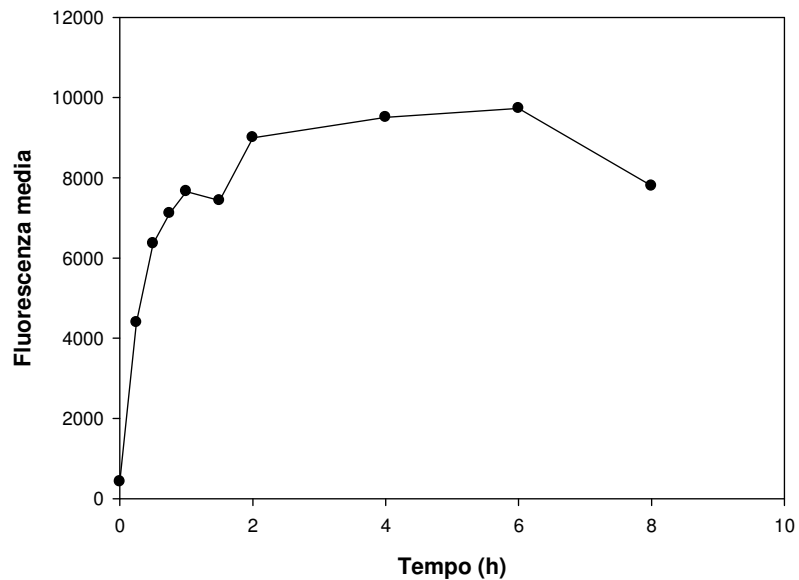


Figura 23

Si osserva un aumento notevole di fluorescenza interna cellulare nelle prime 2h, che raggiunge un plateau a 6h e una diminuzione da 6 a 8h. Per verificare l'attendibilità di quest'ultimo punto sperimentale, è stata ripetuta una cinetica aumentando i tempi di campionamento da 0 a 20h. In **Figura 24** sono stati riportati i dati ottenuti con iDC stimulate con lisato-FITC a $100\mu\text{g}/10^6$, raccolte a 1h, 2h, 2.5h, 4h, 4.5h, 5h, 5.5h, 6h, 6.5h, 7h, 8h, 10h, 12h, 14h, 16h, 18h e 20h.

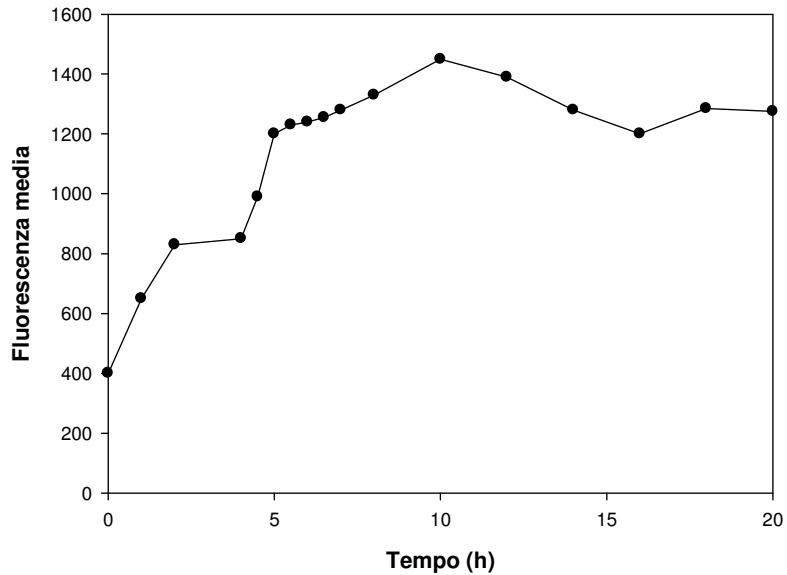


Figura 24

Si osserva un progressivo aumento di fluorescenza fino a 10h che tende a mantenersi pressoché costante nelle ore successive con una lieve tendenza a diminuire.

Per valutare ulteriormente la capacità di captazione delle iDC sono state caricate quantità di lisato crescenti, e per ognuna è stata valutata la cinetica. Le dosi di lisato-FITC aggiunte per 10^6 di cellule sono state: 20ug, 40ug, 80ug, 100ug, 200ug e 400 μ g. In **Figura 25** sono riportate con colori diversi le curve ottenute per ogni concentrazione, prelevando le cellule a 2h, 4h, 8h e 12h:

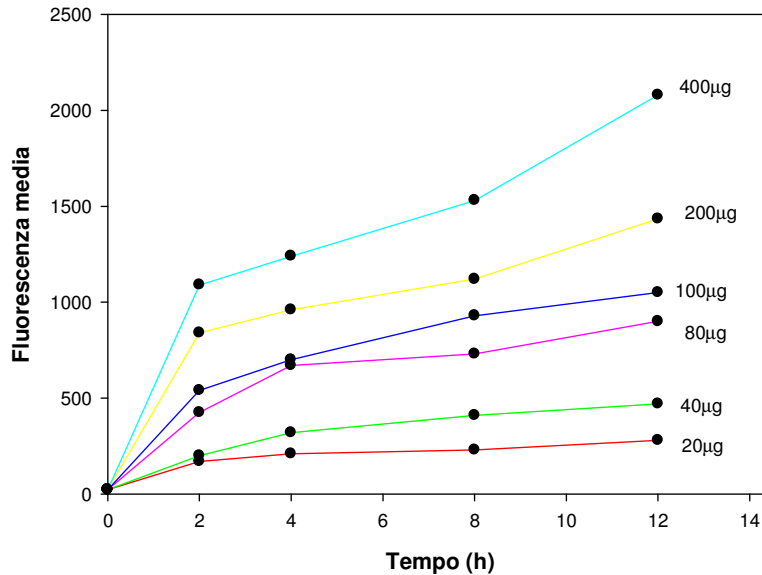


Figura 25

Per 20µg, 40µg e 80µg si raggiunge una fase di plateau entro le prime 8h dal *pulsing*, con un ulteriore lieve aumento dalle 10 alle 12h.

Le concentrazioni più alte hanno andamento simile ma continuano ad aumentare anche dopo le 8h.

I punti da 8 a 12 di 100µg e 200µg di questa cinetica non sono in accordo con i dati della precedente, in cui invece di un aumento si osservava una lieve diminuzione di intensità di fluorescenza.

In **Tabella 4** sono riportati i dati rappresentati in grafico di **Figura 25**

Tempo(h)	Fluorescenza media					
	20µg	40µg	80µg	100µg	200µg	400µg
0	23	23	23	23	23	23
2	170	200	425	540	840	1090
4	210	320	670	700	960	1240
8	230	410	730	930	1120	1530
12	280	470	900	1050	1435	2080

Dall'analisi dei valori riportati in tabella per ogni concentrazione è possibile confrontare tra loro gli andamenti. In particolare per 20µg si ha un aumento di 7 volte

da 0 a 2h mentre non si osservano variazioni di rilievo dalle 2h alle 12h. Per 40 μ g si ha un aumento di 9 volte da 0 a 2h, di circa 1,5 volte da 2 a 4h senza ulteriori aumenti significativi dalle 4 alle 12h. per 80 μ g si osserva un aumento di 18 volte dell'intensità media di fluorescenza nelle prime due ore dal *pulsing* e un aumento progressivo di 1,3 volte da 2 a 4 e da 4 a 8. Per 100 μ g si verifica un aumento di 23 volte da 0 a 2h e di 1,3 volte da 2 a 4h e poi da 4 a 8h; con una progressione minore da 8 a 12h (1,1 volte). Nei 200 μ g si ha un aumento di 36 volte da 0 a 2h , di 1,2 volte da 2 a 4 e poi da 4 a 8h e si mantiene tra 8 e 12h (1,3 volte). Per 400 μ g si osserva lo stesso andamento visto per i 200 μ g, con valori superiori: aumento di 47 volte da 0 a 2h, di circa 1,2 da 2 a 4 e da 4 a 8h ed infine di 1,4 da 8 a 12h.

Riassumendo le quantità più basse, 20 e 40 μ g vengono captate completamente nelle prime ore dal *pulsing*. In particolare 20 μ g sono captati dalle cellule praticamente nelle prime due ore; la stessa cosa avviene nei 40 μ g in cui metà viene captata nelle prime due ore l'altra metà entro le 8h.

Comparando i valori ottenuti nelle prime due ore per 40 μ g e 80 μ g si osserva una captazione proporzionale, che non si osserva dal confronto tra 100 μ g e 200 μ g o 200 μ g e 400 μ g, in cui invece si riscontra un netto aumento della fluorescenza interna alle cellule nelle prime due ore, anche se non molto maggiore rispetto a quello misurato per gli 80 μ g. A partire dalle 4h invece, si assiste ad un aumento più marcato sia per 200 μ g che per 400 μ g, rispetto a quello che si verifica con le concentrazioni più basse.

Pertanto è possibile affermare che le iDC hanno una elevata capacità di captazione anche di alte concentrazioni di un intero lisato cellulare e che risulta difficile raggiungere la saturazione del sistema. In generale, nelle prime due ore dal *pulsing* si verifica la captazione di almeno la metà del lisato caricato, indipendentemente dalla concentrazione. Tuttavia con concentrazioni elevate di lisato si perde la proporzionalità nell'incremento della fluorescenza, e questo potrebbe indicare una sorta di rallentamento nell'ingresso delle molecole di lisato nella cellula.

Per determinare il reale andamento della captazione, è stata misurata con analisi spettro fluorimetrica l'intensità di fluorescenza relativa al lisato-FITC residuo nel terreno a 2h, 4h, 8h e 12h dal *pulsing*. In **Figura 26** i grafici riportati mostrano gli andamenti per 20 μ g, 40 μ g e 80 μ g (grafico superiore) e 100 μ g, 200 μ g e 400 μ g (grafico inferiore).

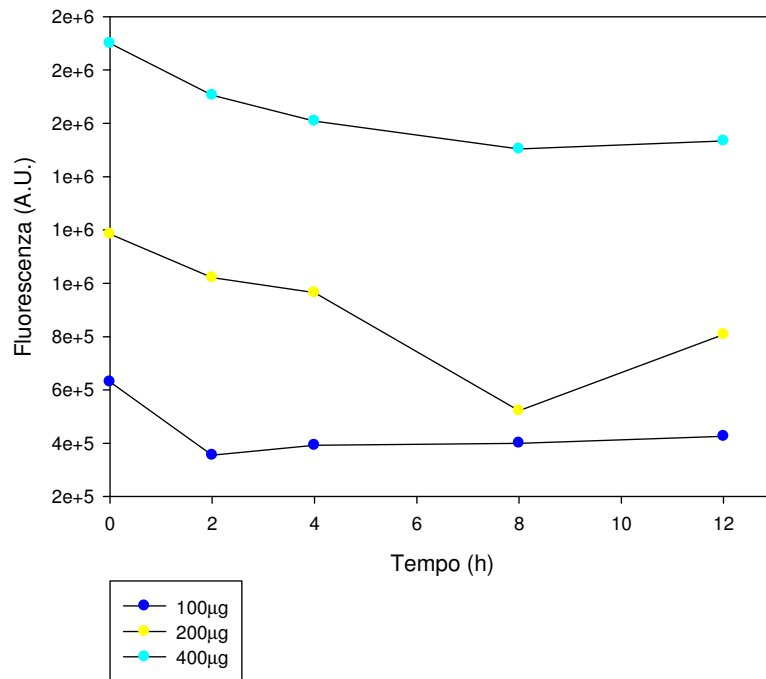
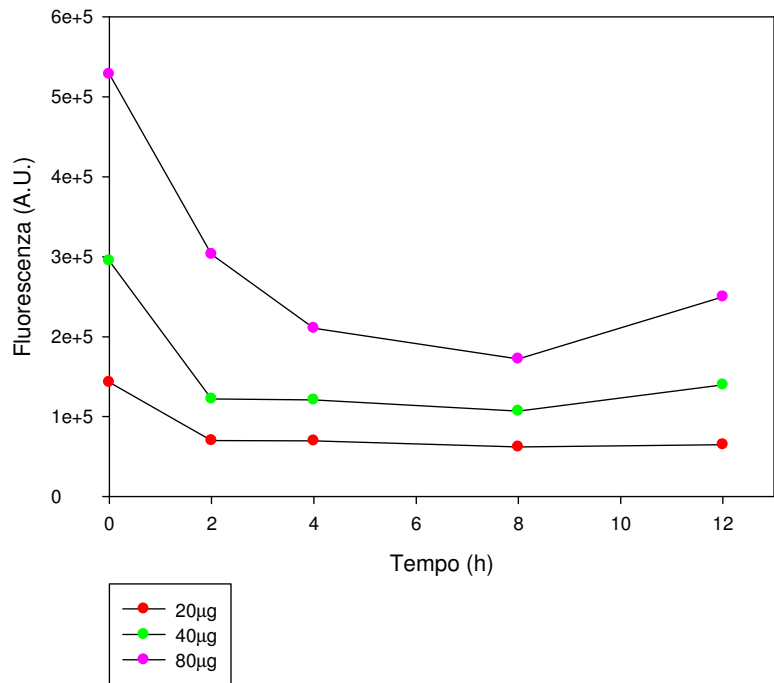


Figura 26 Misure spettro fluorimetriche del lisato-FITC residuo nel terreno di coltura delle iDC da 2 a 12 ore di distanza dal *pulsing*. Dalle variazioni di intensità di fluorescenza si rileva la completa captazione per concentrazioni basse (20 e 40µg) a 2h dal *pulsing*; per 80µg e 200µg si registra una notevole diminuzione da 0 a 8h, che non si verifica con 400µg di lisato, in cui il lisato sembra diminuire gradualmente nel terreno, mantenendosi tuttavia ad alti livelli di intensità di fluorescenza. In particolare, nel grafico in alto, sono riportati i valori ottenuti per concentrazioni di lisato

pari a 20µg, 40µg e 80µg/10⁶ cellule, con prelievi a 2h, 4h, 8h e 12h; nel grafico in basso, sono riportati i valori ottenuti per concentrazioni di lisato pari a 100µg, 200µg e 400µg/10⁶ cellule.

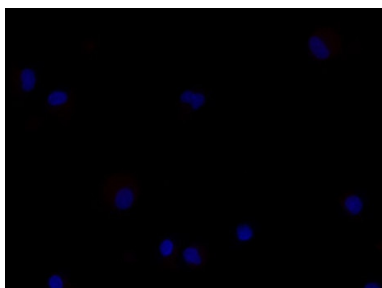
Come si può osservare dalla curva di 20 µg e 40µg, si ha una diminuzione da 0 a 2 h, dopo le quali non si osservano più variazioni rilevanti. Questo andamento rispecchia quello ottenuto dalla misura della fluorescenza cellulare media a 20µg e 40µg, suggerendo che quantità relativamente basse di lisato vengono captate completamente entro 4h dal *pulsing*, per cui la fluorescenza sia esterna che interna rimane costante nelle ore successive.

L'andamento per 80 µg mostra una rilevante diminuzione di intensità di fluorescenza da 0 a 2h che persiste fino alle 8h. Aumentando di 4 volte la concentrazione di lisato a parità di numero di cellule presenti, anche il tempo necessario affinché tutto il lisato venga captato è 4 volte superiore.

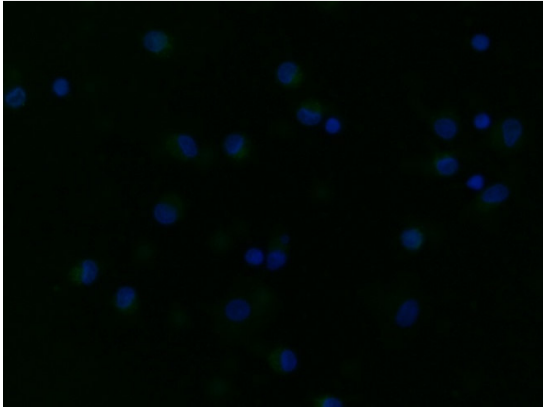
L'andamento dei 100µg non ha fornito informazioni ulteriori utili, anzi sembra discostarsi dall'andamento degli 80µg e dei 200µg, rendendone difficile una interpretazione. A 200µg si assiste invece ad una notevole diminuzione dalle 2h alle 8h, cosa che non si osserva a 400µg in cui si ha una diminuzione progressiva ma non sostanziale tra i punti di campionamento, mantenendosi ad alti livelli di intensità di fluorescenza (2x10⁶ di conte). Questo può suggerire che quantità di lisato superiori a 200µg siano troppo elevate per garantire una stimolazione fisiologica delle iDC.

4.3.3 LOCALIZZAZIONE

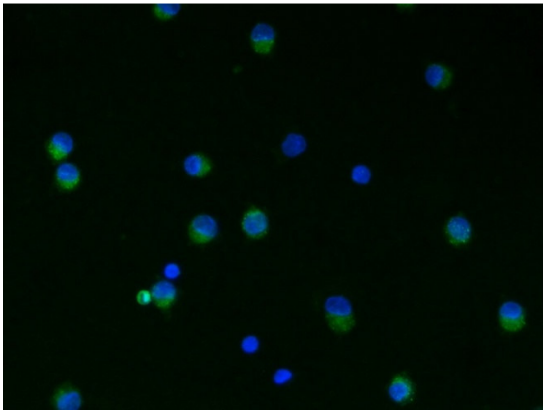
Per determinare la localizzazione di lisato all'interno delle DC, sono stati eseguiti diversi esperimenti con lisato e cellule autologhe. Le immagini in **Figura 27** si riferiscono ad un esperimento condotto su iDC stimulate con 100µg di lisato-FITC per 10⁶ di cellule. Le iDC sono state prelevate a tempi diversi da 1h a 22h e preparate secondo la metodica indicata nel capitolo materiali e metodi. L'acquisizione delle immagini è stata condotta mantenendo invariato il tempo d'esposizione del campo osservato alla luce di fluorescenza, con obiettivo a ingrandimento 40x.



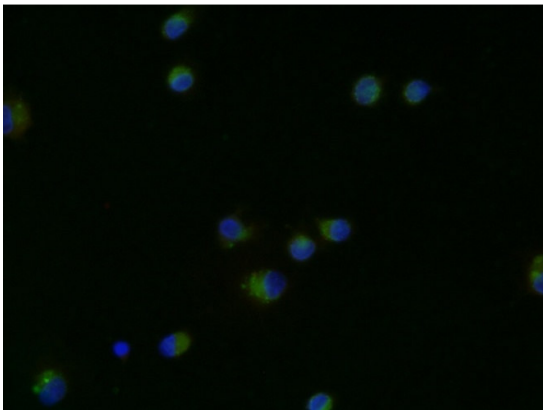
cnt



1H



5H



8H

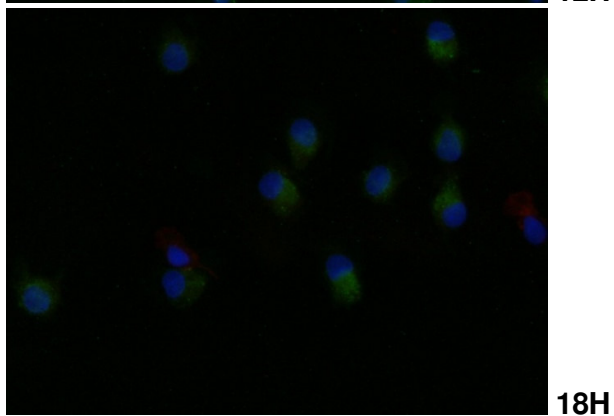
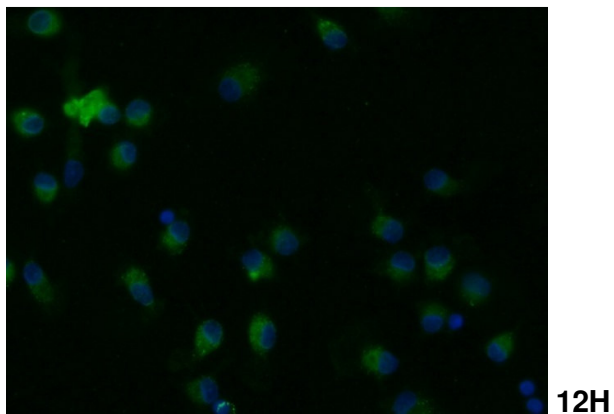
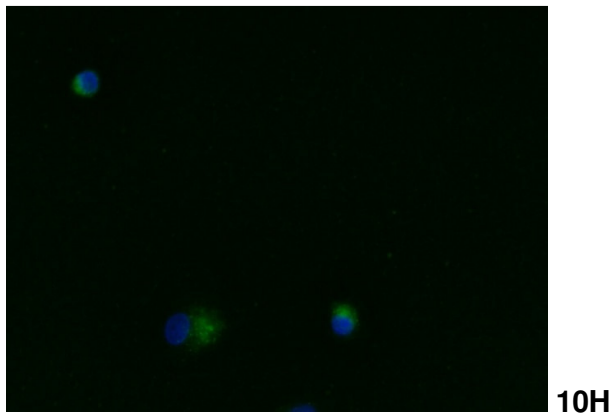


Figura 27 Le immagini mostrano una distribuzione citoplasmatica uniforme del lisato a 1h dal *pulsing*, mentre nelle ore successive tende a localizzarsi in una struttura perinucleare delimitata. Nella colonna di sinistra sono riportate

La **Figura 28** successiva mostra la localizzazione a 18h dal pulsing di lisato autologo su iDC. (Esposizione 2'' obiettivo 40x)

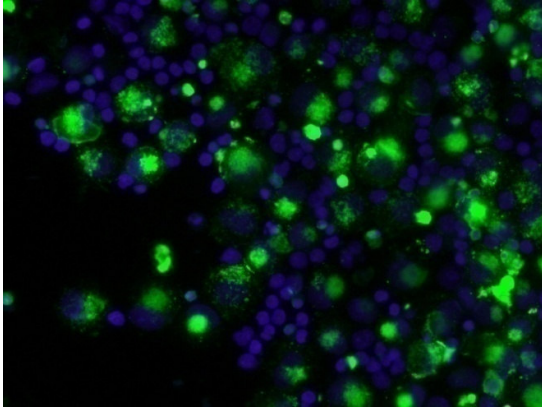
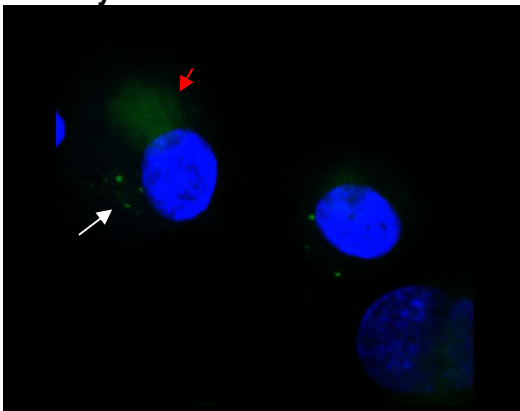


Figura 28

Nella **Figura 29** sono state riportate immagini ottenute in microscopia confocale. Nella colonna di sinistra sono state riportate le immagini ottenute sull'asse frontale (asse xy); nella colonna di destra le rispettive immagini ottenute sull'asse delle z. in verde si distingue la FITC per il lisato, in blu la marcatura del nucleo. Ingrandimento 60x, microscopio confocale NIKON C1. mDC pulsate 18h e maturate 48

Asse xy



Asse z

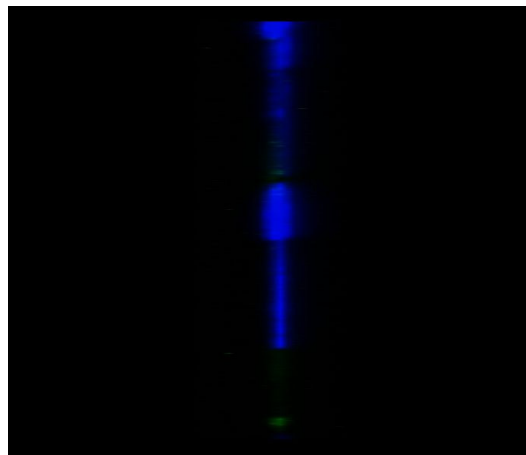
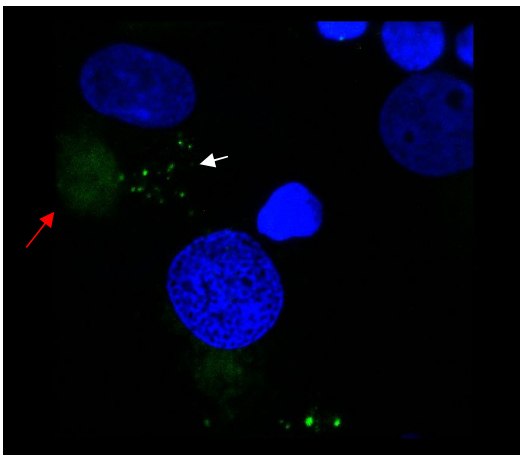
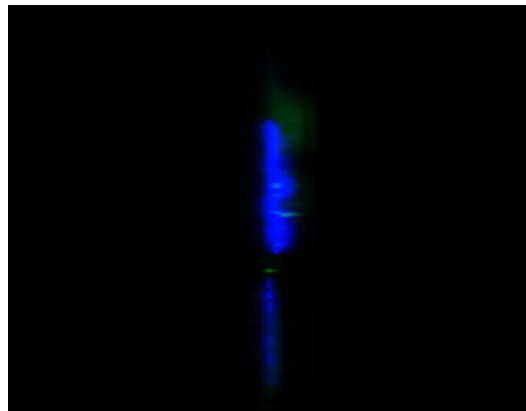
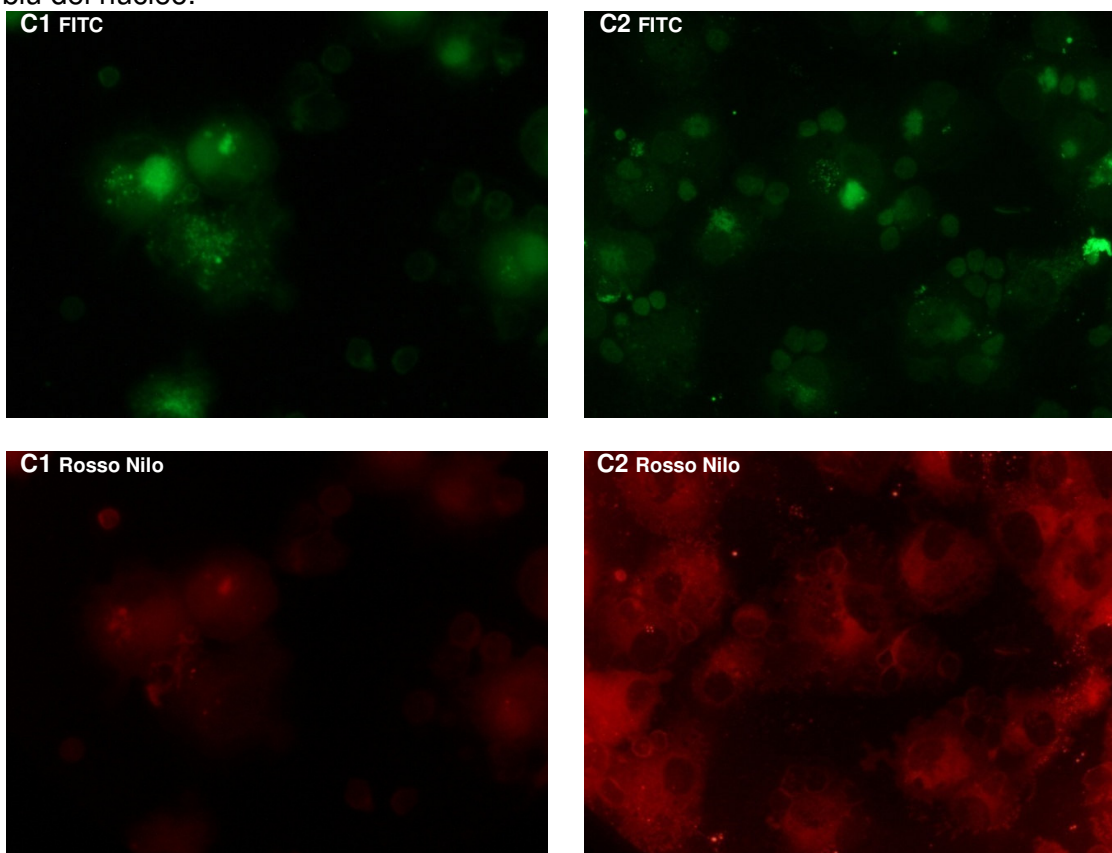


Figura 29 iDC pulsate per 18h con lisato-FITC e maturate per 48h.

Dalle immagini si osserva il lisato come nuvola e la presenza di numerosi punti fluorescenti, allontanarsi.

Per analizzare meglio la natura delle formazioni puntiformi e nubiformi rivelate anche dall'analisi al microscopio confocale, i medesimi vetrini sono stati successivamente colorati con un marcatore aspecifico dei lipidi di membrana, il Rosso Nilo, è stata preparata una soluzione a 0.5mg/ml di Rosso Nilo in acetone, 5 μ l di questa sono stati aggiunti a una soluzione di PBS/Glicerolo, con cui sono stati montati i vetrini. I campioni sono stati osservati al microscopio di fluorescenza, con obiettivo 40x e zoom ottico (3x). In **Figura 30** sono riportate le immagini di due diversi campi (C1 e C2) dello stesso campione di mDC maturate 48h; in particolare in alto la fluorescenza verde relativa al lisato, al centro la fluorescenza rossa relative alle strutture lipidiche e in basso le sovrapposizioni delle prime due con la fluorescenza blu del nucleo.



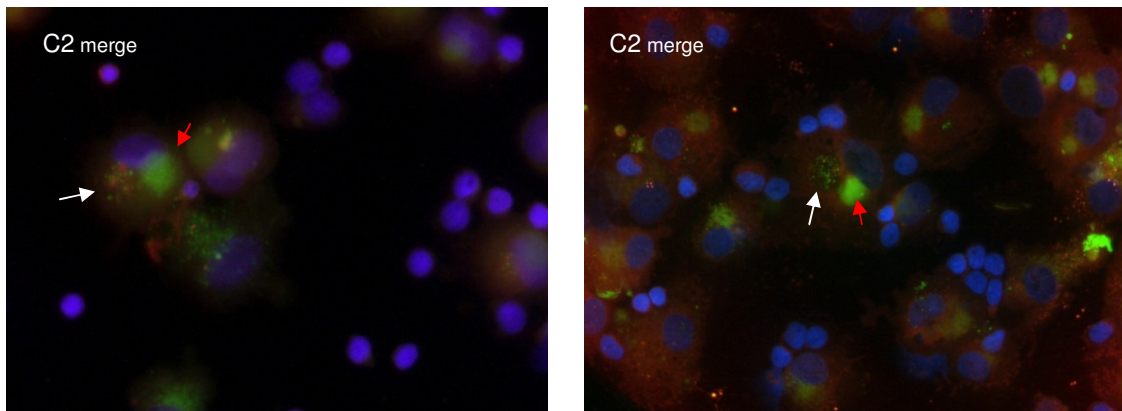
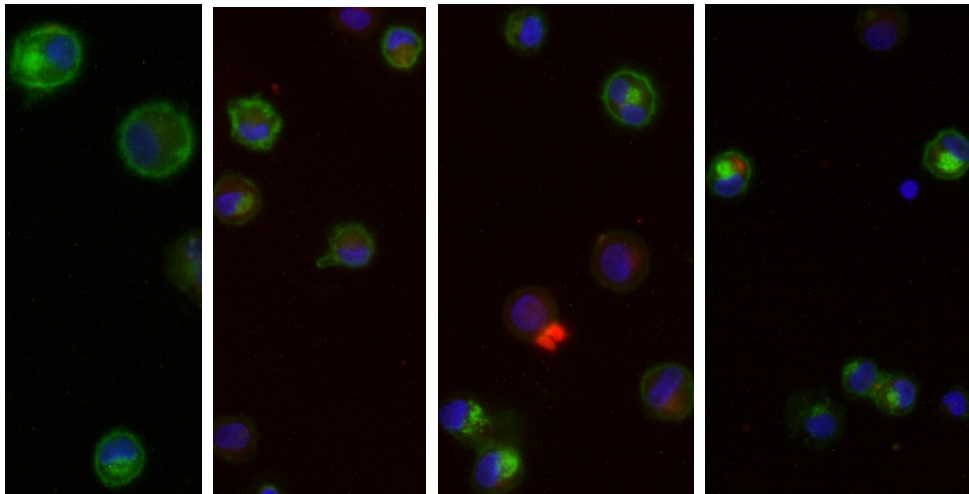


Figura 30

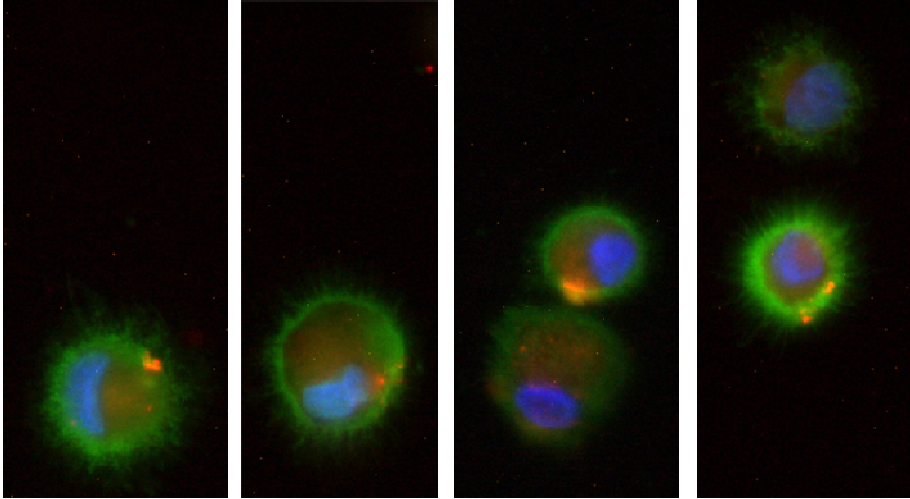
Nelle immagini sono evidenziate con frecce rosse le formazioni nubiformi che persistono anche a 48h dallo stimolo di maturazione, con frecce bianche le formazioni puntiformi che a questo stadio sono state rivelate in un numero abbastanza ampio di cellule. I punti fluorescenti verdi sembrano coincidere con i punti rossi nella colorazione con rosso nilo facendo supporre ad una loro natura vescicolare con membrana lipidica.

Infine è stata effettuata una immunomarcatura con anticorpo anti HLA-DR coniugato aFITC, utilizzando lisato coniugato a TRITC, per osservare eventuale colocalizzazione su membrana del lisato a seguito dello stimolo di maturazione. In **Figura 31** sono riportati i risultati ottenuti.

A.



B.



C.

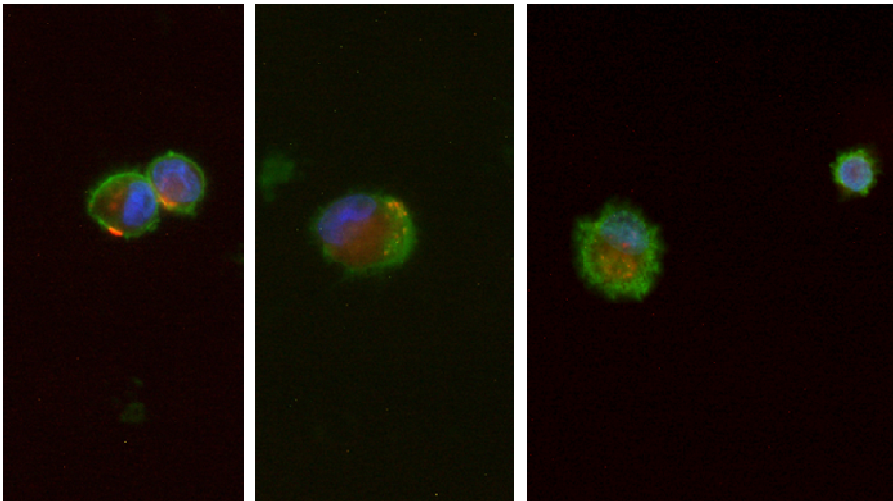


Figura 31 L'immunomarcatura delle molecole MHCII sembra rivelare una colocalizzazione del lisato tumorale sulla membrana citoplasmatica delle mDC. A. iDC caricate con lisato-TRITC (rosso) per 18h, fissate e marcate con DAPI (blu) e anti HLA DR-FITC (verde). B. Dopo 24h dall'esposizione al cocktail di citochine le mDC rivelano un alto numero di molecole MHCII sulla membrana citoplasmatica. In aggiunta la sovrapposizione tra le immagini di fluorescenza verde e quelle rosse mostrano alcuni punti di colocalizzazione (giallo)sulla membrana citoplasmatica. C. Dopo 48h di maturazione le mDC presentano le stesse caratteristiche delle DC maturate 24h.

5. CONCLUSIONI

Con le ricerche descritte nella presente tesi di Dottorato si è voluto mettere al servizio di alcune strategie di terapia oncologica gli strumenti d'indagine e le informazioni offerti dalla ricerca biologica di base. In particolare si sono sviluppate e caratterizzate le procedure per poter seguire in microscopia la captazione e la elaborazione antigenica di cellule dendritiche di pazienti. Nella pratica clinica, il successo di questa fase, svolta in laboratorio, è di fondamentale importanza per ottenere una buona efficacia nell'induzione di una risposta immunitaria del paziente nei confronti del tessuto tumorale.

Nel corso di una prima fase sperimentale si è caratterizzata e descritta una procedura affidabile di separazione e purificazione degli anticorpi monoclonali idiotipo prelevati a pazienti di mieloma multiplo. Queste immunoglobuline sono state modificate con sonde fluorescenti ed hanno permesso di sviluppare una tecnica originale per la doppia marcatura di peptidi antigenici con sonde luminescenti ed elettrondense. Queste ultime potranno essere applicate in studi di microscopia correlativa fluorescenza-elettronica per ottenere informazioni dettagliate sul destino e la localizzazione intracellulare di specifici antigeni.

Nella seconda fase sperimentale si sono affrontate nel dettaglio alcune domande di cruciale rilevanza per l'applicazione clinica delle tecniche di immunoterapia oncologica: 1) Quali sono i tempi di "pulsing" antigenico delle cellule dendritiche che possono stimolare una soddisfacente risposta immunitaria? 2) Quali compartimenti subcellulari sono coinvolti nella elaborazione antigenica?

Alla prima domanda si è data una risposta caratterizzando la cinetica di captazione in cellule dendritiche prelevate a pazienti di melanoma. I nostri studi hanno potuto definire due importanti indicazioni che dipendono dalle quantità disponibili del materiale antigenico: Se sono disponibili quantità modeste (non supera i 50 μg) si è dimostrato che il picco di assorbimento cellulare dell'antigene lo si raggiunge alle 2 ore dalla somministrazione, In queste condizioni il "pulsing" non necessita di essere ulteriormente prolungato e al termine delle 2 ore è consigliabile interrompere la incubazione e procedere alle fasi successive. Viceversa, se il materiale antigenico disponibile è superiore (la dose somministrabile supera i 100 μg) si è potuto dimostrare che la captazione continua oltre le due ore, raggiungendo un picco alle 8 ore. Considerare tempi di simile durata garantisce, quindi, la somministrazione di una maggiore dose antigenica alle cellule dendritiche. Non di meno, avendo verificato l'instaurarsi di un danno cellulare che si può evidenziare dopo 12 ore, ne deriva che nella pratica clinica non sarà consigliabile superare di molto le 8 ore suggerite per ottenere la migliore stimolazione.

Alla seconda domanda dobbiamo ammettere che non abbiamo potuto ottenere una risposta completamente esauriente ed univoca. Infatti, se era nostra ipotesi dimostrare il coinvolgimento di processi di autofagosomia alla base dell'elaborazione e del trasporto alla superficie della membrana plasmatica dei complessi MHC II-peptide antigenico, questi non sono stati evidenziati al di là di un ragionevole dubbio. Infatti, gli esperimenti di co-localizzazione dell'antigene fluorescente, degli anticorpi specifici MHC II e di quelli specifici per l'autofosoma (anti-LC3) hanno rivelato una sovrapposizione morfologica puramente suggestiva e alla quale attualmente non ci sentiamo di attribuire certezza scientifica. Studi futuri sono già stati pianificati per ottenere risultati e informazioni più dettagliate.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Jacques Banchereau & Ralph M. Steinman.
Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*.392, 245-252 (1998).
2. Inaba, K. *et al.*
Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176, 1693–1702 (1992).
3. Ralph M. Steinman & Jacques Banchereau.
Taking dendritic cells into medicine. *Nature*.449, 419-426 (2007).
4. Inaba, K. *et al.*
High levels of a major histocompatibility complex II–self peptide complex on dendritic cells from lymph node. *J. Exp. Med.* 186, 665–672 (1997).
5. Cella, M. *et al.*
Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184, 747–752 (1996).
6. Koch, F. *et al.*
High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* 184, 741–747 (1996).
7. Reis e Sousa, C. *et al.*
In vivo microbial stimulation induces rapid CD40L-independent production of IL-12 by dendritic cells and their re-distribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 186, 1819–1829 (1997).
8. Caux, C. *et al.*
B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 180, 1841–1847 (1994).
9. Inaba, K. *et al.*
The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells *in situ* and during maturation *in vitro*. *J. Exp. Med.* 180, 1849–1860 (1994).
10. Niess, J. H. *et al.*
CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254–258 (2005).
11. Cyster, J. G.
Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 189, 447–450 (1999).
12. Randolph, G. J., Angeli, V. & Swartz, M. A.
Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature Rev. Immunol.* 5, 617–628 (2005).
13. Lindquist, R. L. *et al.*
Visualizing dendritic cell networks *in vivo*. *Nature Immunol.* 5, 1243–1250 (2004).
14. Bousso, P. & Robey, E.
Dynamics of CD81 T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nature Immunol.* 4, 579–585 (2003).
15. Shakhar, G. *et al.*
Stable T cell–dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity *in vivo*. *Nature Immunol.* 6, 707–714 (2005).

16. Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P. & Diefenbach, A.
Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26, 503–517 (2007).
17. Shortman, K. & Naik, S. H.
Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Rev. Immunol.* 7, 19–30 (2007).
18. Bennett, L. et al.
Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J. Exp. Med.* 197, 711–723 (2003).
19. Blanco, P., Palucka, A. K., Gill, M., Pascual, V. & Banchereau, J.
Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 294, 1540–1543 (2001).
20. Kissenpfennig, A. et al.
Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22, 643–654 (2005).
21. Dudziak, D. et al.
Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107–111 (2007).
22. Pulendran, B. et al.
Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune responses in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 1036–1041 (1999).
23. Maldonado-Lopez, R. et al.
CD8a1 and CD8a2 subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189, 587–592 (1999).
24. Soares, H. et al.
A subset of dendritic cells induces CD41 T cells to produce IFN- γ by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *J. Exp. Med.* 204, 1095–1106 (2007).
25. Del Rio, M. L., Rodriguez-Barbosa, J. I., Kremmer, E. & Forster, R.
CD1032 and CD1031 bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD41 and CD81 T Cells. *J. Immunol.* 178, 6861–6866 (2007).
26. Coombes, J. L. et al.
A functionally specialized population of mucosal CD1031 DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757–1764 (2007).
27. Yoneyama, H. et al.
Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J. Exp. Med.* 202, 425–435 (2005).
28. D'Amico, A. & Wu, L.
The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J. Exp. Med.* 198, 293–303 (2003).
29. Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I. L. & Manz, M. G.
Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt31 lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt31 dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 198, 305–313 (2003).
30. Leon, B., Lopez-Bravo, M. & Ardavin, C.

- Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* 26, 519–531 (2007).
31. Liu, K. et al.
Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nature Immunol.* 8, 578–583 (2007).
 32. Varol, C. et al.
Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204, 171–180 (2007).
 33. Inaba, K., Inaba, M., Naito, M. & Steinman, R. M.
Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including *Bacillus Calmette-Guerin* organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens *in vivo*. *J. Exp. Med.* 178, 479–488 (1993).
 34. Moll, H., Fuchs, H., Blank, C. & Rollinghoff, M.
Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 1595–1601 (1993).
 35. Reis e Sousa, C., Stahl, P. D. & Austyn, J. M.
Phagocytosis of antigens by Langerhans cells *in vitro*. *J. Exp. Med.* 178, 509–519 (1993).
 36. Svensson, M., Stockinger, B. & Wick, M. J.
Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-1 and MHC-II presentation to T cells. *J. Immunol.* 158, 4229–4236 (1997).
 37. Lukas, M. et al.
Human cutaneous dendritic cells migrate through dermal lymphatic vessels in a skin organ culture model. *J. Invest. Dermatol.* 106, 1293–1299 (1996).
 38. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A.
Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182, 389–400 (1995).
 39. Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S.
Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 621–667 (2002).
 40. Trombetta, E. S. & Mellman, I.
Cell biology of antigen processing *in vitro* and *in vivo*. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 975–1028 (2005).
 41. Figdor, C. G., van Kooyk, Y. & Adema, G. J.
C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Rev. Immunol.* 2, 77–84 (2002).
 42. Delneste, Y. et al.
Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen crosspresentation. *Immunity* 17, 353–362 (2002).
 43. Trumpfheller, C. et al.
Intensified and protective CD41 T cell immunity at a mucosal surface after a single dose of anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J. Exp. Med.* 203, 607–617 (2006).
 44. Hawiger, D. et al.
Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. *J. Exp. Med.* 194, 769–780 (2001).

45. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A.
Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179, 1109–1118 (1994).
46. Winzler, C. *et al.*
Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 185, 317–328 (1997).
47. Nijman, H.W. *et al.*
Antigen capture and MHC class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J. Exp. Med.* 182, 163–174 (1995).
48. Pierre, P. *et al.*
Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388, 787–792 (1997).
49. Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. & Lanzavecchia, A.
Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388, 782–787 (1997).
50. Peter E Jensen.
Recent advances in antigen processing and presentation. *Nature immunology.* 8, 1041-1048 (2007).
51. Stern, L.J. & Wiley, D.C.
Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 2, 245–251 (1994).
52. Kloetzel, P.M.
Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat. Immunol.* 5, 661–669 (2004).
53. Rock, K.L., York, I.A. & Goldberg, A.L.
Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* 5, 670–677 (2004).
54. Cresswell, P., Ackerman, A.L., Giodini, A., Peaper, D.R. & Wearsch, P.A.
Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol. Rev.* 207, 145–157 (2005).
55. Watts, C.
The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat. Immunol.* 5, 685–692 (2004).
56. Jensen, P.E., Weber, D.A., Thayer, W.P., Westerman, L.E. & Dao, C.T.
Peptide exchange in MHC molecules. *Immunol. Rev.* 172, 229–238 (1999).
57. Cresswell, P.
Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84, 505–507 (1996).
58. Reis e Sousa, C.
Dendritic cells in a mature age. *Nature Rev. Immunol.* 6, 476–483 (2006).
59. Pulendran, B.
Variation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J. Immunol.* 174, 2457–2465 (2005).
60. W.J. Lesterhuis *et al.*
Dendritic cell vaccines in melanoma: From promise to proof? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008 Feb 7 [Epub ahead of print]
61. Rosenberg SA.
Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, 380-384 (2001)

62. Ren Y., Kruhlak M.J., Bazett-Jones D.P.
Same serial section correlative light and energy-filtered transmission electron microscopy. *J. of Histochemistry and Cytochemistry* (2003) 51:605-612.
63. Svitkina T.M., Borisy G.
Correlative Light and Electron Microscopy of the Cytoskeleton. *J. Cell Biology* (2005) 277-285.
64. Polishchuk R.S., Polishchuk E.V., Marra P., Alberti S., Buccione R., Luini A., Mironov A.A.
Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. *J. Cell Biol.* (2000) 148: 45-58.
65. Roth J., Bendayan M., Orci L.
FITC-protein A-gold complex for light and electron microscopic immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*(1980) 28: 55–57.
66. Finn OJ.
Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat. Rev. Immunol.* 3,630-641(2003).
67. Gilboa
DC-based cancer vaccines *J.of clinical investigation* 2007

