

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**SCIENZE BIOMEDICHE: PROGETTO n. 2 “EMATOLOGIA
CLINICA E SPERIMENTALE ED EMATOPATOLOGIA”**

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D3 MALATTIE DEL SANGUE

Settore Scientifico disciplinare: MED/15

**ESPRESSIONE DELL'ENZIMA AD AZIONE
IMMUNOREGOLATORIA INDOLEAMINA 2,3-
DIOSSIGENASI NELLA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA
DELL'ADULTO: CORRELAZIONI CLINICO-BIOLOGICHE**

Presentata da: DOTT.SSA SARAH PARISI

Coordinatore Dottorato

Relatore

PROF. STEFANO PILERI

PROF. MICHELE BACCARANI

Esame finale anno 2012

SOMMARIO

1.	INTRODUZIONE	10
1.1	LA LEUCEMIA MIELOBLASTICA ACUTA	11
1.1.1	CLINICA	13
1.1.2	LABORATORIO.....	14
1.1.3	DIAGNOSI.....	15
1.1.4	CITOGENETICA	20
1.1.5	ALTERAZIONI CITOGENETICHE COMUNI	20
1.1.6	ALTERAZIONI MOLECOLARI RICORRENTI	24
1.1.7	TERAPIA	31
1.2	IMMUNOTOLLERANZA ED IMMUNOEDITING.....	33
1.3	INDOLEAMINA 2,3-DIOSSIGENASI (IDO).....	38
1.3.1	IL RUOLO DEL TRIPTOFANO	38
1.3.2	INDOLEAMINA 2,3-DIOSSIGENASI (IDO).....	40
1.3.3	REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI IDO	42
1.3.4	ESPRESSIONE DI IDO A LIVELLO CELLULARE.....	43
1.3.5	IDO E TUMORI	45
1.3.6	IDO E NEOPLASIE EMATOLOGICHE	46
1.3.7	FUNZIONE DI IDO	48
1.4	I LINFOCITI T REGOLATORI (T _{REG}).....	53
1.4.1	T _{REG}	53
1.4.2	T _{REG} E IDO	54
1.5	LE CELLULE DENDRITICHE	55
1.5.1	IDO E DCs.....	58

2.	SCOPO DELLA TESI.....	60
3.	PAZIENTI E METODI	62
4.	RISULTATI.....	67
5.	DISCUSSIONE	78
6.	BIBLIOGRAFIA	84

PREFAZIONE

La Leucemia Acuta Mieloide (LAM) è una patologia neoplastica caratterizzata dall'espansione clonale di elementi immaturi della mielopoiesi, che, sostituendo i normali componenti midollari, determinano una insufficiente emopoiesi.

I sintomi e i segni tipici della LAM dipendono prevalentemente dall'instaurarsi della neutropenia (maggiore suscettibilità alle infezioni), dell'anemia (astenia, affaticabilità, facile esauribilità fisica, etc.) e della trombocitopenia (diatesi emorragica). Possono completare il corredo sintomatologico l'epatosplenomegalia, associata o meno a linfadenopatie, secondari ad infiltrazione di tali organi da parte delle cellule blastiche e sintomi generali riconducibili alla liberazione di citochine, quali febbre, febbricola, astenia.

L'incidenza di tale patologia aumenta con l'avanzare dell'età, comparso soprattutto nell'adulto e nell'anziano, dove assume peraltro caratteristiche biologiche e cliniche che ne rendono spesso la prognosi particolarmente infausta.

Negli ultimi decenni sono stati identificati molteplici caratteri prognostici alla diagnosi, tra cui compaiono anche anomalie genetiche, che permettono di stratificare i pazienti in diverse categorie di rischio.

L'individuazione di tali caratteristiche prognostiche sta acquisendo una crescente importanza nell'ottica di identificare, già all'esordio della malattia, differenti gruppi di pazienti meritevoli di ricevere strategie terapeutiche di diversa intensità.

Nonostante l'imponente mole di studi clinici e biologici che si sono susseguiti negli anni, infatti, principale limite nella cura della LAM rimane il raro ottenimento di risposte complete di lunga durata e, di conseguenza, la

presenza di un esiguo numero di pazienti lungo-sopravvivenenti, a fronte, invece, di una buona percentuale di pazienti responsivi alla chemioterapia di induzione.

Il gene IDO (Indoleamina 2,3-diossigenasi) codifica per l'omonimo enzima che interviene nella prima reazione di degradazione del triptofano, aminoacido essenziale per la vita cellulare, attraverso la via catabolica della chinurenina.

Il primo ambito in cui tale gene e l'enzima da esso codificato sono stati studiati è stato il microambiente placentare, all'interno del quale è stato confermato il loro ruolo nell'indurre uno stato di immunotolleranza, fondamentale per il mantenimento della gravidanza stessa.

Successivamente, è stato dimostrato che IDO è espresso in multipli tipi cellulari, sia costitutivamente, sia in modo inducibile, soprattutto in risposta alla presenza nel microambiente di stimoli pro-infiammatori, rappresentati da molecole quali l'IFN- γ . In questo ambito il suo ruolo è quello di impedire il crearsi di risposte immunitarie abnormi, potenzialmente dannose per l'ospite.

In campo oncologico, l'iperespressione di IDO è stata evidenziata in molteplici neoplasie solide e in pressoché tutti gli studi eseguiti la sua presenza è stata posta in relazione con una prognosi particolarmente sfavorevole.

Questo dato può essere spiegato nel contesto del concetto di *Immunoediting*, che sottolinea come il rapporto e l'interazione tra un sistema immunitario normofunzionante e l'instaurarsi di un processo neoplastico sia massimamente complesso. Secondo tale modello, infatti, da una parte il sistema immunitario è in grado di riconoscere come estranee ed eliminare selettivamente le cellule neoplastiche ma, dall'altro, si rende responsabile dell'innescarsi di un meccanismo di pressione selettiva sul tumore stesso, che diviene così in grado di superare il controllo attuato dal sistema immunitario e di dare origine alla malattia neoplastica. Quest'ultimo processo si basa su una fondamentale caratteristica delle neoplasie maligne, ossia l'instabilità genetica.

Le sopra citate esperienze in campo oncologico hanno aperto la strada allo studio di IDO anche in ambito ematologico ed in particolare, per quanto concerne il *focus* di questa Tesi, nello sviluppo della Leucemia Acuta Mieloide.

Vari studi hanno confermato che IDO è overespresso nei blasti leucemici e che tale iperespressione si traduce nella presenza di una proteina effettivamente attiva a livello enzimatico.

Uno studio pubblicato nel 2008 da Chamuleau *et al.* si è posto per la prima volta l'obiettivo di indagare l'eventuale esistenza di una correlazione tra l'espressione di IDO e la presenza dei fattori prognostici comunemente valutati alla diagnosi della Leucemia Acuta Mieloide, ossia l'età (un'età superiore ai 60 anni è un fattore prognostico favorevole), l'iperleucocitosi (un numero di leucociti superiore a 30.000/mmc rappresenta un fattore di rischio), la secondarietà a pregressa mielodisplasia o a radio-chemioterapia precedente, insieme a peculiari caratteristiche citogenetiche e molecolari.

Duecentottantasei pazienti adulti affetti da LAM sono stati analizzati mediante l'esecuzione di *Gene Expression Profiling*.

Tale studio ha dimostrato come, nella casistica considerata, non esistesse una correlazione significativa tra l'espressione di IDO e le caratteristiche prognostiche alla diagnosi, ma che IDO rappresentasse comunque la variabile indipendente a significato prognostico più importante. I pazienti con bassa espressione di IDO, infatti, mostravano un *Overall Survival* ed un *Relapse Free Survival* maggiori rispetto ai pazienti IDO⁺.

Scopo di questa Tesi è quello di valutare una casistica di pazienti adulti affetti da LAM afferiti all'Istituto di Ematologia "L. e A. Seràgnoli" di Bologna stratificandoli in gruppi di rischio sulla base delle caratteristiche prima citate e di valutare l'eventuale associazione di una o più di tali caratteristiche con l'espressione di IDO.

I pazienti, in totale 45, sono stati studiati mediante l'esecuzione di una *Real Time* PCR seguita da una analisi mediante *Western Blot* per evidenziare, nei pazienti risultati positivi per l'espressione del gene IDO, la presenza della proteina effettivamente attiva.

Per ciò che concerne le caratteristiche di rischio, i pazienti sono stati valutati per età, numero di leucociti all'esordio e secondarietà.

In base all'analisi citogenetica sono stati individuati tre differenti gruppi di rischio (*standard, low e high risk*), mentre la valutazione molecolare ha permesso di individuare, accanto alla presenza dei trascritti di fusione corrispondenti ad eventuali traslocazioni cromosomiche, la presenza di mutazioni a carico dei geni FLT3 ed NPM, rispettivamente a significato prognostico sfavorevole e favorevole.

Dei 45 pazienti analizzati, il 28,9% non è risultato esprimere IDO ad un livello significativo mediante le metodiche sopra citate, mentre il 28,9% ha dimostrato di esprimere il gene e la proteina da esso codificata ad un livello basso, ma positivo. Il 26,7% dei pazienti esprime IDO ad un livello intermedio e, infine, il 15,6% dei pazienti esprime IDO a livelli elevati.

Al momento attuale non è emersa una sicura correlazione tra l'espressione di tale gene e una o più delle caratteristiche prognostiche valutate all'esordio, anche se i pazienti IDO-negativi sembrano avere un'età tendenzialmente più elevata e, per quanto concerne l'iperleucocitosi, si può osservare una differenza tra le due categorie di pazienti posizionate agli estremi (IDO⁻ e IDO⁺ ad elevata espressione), nei quali le mediane del numero totale di WBC sono, rispettivamente, 45.450/mmc e 22.700/mmc.

Un dato interessante emerge, invece, valutando la risposta alla chemioterapia di induzione: solo il 23% dei pazienti IDO-negativi si è mostrato resistente alla terapia, contro il 71% dei pazienti ad elevata espressione.

Tale osservazione, in linea con i dati presenti in letteratura, apre la strada a molteplici riflessioni sul ruolo di IDO in ambito ematologico, facendone ipotizzare l'importanza sia in campo prognostico, sia, se tale ruolo verrà confermato, quale possibile *target* terapeutico.

Speculativamente, infatti, la possibilità di bloccare l'attività di IDO nelle cellule leucemiche potrebbe permettere il potenziamento dell'azione degli agenti chemioterapici mediante la riattivazione del meccanismo della "morte immunologica".

1. INTRODUZIONE

1.1 LA LEUCEMIA MIELOBLASTICA ACUTA

Le leucemie mieloblastiche acute (LAM) sono patologie del sistema ematopoietico dovute alla trasformazione neoplastica di una cellula staminale già differenziata per la mielopoiesi.

Tale trasformazione determina un'alterazione dei fisiologici processi differenziativi e proliferativi a carico del clone neoplastico, condizione che determina l'accumulo a livello del midollo emopoietico prima, del sangue periferico e di altri organi e tessuti poi, di cellule blastiche in grado di proliferare autonomamente.

Le cellule leucemiche possono mantenere caratteristiche differenziative di tipo morfologico, immunofenotipico e citochimico che permettono di individuarle come appartenenti ad una precisa linea differenziativa mieloide. E' possibile perciò distinguere leucemie acute mieloblastiche, monoblastiche, eritroblastiche e megacarioblastiche.

Le leucemie acute mieloidi possono insorgere a qualunque età, con un'incidenza pari a 3,6/100.000/anno, ma è ormai noto come l'incidenza aumenti con l'aumentare dell'età stessa: nei soggetti al di sopra dei 65 anni l'incidenza è pari a 16,3/100.000/anno.

L'età media alla diagnosi è stabilmente cresciuta negli ultimi decenni, avvicinandosi ai 70 anni: le leucemie mieloidi acute rappresentano la più comune causa di morte per neoplasia nel giovane-adulto (1,2% di tutte le morti per neoplasia nella popolazione generale) [NCI SEER, 1995-1999].

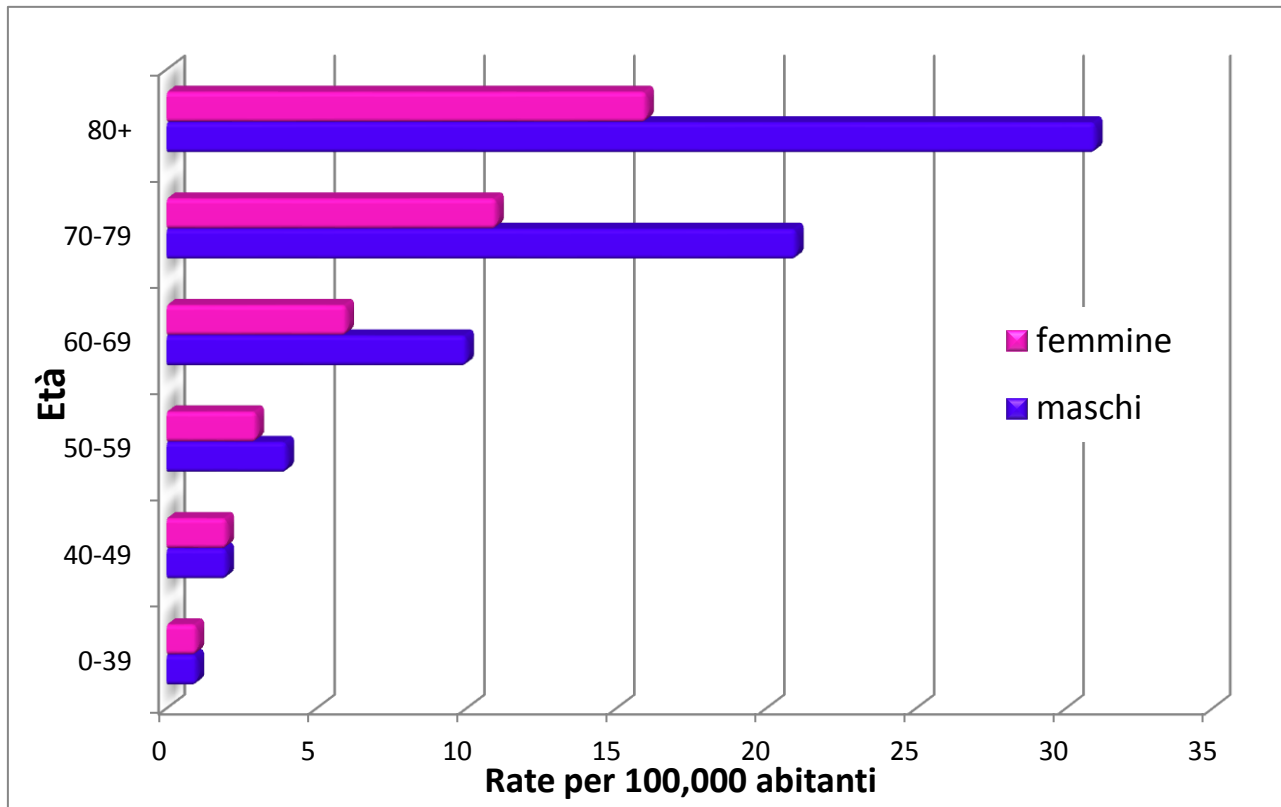


Figura 1. Incidenza della LAM nella popolazione divisa per età e sesso.

Le Leucemie Mieloblastiche Acute possono essere distinte in tre differenti categorie in base alla modalità di insorgenza e all'eziopatogenesi:

- LAM PRIMARIE O “DE NOVO”: insorgono in soggetti per i quali non è nota una esposizione ambientale, professionale o iatrogena ad agenti leucemogeni;
- LAM SECONDARIE AD ESPOSIZIONE NOTA AD AGENTI LEUCEMOGENI: forme secondarie a trattamenti chemioterapici e/o radioterapici intrapresi per neoplasie maligne pregresse;

- LAM SECONDARIE AD UNA PRECEDENTE SINDROME MIELODISPLASTICA: la leucemia mieloide acuta rappresenta l'evoluzione della mielodisplasia. Queste forme sono più spesso associate ad una prognosi sfavorevole.

1.1.1 CLINICA

La presentazione clinica della leucemia mieloblastica acuta dipende dai meccanismi patogenetici alla base della patologia stessa, consistenti in:

- INFILTRAZIONE DEL MIDOLLO EMOPOIETICO DA PARTE DI BLASTI LEUCEMICI: le cellule appartenenti alla normale mielopoiesi risultano ostacolate nei loro processi di differenziazione e proliferazione dalla presenza dei blasti, che occupano la maggior parte dello spazio disponibile. Questo condiziona lo stabilirsi di gradi variabili di anemia, neutropenia e piastrinopenia. Le manifestazioni cliniche secondarie a queste alterazioni sono rappresentate dalla comparsa di astenia, aumentata suscettibilità alle infezioni (prevalentemente batteriche e a carico di cute, cavo orale, orofaringe, apparato respiratorio) e predisposizione alle manifestazioni emorragiche.
- INFILTRAZIONE BLASTICA DI ORGANI E TESSUTI NON EMOPOIETICI: questa condizione coinvolge più frequentemente fegato (epatomegalia), milza (splenomegalia), gengive (ipertrofia gengivale) e cute (leucemidi). L'infiltrazione può essere diffusa oppure può determinare la formazione di masse (sarcoma mieloide).
- LIBERAZIONE DI CITOCHINE DA PARTE DI CELLULE LEUCEMICHE, MONOCITI-MACROFAGI E LINFOCITI: ne

conseguono febbre, calo ponderale, astenia sproporzionata al grado di anemia, sudorazioni e algie diffuse.

Il quadro clinico è decisamente variabile: esso può infatti raggiungere livelli diversi di gravità e presentarsi in forma completa o parziale, poiché in ogni paziente può prevalere un diverso meccanismo patogenetico.

L'esame obiettivo di un paziente affetto da Leucemia Mieloide Acuta permette, di solito, di evidenziare i segni relativi a:

- ANEMIA: tachicardia, soffi sistolici da eiezione, pallore di cute e mucose;
- NEUTROPENIA: febbre, alterazioni dell'obiettività toracica o altri segni in rapporto con la presenza di infezioni;
- TROMBOCITOPENIA: epistassi, petecchie, porpora o ecchimosi cutanee, alterazioni del visus provocate da emorragie retiniche, gengivorragie, ipermenorrea, metrorragie, eccetera.

Di meno frequente riscontro sono epatomegalia, splenomegalia, linfoadenomegalie, ipertrofia gengivale, lesioni cutanee, interessamento del sistema nervoso centrale e dei nervi cranici¹.

1.1.2 LABORATORIO

Le anomalie dell'emogramma rappresentano molto spesso i primi segni di malattia e possono essere reperiti anche in una condizione di pieno benessere.

I reperti di più frequente riscontro sono rappresentati da:

- Riduzione di grado variabile dei livelli di emoglobina, con conseguente anemia da eritropoiesi inefficace, per lo più di tipo normocromico, normocitico;
- Alterazioni variabili del numero di leucociti (25% dei pazienti ha $WBC < 5000/\mu l$, 50% tra 5000 e $50.000/\mu l$, 25% più di $50.000/\mu l$);
- Riduzione del numero di piastrine, importante nel 25% dei casi circa ($< 20.000/\mu l$);
- Non costante, ma rilevante, è la presenza di cellule blastiche nel sangue periferico².

1.1.3 DIAGNOSI

Le indagini diagnostiche la cui esecuzione è mandatoria nel caso sussista il sospetto clinico di Leucemia Acuta Mieloblastica comprendono l'esecuzione di emogramma completo con osservazione dello striscio al microscopio ottico ed aspirato midollare, ma dovrebbero anche prevedere una biopsia osteomidollare.

L'esame del midollo emopoietico mostra tipicamente un aumento della cellularità, associato alla scomparsa del normale tessuto adiposo. Il parenchima risulta infiltrato da parte di cellule blastiche in una quota superiore al 20%, fino al raggiungimento, in alcuni casi, della completa sostituzione³.

La diagnosi definitiva di Leucemia Mieloblastica Acuta e la differenziazione di quest'ultima dalla Leucemia Linfoblastica Acuta si basano sul riconoscimento dei blasti midollari come elementi appartenenti alla linea mieloide.

Le indagini di tipo morfologico, citochimico, immunofenotipico e di biologia molecolare permettono di determinare con certezza la diagnosi di natura. In particolare, la valutazione dell'immunofenotipo tramite citometria a flusso

consente di individuare marcatori di superficie specifici della mielopoiesi. Non è però da sottovalutare il fatto che, in circa un quinto dei casi, le cellule leucemiche esprimono alla superficie sia marcatori di linea linfoide, sia marcatori di linea mieloide. Si parla di leucemia *biclonale* nel caso in cui coesistano blasti mieloidi e linfoidi morfologicamente ed immunofenotipicamente diversi, di leucemia *bifenotipica* se è presente un solo clone leucemico che esprime alla superficie antigeni linfoidi e mieloidi insieme¹. L'espressione di una combinazione anomala di marcatori immunofenotipici alla superficie delle cellule blastiche permette di utilizzare l'esame immunofenotipico per valutare la Malattia Minima Residua.

Circa l'80% dei pazienti affetti da Leucemia Acuta Mieloide presenta una popolazione blastica esprimente alla superficie la molecola CD33, le cui funzioni biologiche sono ancora poco conosciute^{4; 5}. Questa molecola è specifica della linea differenziativa mielomonocitica; essa viene espressa dai normali progenitori emopoietici maturanti, ma non dalla cellula staminale CD34⁺. Le implicazioni terapeutiche della suddetta molecola sono notevoli: oggi è infatti disponibile il composto Gemtuzumab Ozogamicin (CMA-676, Mylotarg), un anticorpo monoclonale anti-CD33 associato all'antibiotico antitumorale calicheamicina.

Le Leucemie Mieloidi Acute possono essere suddivise, sulla base delle caratteristiche morfologiche, della linea differenziativa e della capacità di maturazione mantenuta dalle cellule leucemiche, in otto citotipi (da M0 a M7), secondo la classificazione FAB (*French-American-British*) modificata⁶:

- M0: MIELOBLASTICA SENZA MATURAZIONE;
- M1: MIELOBLASTICA CON MINIMA MATURAZIONE MIELOIDE;

- M2: MIELOBLASTICA CON DISTINTA MATURAZIONE MIELOIDE
- M3: PROMIELOCITICA;
- M4: MIELO-MONOBLASTICA;
- M5: MONOBLASTICA;
- M6: ERITROBLASTICA;
- M7: MEGACARIOBLASTICA.

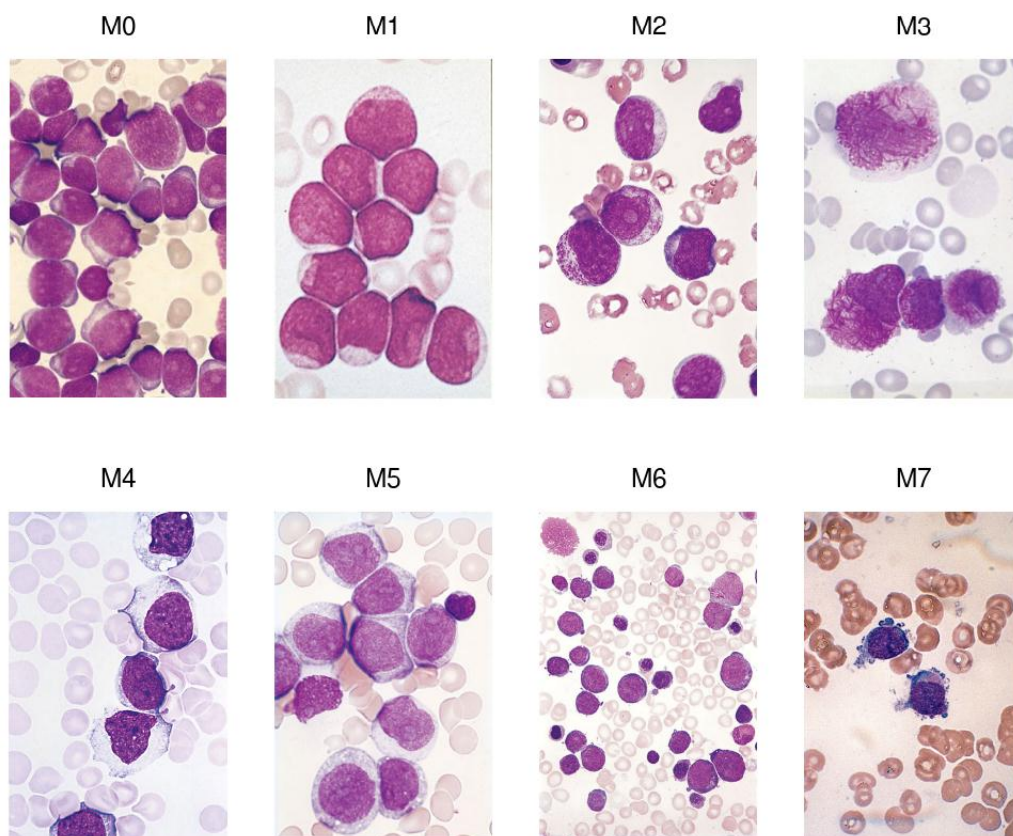


Figura 2. Citotipi di LAM secondo la classificazione FAB.

La classificazione WHO (*World Health Organization*), invece, suddivide le Leucemie Mieloblastiche Acute in:

- LAM con anomalie genetiche ricorrenti:
 - LAM con traslocazioni/inversioni bilanciate a significato prognostico rilevante
 - t(8;21)(q22;q22) : 5% circa delle LAM ;
 - inv(16)(p13;q22): 5-8% delle LAM;
 - t(15;17)(q22;q11.2-q12) : 1-2% delle LAM ;
 - t(1 ;22)(p13 ;q13): poco frequente, rappresenta meno dell'1% delle LAM;
 - t(9 ;11)(p22 ;q23): 2% delle LAM ;
 - t(6 ;9)(p23 ;q34) ;
 - inv(3) o t(3;3)(q21 ;q26).
 - LAM con mutazioni geniche; tra queste le più rilevanti sono a carico di:
 - Fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3): rappresentano il 20-40% delle LAM;
 - Nucleofosmina (NPM): tale mutazione, a significato prognostico favorevole, ricorre nel 30% circa delle LAM;
 - CEBPA: 6-15% delle LAM *de novo* e 15-18% delle LAM a cariotipo normale.
- LAM con alterazioni correlate a MDS/LAM con displasia multilineare: quadri di franca Leucemia Acuta Mieloide con

caratteristiche morfologiche correlabili a MDS o con storia di pregressa MDS;

- LAM correlate a terapia: complicate a lungo termine di una pregressa terapia radiante o chemioterapia. Comprende due diversi *subsets*: LAM che esordiscono a distanza di 5-10 anni dall'esposizione ad agenti alchilanti o radioterapia e LAM che occorrono 1-5 anni dopo l'esposizione ad agenti che interferiscono con la Topoisomerasi II.
- LAM non altrimenti specificate: sono forme che non rientrano nelle precedenti categorie, pur soddisfacendo i criteri diagnostici di LAM.

La prognosi delle Leucemie Acute Mieloblastiche risulta influenzata da vari fattori, la cui individuazione è, perciò, di fondamentale importanza. Tra i fattori prognostici si riconoscono:

- ETA': un'età superiore ai sessant'anni costituisce un fattore prognostico negativo;
- IPERLEUCOCITOSI: il rilievo di un elevato numero di leucociti alla diagnosi correla con una percentuale di remissioni complete dopo terapia inferiori alla norma e con una più elevata frequenza di recidiva;
- CITOTIPO FAB: i citotipi M0, M6, M7 sono associati ad una prognosi sfavorevole;
- FORME SECONDARIE A MIELODISPLASIA: questa condizione ha un significato prognostico negativo;

- ALTERAZIONI GENOMICHE: t(8;21), inv(16), t(15;17) influiscono positivamente sulla prognosi, mentre monosomie dei cromosomi 7 o 5 e t(6;9) hanno un significato negativo;
- ALTERAZIONI MOLECOLARI: alterazioni di FLT3 si associano per lo più ad una prognosi infausta, mentre le mutazioni di NPM, se isolate, riconoscono una buona prognosi.

1.1.4 CITOGENETICA

La caratterizzazione citogenetica delle cellule leucemiche è di fondamentale importanza, in quanto concorre alla determinazione della diagnosi, della strategia terapeutica da intraprendere e della prognosi. Si possono distinguere alterazioni citogenetiche comuni ed alterazioni molecolari ricorrenti.

1.1.5 ALTERAZIONI CITOGENETICHE COMUNI

- t(15;17)(q22;q11.2-q12): PML-RAR α

Questa traslocazione (riconoscibile mediante tecniche di biologia molecolare nei rari casi in cui non sia identificabile tramite indagini convenzionali di citogenetica) porta alla fusione tra i geni PML, oncosoppressore nei modelli murini⁷, e RAR α , che codifica per il recettore α dell'acido retinoico. La proteina di fusione codificata in seguito alla traslocazione è in grado di bloccare il processo maturativo dei blasti allo stadio di promielocita e di favorirne la sopravvivenza⁸. L'individuazione di questi meccanismi ha permesso di rendere la Leucemia Acuta Promielocitica (citotipo FAB M3), cui questa alterazione è invariabilmente associata, una patologia a prognosi favorevole, con percentuali di ricaduta post-terapia inferiori rispetto agli altri citotipi. Il trattamento prevede la somministrazione di acido *all-trans-retinoico* (tretinoina) a dosi

farmacologiche e di antracicline, cui la Leucemia Acuta a Promielociti si è rivelata particolarmente sensibile⁹.

- t(8;21)(q22;q22): AML-ETO

Questa traslocazione si riscontra nell'8% circa delle LAM¹⁰ e si associa frequentemente al citotipo M2, secondo la classificazione FAB: il 90% dei pazienti con la presente traslocazione ha una LAM M2, il restante 10% ha una LAM M4. Nella maggioranza dei casi si riscontra eosinofilia¹ [Tura S. *et al.*, 2003]. La traslocazione porta alla fusione tra il gene ETO ed il gene AML1 o CBF α . Quest'ultimo, formando un eterodimero con il gene CBF β , svolge funzioni di oncosoppressore; più precisamente favorisce il normale differenziamento delle cellule staminali emopoietiche¹¹.

La presenza di questa anomalia cromosomica sembra essere associata ad una maggior sensibilità alla chemioterapia, con sopravvivenza a 5 anni pari al 69% ed una percentuale di remissioni complete del 98% dei casi¹⁰.

- inv(16)(p13;q22): CBF β -MYH11

L'inversione del cromosoma 16 si presenta in circa il 4% dei pazienti con diagnosi di Leucemia Acuta Mieloblastica¹⁰ e coinvolge i geni MYH11 e CBF β , esattamente come avviene nel caso di t(16;16) (p13;q22). Il citotipo più spesso associato a questa alterazione è il FAB M4¹.

Questa anomalia è associata, come la precedente, alla comparsa di eosinofilia ed ha anch'essa una buona prognosi (88% remissioni complete, 61% di sopravvivenza a cinque anni)¹⁰.

Esiste però un sottogruppo di pazienti con inv(16)(p13;q22) o con t(8;21)(q22;q22) nel quale sono state identificate mutazioni puntiformi del gene

c-kit, alterazioni alle quali è attribuito un significato prognostico sfavorevole (35% di sopravvivenza ad 1 anno, mentre la sopravvivenza ad un anno senza mutazione puntiforme di *c-kit* al codone 816 è del 90%)¹². In questi casi si è rivelato di importanza cruciale l'utilizzo di *Dasatinib*, in grado di bloccare l'azione tirosin-chinasica di *c-kit*¹³.

- *inv(3)(q21;q26)* e alterazioni 3q26: *EVI1*

Questa alterazione, che compare nel 3% circa dei casi di LAM¹⁰, determina la sovraespressione del gene *EVI1*. Sia nell'inversione del cromosoma 3, sia nelle traslocazioni (3;3), infatti, tale gene viene giustapposto ad una sequenza localizzata sul cromosoma 3q21, che funge da *enhancer*. Ne consegue l'attivazione dei fattori di trascrizione della famiglia AP1, tra cui compaiono i proto-oncogeni *c-FOS* e *c-JUN*. Tale condizione si palesa a livello clinico con la cosiddetta sindrome del 3q21q26, che consiste nella sovraespressione di *EVI1*, in una sindrome mielodisplastica ed in una leucemia acuta¹⁴ a prognosi infausta (rischio di ricaduta dopo terapia 85%, sopravvivenza a 5 anni 12%)¹⁰.

- Alterazioni 11q23: *MLL*

Il gene *MLL* (*mixed lineage leukemia*) si trova implicato in numerose traslocazioni coinvolgenti partner diversi in molti casi di Leucemia Acuta. Questo gene può essere alterato sia nelle leucemie acute di linea mieloide, in particolare nei citotipi M4 ed M5, sia in quelle di linea linfoblastica (in questo caso l'alterazione ha significato prognostico negativo)¹.

MLL fa parte della famiglia dei geni cosiddetti "omeotici", molto conservati durante l'evoluzione (è l'omologo del gene *trithorax* in *Drosophila Melanogaster*)¹⁵ ed ha funzioni regolatorie nei confronti di altri geni della stessa famiglia durante lo sviluppo. Il meccanismo tramite il quale le alterazioni di

MLL partecipano alla leucemogenesi potrebbe interessare la deregolazione di geni omeotici fondamentali per il processo emopoietico¹⁶.

Le Leucemie Acute Mieloidi associate ad un'alterazione di MLL rappresentano circa il 4% dei casi ed hanno una prognosi che non si discosta da quella delle forme con cariotipo normale¹⁰.

- t(6;8)(p23;q34): DEK-CAN

La proteina codificata normalmente dal gene DEK fa parte dei meccanismi che assicurano il corretto *splicing* dell'm-RNA¹⁷ e verosimilmente contribuisce al mantenimento dell'integrità del genoma¹⁸. Probabilmente questa mutazione altera la funzione del gene DEK, impedendo il corretto funzionamento della proteina che ne deriva. La traslocazione è associata ad una prognosi sfavorevole e ricorre nell'1-5% dei casi di LAM¹⁹.

- Monosomia dei cromosomi 5 e 7

La prognosi associata a queste alterazioni, che riconoscono un'incidenza del 2 e 4% rispettivamente, è fortemente infausta. Il rischio di ricaduta è pari all'80-90%, mentre la sopravvivenza media è del 4-10% a cinque anni.

Sono possibili anche quadri di del(5q), con prognosi sovrapponibile alla precedente, e del(7q), con prognosi leggermente migliore¹⁰.

- Trisomia dei cromosomi 8; 21; 22

Le Leucemie Acute Mieloidi caratterizzate da queste anomalie (incidenza del 9, 3 e 1%, rispettivamente) non riconoscono una prognosi diversa da quelle a cariotipo normale¹⁰.

- Cariotipo complesso

Si parla di cariotipo complesso nel caso in cui siano presenti due o più alterazioni citogenetiche clonali senza alcuna correlazione tra loro. Secondo la definizione del britannico *Medical Research Council* (MRC), invece, sono necessarie almeno cinque anomalie citogenetiche clonali per poter definire il cariotipo complesso.

Il significato prognostico associato a tale condizione, che ricorre nel 6% delle leucemie acute mieloblastiche, è sfavorevole¹⁰.

- Altre alterazioni

Sotto questa definizione è compreso un gruppo eterogeneo di anomalie diverse da quelle precedentemente esposte. Ricorrono nel 37% dei pazienti e nessuna determina prognosi negativa¹⁰.

1.1.6 ALTERAZIONI MOLECOLARI RICORRENTI

- Mutazioni attivanti di FLT3:

FLT3 (*Fms-related tyrosin kinase*) appartiene alla famiglia dei recettori di superficie ad attività tirosin-chinasica di tipo III, in cui sono compresi anche *c-kit*, *c-fms*, PDGFR α e β . FLT3 è codificato da un gene, situato nel locus 13q12, che ricopre un ruolo preciso nei processi di proliferazione cellulare a carico dei progenitori emopoietici²⁰. Le alterazioni genetiche che possono determinare l'attivazione costitutiva di FLT3 sono almeno due:

- *Internal Tandem Duplication (ITD)*: si verificano a livello del dominio iuxtamembrana di FLT3. Ricorrono nel 20-25% delle Leucemie Mieloidi Acute. Le ITD determinano l'autofosforilazione di FLT3, che

viene resa quindi indipendente dalla presenza del ligando^{21; 22}. La presentazione clinica associata a questa anomalia è rappresentata dalla comparsa di iperleucocitosi e da una sopravvivenza significativamente inferiore rispetto alle forme prive di questa alterazione (12,8 mesi rispetto a 29,1)²¹.

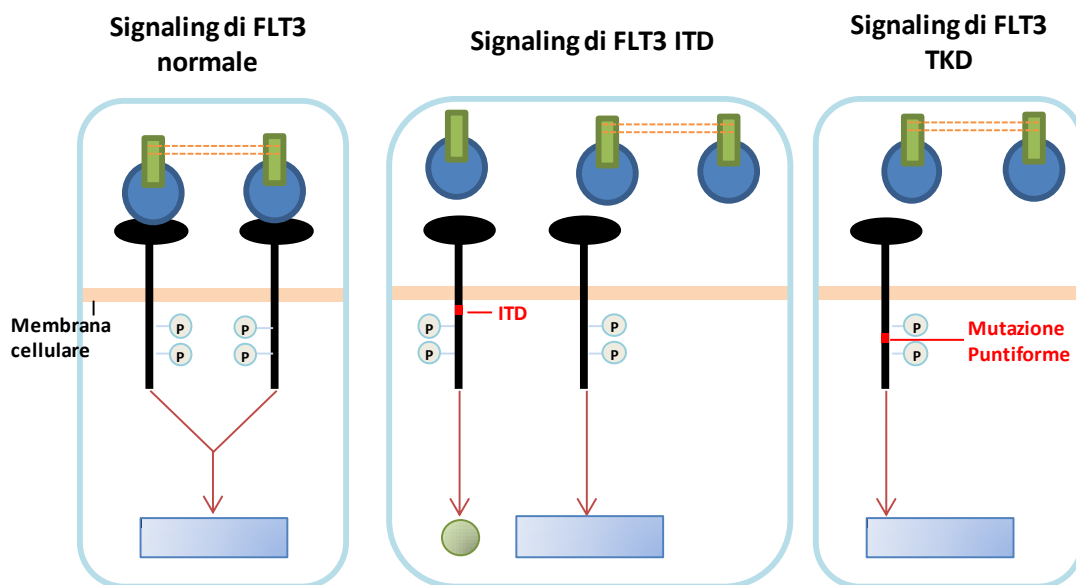


Figura 3. Mutazioni attivanti a carico di FLT3: ITD e mutazioni puntiformi.

- Mutazione puntiforme con sostituzione dell'amminoacido Asparagina in posizione 835: questa alterazione si colloca a livello dell'*activation loop* di FLT3, che di conseguenza rimane in conformazione aperta. In condizioni normali il sito attivo può essere raggiunto solo dopo la sua autofosforilazione, che avviene in seguito al riconoscimento del ligando. A causa di questa alterazione, al contrario, l'ATP e gli altri substrati possono raggiungere in maniera non regolata l'*activation loop*²¹. Questa mutazione correla con una diminuzione della sopravvivenza libera da malattia, in assenza di iperleucocitosi. E' probabile che essa

attivi un *pathway* di trasduzione del segnale differente e che abbia un potere trasformante diverso dalle ITD²³. E' più rara della precedente alterazione (7% dei casi) ed è correlata anch'essa ad una prognosi sfavorevole.

Qualunque sia la natura dell'alterazione di FLT3, questa è invariabilmente associata ad una prognosi sfavorevole. Oltre a ciò bisogna ricordare che le due anomalie non hanno alcuna correlazione tra loro e che entrambe possono essere presenti contemporaneamente nello stesso paziente: esistono casi di pazienti portatori di Leucemia Mieloide Acuta e sarcoma mieloide eterogenei per lo stato mutazionale di FLT3. Per questo motivo FLT3 non rappresenta un buon marcatore di Malattia Minima Residua.

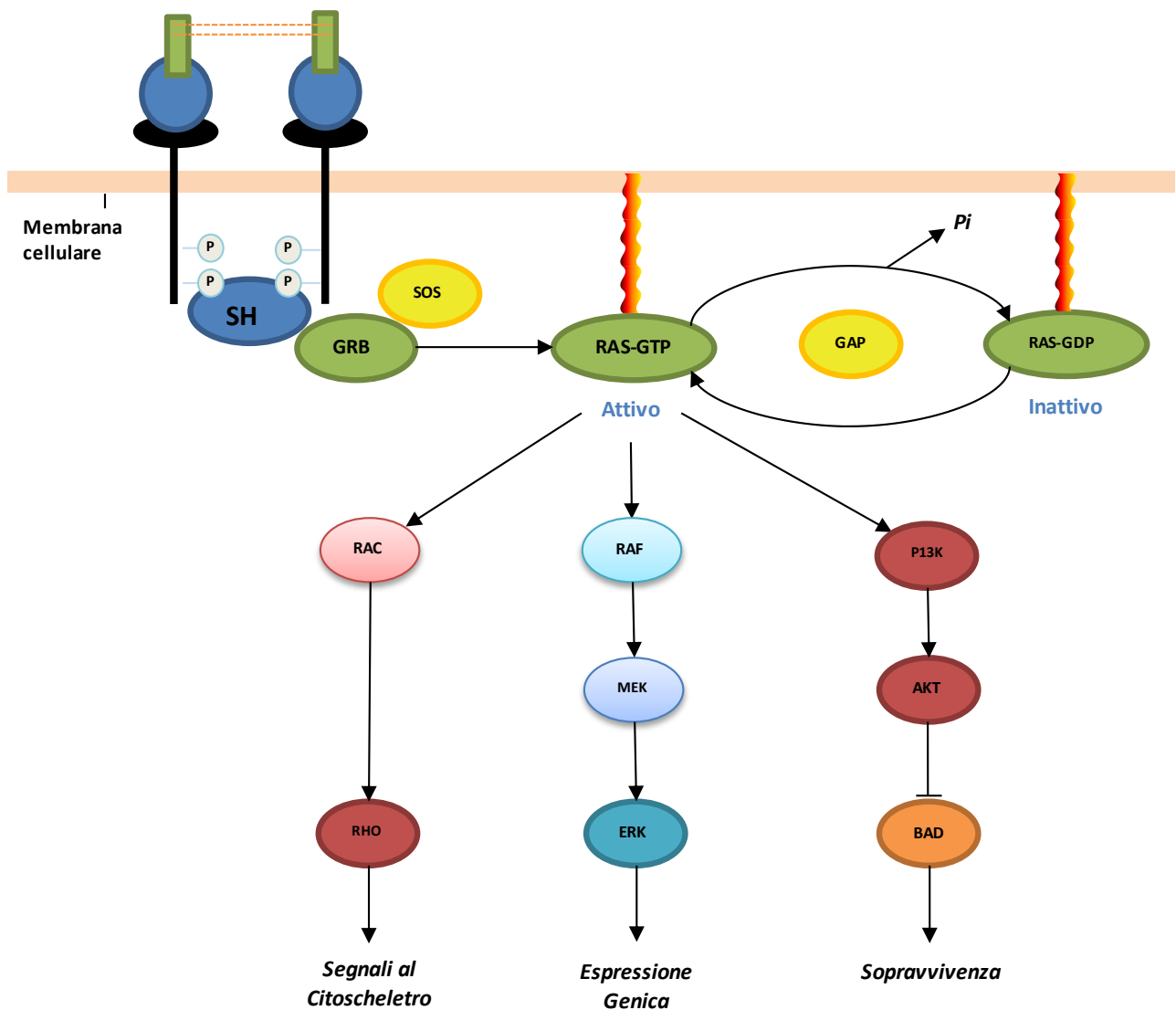


Figura 4. Pathway di attivazione di FLT3.

- Mutazioni di NPM1

Il gene NPM1, posto sul cromosoma 5q35, codifica per la nucleofosmina, una proteina di 294 amminoacidi a localizzazione nucleolare. In condizioni normali la nucleofosmina si sposta continuamente tra nucleo e citoplasma per svolgere le sue funzioni: essa funge da *chaperon* (viene detta *chaperon* una

proteina che guida le altre proteine nel processo di ripiegamento; fanno parte di questa famiglia le *Heat Shock Proteins*), da trasportatrice di parti di ribosoma attraverso la membrana nucleare e da regolatrice di p53 ed ARF, con il ruolo di oncosoppressore. Inoltre rappresenta uno dei substrati del complesso CDK/ciclica E.

La mutazione del gene NPM1 determina, sulla nucleofosmina, la sostituzione dei residui di triptofano in posizione 288 ed eventualmente 290, cosa che impedisce sia alla proteina mutata, sia a quella *wild type*, di spostarsi dal citoplasma. Tale effetto è definito dominante negativo ed è esercitato anche sulla proteina codificata dal gene normale, posto sul cromosoma omologo. Altra conseguenza della mutazione di NPM1 è, verosimilmente, l'inattivazione di ARF e p53, con inibizione dell'apoptosi.

Le alterazioni di NPM1 sono ravvisabili nel 50-60% delle LAM a cariotipo normale ed in una percentuale non trascurabile di casi (un terzo circa) si trovano associate alla mutazione di FLT3, in particolare alla presenza di ITD. Le alterazioni di NPM1 hanno un significato clinico favorevole, poiché correlano con una maggior sensibilità alla chemioterapia e con una sopravvivenza a cinque anni pari al 60% circa. Questo effetto viene del tutto perduto nel caso in cui coesista una mutazione di FLT3, il cui significato negativo prevale, per ragioni ancora non chiarite. A differenza di quanto si è detto per le mutazioni di FLT3, quelle a carico di NPM1 sembrano essere più stabili e per questo si riveleranno probabilmente adatte, in futuro, ad essere utilizzate come *marker* di Malattia Minima Residua^{24; 25}.

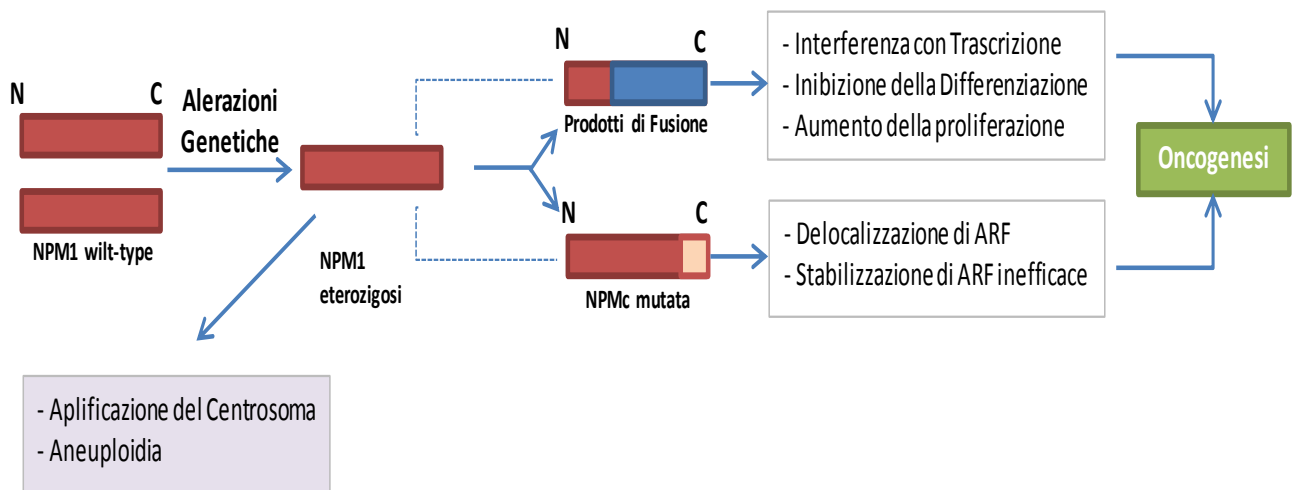


Figura 5. Ruolo di NPM nella cancerogenesi.

- Espressione ectopica di PAX5

Il gene PAX5 è localizzato sul cromosoma 9p13 e codifica un fattore di trascrizione importante per il processo di differenziamento dei linfociti B. Nei topi privi di PAX5 la maturazione si blocca a livello di linfocito pre-B.

Per quanto concerne il meccanismo tramite cui PAX5 collabora al processo di leucemogenesi, pare che esso sia in grado di reprimere i geni responsabili del differenziamento mieloide: in condizioni normali, infatti, PAX5 non è espresso dalle cellule appartenenti alla linea mieloide. Alcuni studi hanno dimostrato che, nel caso in cui tale gene venga espresso, il processo di differenziamento risulta bloccato. Questa condizione comporta l'automantenimento, anche se non del tutto indipendente dalla presenza di fattori di crescita, quali GM-CSF o IL-3, dei progenitori mieloidi coesprimenti marcatori di entrambe le linee. Probabilmente l'espressione di PAX5 nelle cellule mieloidi si pone in rapporto

alla progressione di malattia e non è in grado, da sola, di provocare una leucemia, in quanto le cellule mantengono comunque la capacità differenziativa²⁶.

Questa alterazione è frequentemente associata alle leucemie caratterizzate dalla t(8;21): nel 35% di questi casi l'iperespressione di PAX-5 è evidenziabile mediante immunocistochimica, nei casi rimanenti tramite l'esecuzione di RT-PCR quantitativa. Questa osservazione spiega la presenza, sui blasti leucemici con t(8;21), dei marcatori di linea linfoide CD19 e CD79a²⁷.

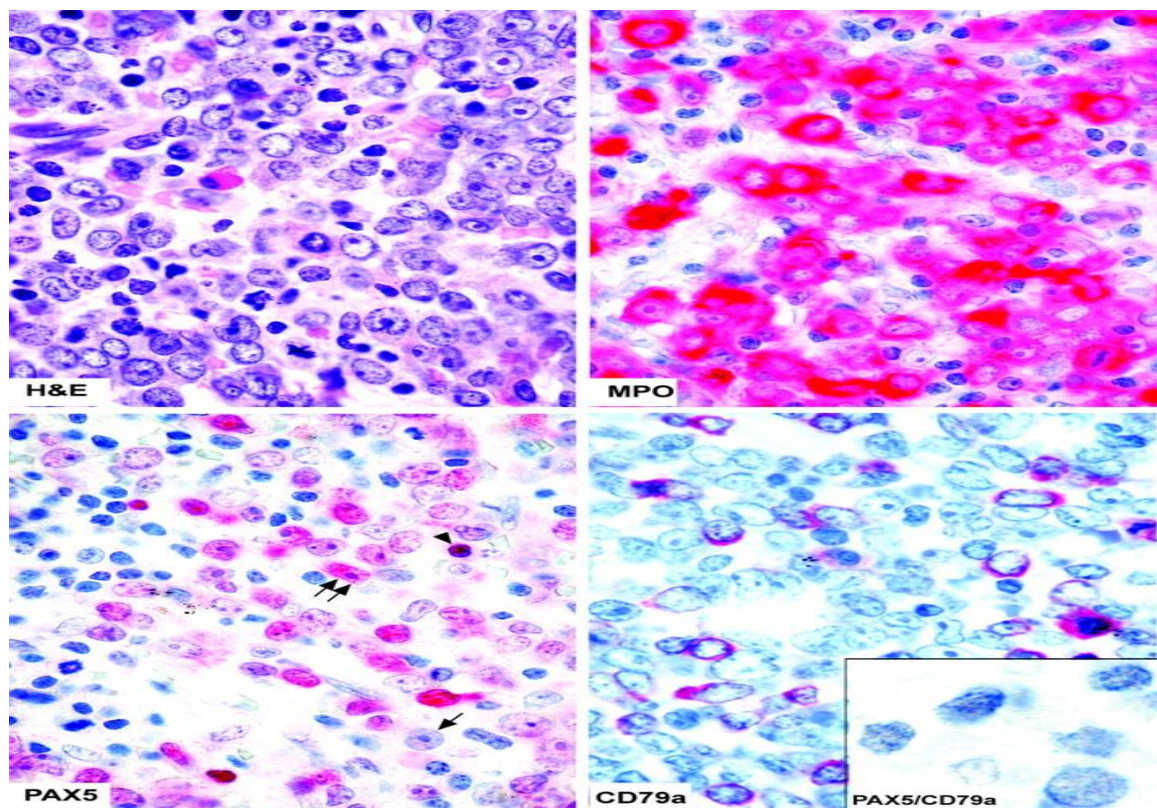


Figura 6. Aspirati midollari con colorazione immunocistochimica. Legenda: doppia freccia: blasti che esprimono PAX5 a livello nucleare; freccia singola: blasto PAX5 negativo; punta di freccia: linfocito B normale esprimente PAX5. In basso a sinistra: blasti che coesprimono PAX5 e CD79a

1.1.7 TERAPIA

Circa 300.000 pazienti nel mondo sono affetti da Leucemia Mieloblastica Acuta e l'età mediana alla diagnosi è pari a 69 anni.

La terapia delle Leucemie Acute Mieloblastiche si basa sulla somministrazione di combinazioni chemioterapiche ad alte dosi che permettano di indurre una Remissione Completa e devono essere seguite da uno o più cicli atti a consolidare tale risposta. I diversi cicli di chemioterapia vengono somministrati nell'arco di pochi mesi dalla diagnosi.

I farmaci classicamente utilizzati nella terapia di induzione della remissione sono le antracicline associate alla Citosina Arabinoside. Lo schema di più largo impiego è denominato 3/7 e prevede l'infusione continua di citarabina per 7 giorni, associata alla somministrazione di una antraciclina (più spesso daunorubicina) per 3 giorni.

Il 60% circa dei pazienti al di sotto dei 60 anni di età ottiene la Remissione Completa a seguito della chemioterapia di induzione, mentre tra i pazienti anziani (età superiore ai 60 anni) solo il 50% circa raggiunge la Remissione Completa.

La guarigione dalla Leucemia Acuta Mieloide viene raggiunta però molto più raramente, soprattutto nei pazienti anziani o nei sottogruppi di pazienti caratterizzati dalla presenza di fattori di rischio sfavorevoli all'esordio.

Al fine di consolidare la risposta ottenuta a seguito della terapia di induzione, i pazienti vengono sottoposti ad uno o più cicli di consolidamento, rappresentati da schemi di chemioterapia intensiva. Questi ultimi sono seguiti, ove possibile, da ulteriori terapie atte a migliorare ulteriormente l'*outcome*, prime fra tutte il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche.

Mentre il regime di induzione è largamente standardizzato, le terapie di consolidamento possono variare a seconda di diversi fattori, in particolare sulla base dei fattori prognostici all'esordio²⁸.

Il sottogruppo di pazienti che riconosce il peggior *outcome* è classicamente rappresentato dagli anziani: mentre, come detto, circa il 40-50% riesce ad ottenere la Remissione Completa, solo il 10% circa di essi è un lungo sopravvivate.

Le ragioni dell'andamento sfavorevole in questa categoria di pazienti sono varie: da un lato, i pazienti anziani sono più spesso ritenuti *unfit* per programmi chemioterapici intensivi, in ragione delle molteplici comorbidità e del peggiore *Performance Status* rispetto ai giovani adulti e vengono perciò trattati in maniera meno aggressiva rispetto ai pazienti di giovane età; dall'altro, l'incidenza di fattori prognostici sfavorevoli, quali una LAM secondaria o la presenza di caratteristiche citogenetiche avverse (ad esempio il cariotipo complesso), sono di più frequente riscontro²⁹.

Questi dati, unitamente al fatto che le LAM sono di più frequente riscontro nel paziente anziano, rendono l'individuazione di regimi terapeutici efficaci in questo sottogruppo di pazienti uno dei principali obiettivi.

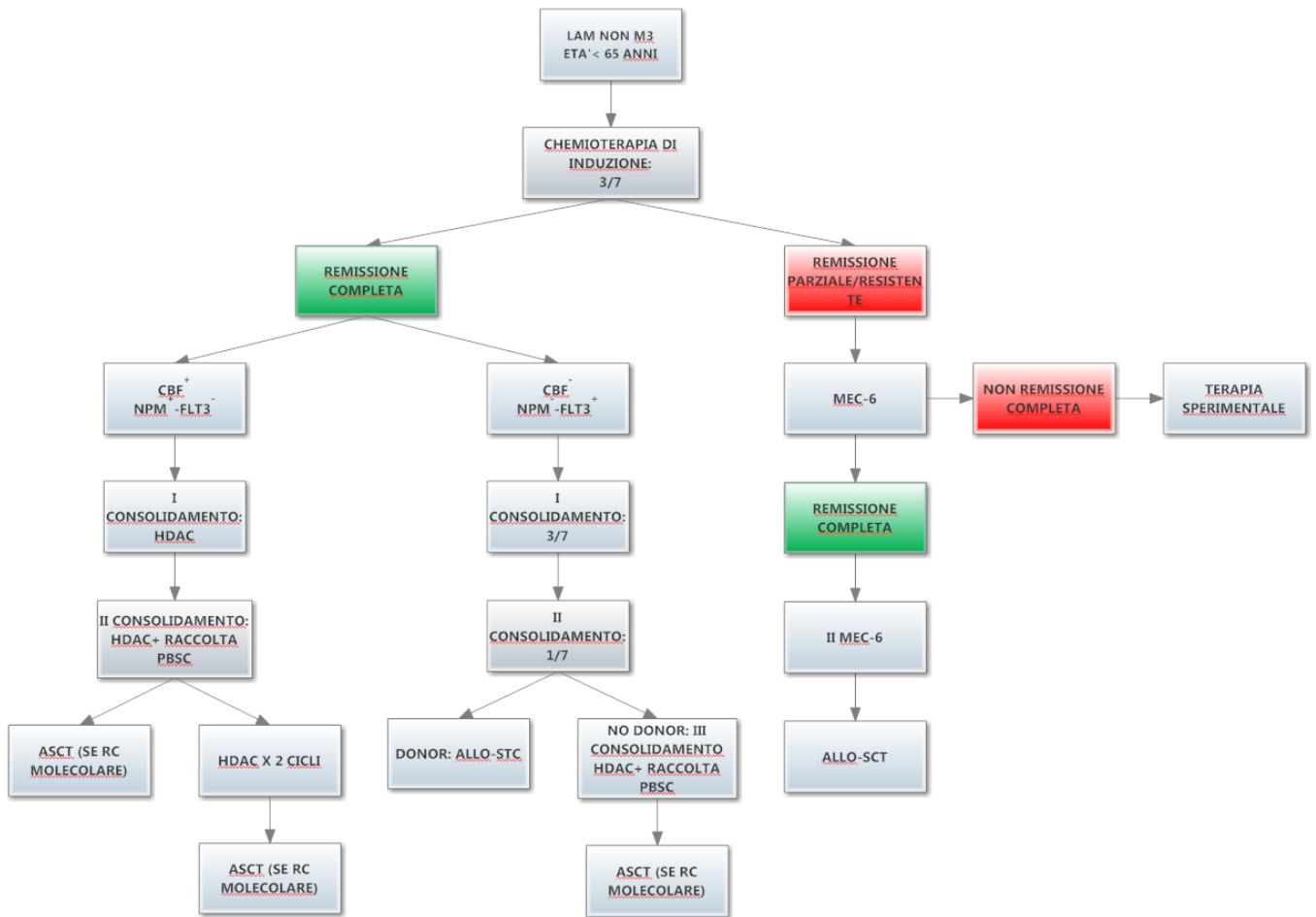


Figura 7. Esempio di *flow-chart* per la scelta terapeutica nella LAM del giovane adulto.

1.2 IMMUNOTOLLERANZA ED IMMUNOEDITING

Il sistema immunitario costituisce un meccanismo notevolmente complesso e caratterizzato da elevata specificità. Esso ricopre la fondamentale funzione di proteggere l'organismo ospite dall'azione di agenti patogeni esterni e autologhi.

I meccanismi effettori tramite cui tale funzione si esplica sono rappresentati dalla sintesi di anticorpi e dalla proliferazione di cellule altamente specializzate nel riconoscere ed eliminare i patogeni (fagociti e linfociti).

Oltre alla distruzione di agenti patogeni provenienti dall'ambiente esterno, il sistema immunitario ricopre un ruolo fondamentale nella prevenzione delle neoplasie. E' stato infatti dimostrato che le cellule tumorali sono in grado di evocare una risposta immunitaria mediante l'esposizione di antigeni riconosciuti come aberranti, o *non-self*, alla loro superficie.

Il sistema immunitario ricopre tre ruoli principali nella prevenzione dei tumori:

- Esso protegge l'ospite dai tumori secondari a infezione virale favorendo l'eliminazione del virus stesso;
- L'eliminazione del patogeno, con la conseguente risoluzione del *pabulum* infiammatorio, può prevenire la creazione di un ambiente favorente la crescita tumorale;
- Il sistema immunitario è in grado di riconoscere ed eliminare selettivamente le cellule neoplastiche mediante il riconoscimento di specifici antigeni di superficie.

Nel 1863 Rudolph Virchow osservò per primo che frequentemente nella sede tumorale è presente una infiltrazione linfocitaria, suggerendo una possibile relazione tra infiammazione e tumore. Successivamente Lewis Thomas e Macfarlane Burnet formalizzarono il concetto di Immunosorveglianza, già espresso da Paul Erlich all'inizio del XX secolo³⁰.

L'esistenza dei meccanismi di immunosorveglianza è avvalorata dall'osservazione che, in soggetti affetti da diverse forme di *immunodeficit*, la prevalenza dei tumori è aumentata rispetto alla popolazione generale.

D'altro canto è noto e di comune osservazione che, nonostante la presenza di un sistema immunitario normofunzionante, sia comunque possibile lo sviluppo di neoplasie.

Da queste ultime osservazioni ha tratto origine il più articolato concetto di *Immunoediting*, nel quale l'interazione tra sistema immunitario e tumore si compone di tre fondamentali momenti:

- **Eliminazione:** questa fase corrisponde al concetto di immunosorveglianza; consiste cioè nel riconoscimento e nell'eliminazione delle cellule neoplastiche da parte del sistema immunitario. L'eliminazione può però essere incompleta e permettere il passaggio alla seconda fase;
- **Equilibrio:** durante questa fase si instaura un equilibrio tra cellule neoplastiche, che rimangono quiescenti o continuano a proliferare, accumulando ulteriori caratteristiche geniche grazie proprio alla pressione selettiva esercitata dal sistema immunitario. Tale fase è strettamente dipendente dall'elevato livello di instabilità genetica, tipica dei tumori maligni. Se il sistema immunitario continua a non essere in grado di eliminare definitivamente la neoplasia, si passa alla terza fase;
- **Escape:** il sistema immunitario non risulta più in grado di controllare la crescita tumorale, che diviene incontrollata^{31; 32}. L'immunità nei confronti dei tumori è definita come la capacità del sistema immunitario di eliminare il tumore stesso; concetto chiave della teoria dell'*immunoediting* è che la stessa immunità crea una pressione selettiva sulle cellule tumorali, che acquisiscono l'abilità di eludere i meccanismi effettori del sistema immunitario³³. Questo meccanismo pone le basi per il passaggio della neoplasia ad uno stadio clinicamente evidente ed anche alla formazione di metastasi e rappresenta, perciò, un campo di ricerca di primario interesse.

I principali meccanismi mediante cui i tumori divengono in grado di superare le difese immunitarie sono rappresentati da:

- Riduzione o perdita dell'espressione alla superficie cellulare di molecole HLA di classe I e conseguente mancato riconoscimento della cellula da parte dei linfociti T citotossici;
- Riduzione nell'espressione di antigeni tumorali immunogenici, favorita dall'instabilità genetica propria delle cellule tumorali;
- Assente espressione di molecole co-stimolatorie e conseguente anergia o induzione dell'apoptosi dei linfociti T;
- Produzione di molecole, quali il *Tumor Necrosis Factor β* (TNF- β), che inibiscono direttamente la funzione macrofagica e linfocitaria.

Appare sempre più chiaro che la generazione di un microambiente tollerante nei confronti del tumore sia un prerequisito necessario per lo sviluppo della neoplasia.

Per immunotolleranza si intende una condizione di mancata responsività ad uno stimolo antigenico al quale l'organismo era stato precedentemente esposto e rappresenta una caratteristica imprescindibile di un sistema immunitario normale. Come è noto, infatti, il mancato instaurarsi della tolleranza nei confronti di antigeni *self* comporta lo sviluppo delle patologie autoimmuni.

L'immunotolleranza si compone di una componente centrale e di una periferica. La tolleranza centrale viene indotta a livello degli organi linfoidi primari (il timo per i linfociti T e il midollo osseo per la popolazione B) in seguito al riconoscimento degli antigeni *self* da parte di linfociti immaturi e garantisce che il repertorio dei linfociti maturi non contenga elementi in grado di reagire nei confronti di antigeni autologhi. La tolleranza periferica si genera grazie al riconoscimento degli antigeni in assenza di una adeguata costimolazione o tramite la ripetuta stimolazione ad opera di antigeni autologhi

ed è il meccanismo fondamentale per il mantenimento della non responsività al *self*.

Alla base dei meccanismi di tolleranza periferica dei linfociti T figurano:

- **Anergia:** essa è indotta dall'assenza di costimolazione e provoca l'assenza di attivazione dei linfociti T;
- **Delezione:** morte cellulare dei linfociti T CD4⁺ indotta dalla ripetuta stimolazione da parte di antigeni persistenti³⁴ ;
- **Soppressione:** linfociti T soppressori inibiscono l'espansione clonale e la funzione dei linfociti T effettori mediante la produzione di citochine, quali TGFβ, IL-10, IL-4, IL-13^{35; 36}. Tale meccanismo sembra essere in relazione anche con l'induzione della tolleranza nei confronti di antigeni non-*self*, quali quelli tumorali, ed è stato dimostrato che è appannaggio di una particolare sottoclasse di linfociti T, a fenotipo CD4⁺CD25⁺, ad attività regolatoria (T_{reg})³⁷.

La soppressione dei linfociti T effettori nel sito della crescita tumorale e a livello dei linfonodi di drenaggio della neoplasia, ma non necessariamente a livello sistemico, sembra essere coinvolto nei meccanismi di *tumor-escape*.

L'iperespressione dell'enzima Indoleamina 2,3-Diossigenasi (IDO) da parte delle cellule tumorali o da parte delle cellule presentanti l'antigene (APCs) è stato studiato quale possibile mediatore di tale tolleranza, anche in ambito neoplastico.

1.3 INDOLEAMINA 2,3-DIOSSIGENASI (IDO)

1.3.1 IL RUOLO DEL TRIPTOFANO

Il triptofano rappresenta l'aminoacido essenziale meno abbondante in natura. Nel corpo umano esso può andare incontro a tre diversi destini:

- Partecipare alla sintesi proteica;
- Essere implicato nella sintesi di serotonina;
- Essere catabolizzato attraverso la via delle chinurenine³⁸.

Nell'organismo umano la principale via catabolica del triptofano è quella delle chinurenine, che porta da ultimo alla formazione di Nucleotinamide Adenina Dinucleotide (NAD).

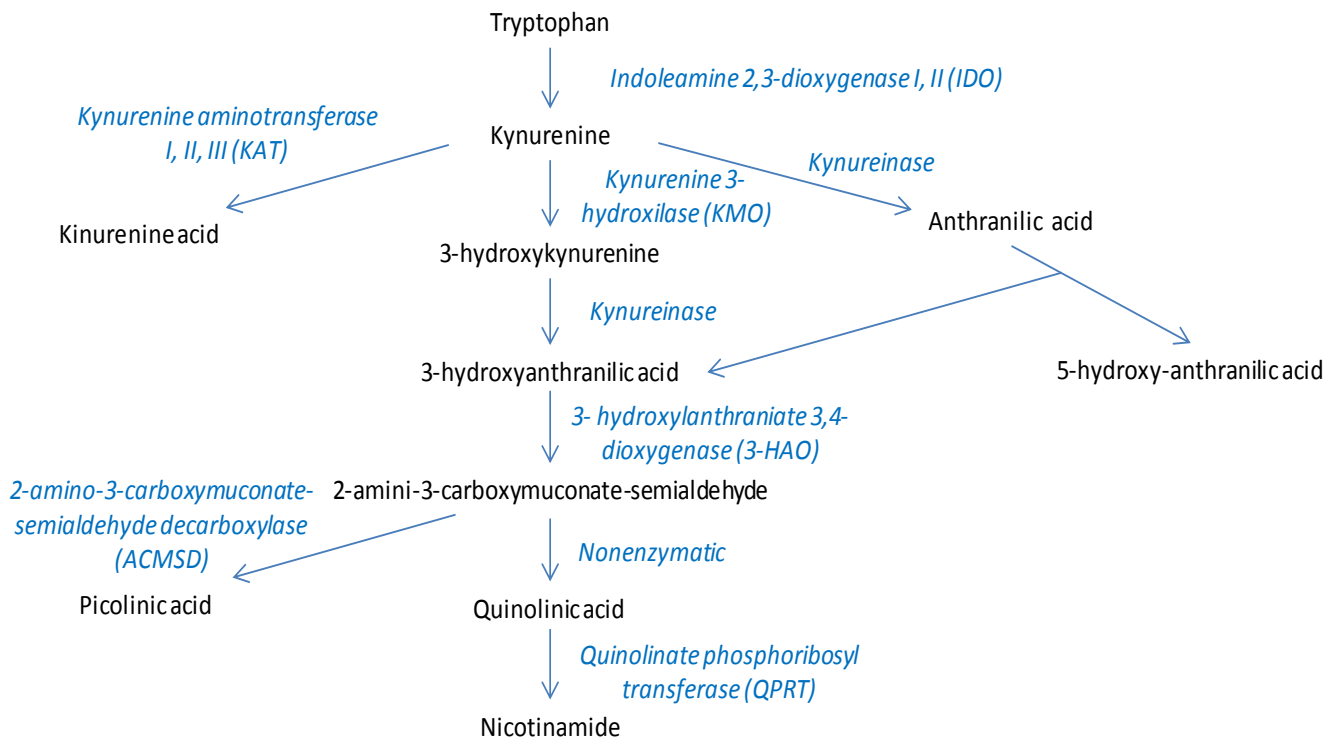


Figura 8. Pathway di degradazione del triptofano attraverso la via delle chinurenine.

Indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO) è l' enzima che catalizza la reazione iniziale, considerata il *rate-limiting step*, nella degradazione del triptofano attraverso la via delle chinurenine, che consiste nell'ossidazione del L-triptofano a N-formil-chinurenina.

IDO è un enzima ubiquitario, a differenza dell'isoforma epatica *Triptofano 2,3-diossigenasi* (TDO).

Il gene codificante IDO, *INDO*, è posto sul cromosoma 8p12.

E' stato dimostrato come la concentrazione di triptofano nel microambiente tissutale abbia ripercussioni sull'attività del sistema immunitario e, in particolare, sulla proliferazione cellulare. La deplezione di triptofano è infatti in grado di *down*-regolare la proliferazione cellulare; oltre a ciò, la presenza di metaboliti del triptofano, quali l'acido chinolinico, può modulare diversi processi, come ad esempio agire da agonista per il recettore del glutammato attivato dall'N-metil-D-aspartato (NMDA). Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'induzione dell'espressione di IDO mediata da IFN- γ e la conseguente deplezione di triptofano determina l'inibizione della crescita di *Toxoplasma gondii*³⁹ nonché la mancata proliferazione di molte cellule tumorali.

Sono stati proposti due diversi modelli volti alla comprensione dei meccanismi mediante cui le variazioni nella concentrazione di triptofano nel microambiente tissutale svolgono la loro azione immunomodulatoria. La prima, nota come "*tryptophan-depletion theory*", deriva dall'osservazione *in vitro* che la deplezione in triptofano nel microambiente tissutale o nei terreni di coltura mediata dall'azione di IDO porta ad un aumento nell'apoptosi dei linfociti T e ad una diminuita proliferazione sia di agenti microbici, sia di cellule del sistema immunitario^{40; 41}.

La seconda teoria, nota come "*tryptophan utilization theory*", pone invece l'attenzione sulla produzione di cataboliti del triptofano, quali le chinurenine, il

3-idrossi-antranilato e il quinolinato, che medierebbero l'apoptosi dei linfociti T^{42; 43}.

1.3.2 INDOLEAMINA 2,3-DIOSSIGENASI (IDO)

IDO è stato originariamente identificato in cellule provenienti dall'intestino di coniglio ed è una diossigenasi contenente un gruppo eme.

La proteina IDO è un monomero contenente il gruppo eme come gruppo prostetico ed è codificata da un gene costituito da 10 esoni di 15 kbp di DNA localizzato, sia nell'uomo, sia nel topo, sul cromosoma 8⁴⁴.

Il cDNA umano di IDO codifica una proteina di 403 aminoacidi, con un peso molecolare di 45 kDa. La struttura terziaria di IDO umano è costituita da due domini distinti ripiegati ad alfa elica con il gruppo prostetico eme posizionato tra loro⁴⁵.

IDO viene sintetizzato in uno stato inattivo, con il gruppo eme presente come ione ferrico; per l'attivazione si rende necessaria la perdita di un elettrone, con conseguente passaggio da ione ferrico a ione ferroso e legame del L-triptofano e dell'O₂ al sito attivo dell'enzima⁴⁶.

Una volta attivato, l'oloenzima IDO catalizza il clivaggio ossidativo dell'anello pirrolico del L-triptofano e genera la N-formil-L-chinurenina, che viene metabolizzata ad acido formico e al prodotto finale chinurenina.

IDO è caratterizzato da un'elevata affinità per il L-triptofano e per tale motivo è in grado di catabolizzare rapidamente il triptofano, deprivando l'ambiente circostante di questo aminoacido essenziale.

Il gene IDO può, in alcuni casi, risultare espresso anche in assenza di un'attività funzionale della proteina: cellule dendritiche murine CD8 α ⁺ catabolizzano il triptofano quando esposte all'IFN- γ , mentre le cellule CD8⁻ non

mostrano tale proprietà, nonostante le analisi mediante *Western-blotting* mostrino la presenza di uguali quantità di proteina nelle due popolazioni⁴⁴.

Analogamente alle DCs murine, anche quelle umane possono esprimere costitutivamente la proteina IDO senza mostrare alcuna attività enzimatica.

Alla luce dei potenziali effetti fatali di IDO sulla sopravvivenza cellulare appare chiaro come la sua espressione necessiti di una attenta regolazione, che si esplica anche con meccanismi post-traduzionali⁴⁷: l'ossido nitrico, ad esempio, inattiva direttamente il sito catalitico dell'eme, promuovendo così la degradazione della proteina IDO mediata dal proteasoma⁴⁸.

Mentre negli anni '70 si pensava che la reazione iniziale del catabolismo del triptofano fosse catalizzata unicamente da IDO o da TDO, nel 2007 è stato identificato un gene omologo al gene IDO codificante un enzima anch'esso in grado di catabolizzare il triptofano. Tale proteina, identificata contemporaneamente da tre gruppi e molecularmente simile a IDO, è stata denominata proteina simile a indoleamina 2,3-diossigenasi (INDOL1), indoleamina 2,3-diossigenasi 2 (IDO2) o proto-indoleamina 2,3-diossigenasi (protoIDO)^{49; 50; 51}.

Le proteine IDO1 e IDO2 sono molto simili a livello aminoacidico, ma sono dissimili rispetto a TDO. I geni codificanti IDO1 e IDO2 sono adiacenti, entrambi posti sul cromosoma 8 sia nell'uomo sia nel topo, e verosimilmente il gene per IDO2 deriva dalla duplicazione di quello codificante per IDO1⁵².

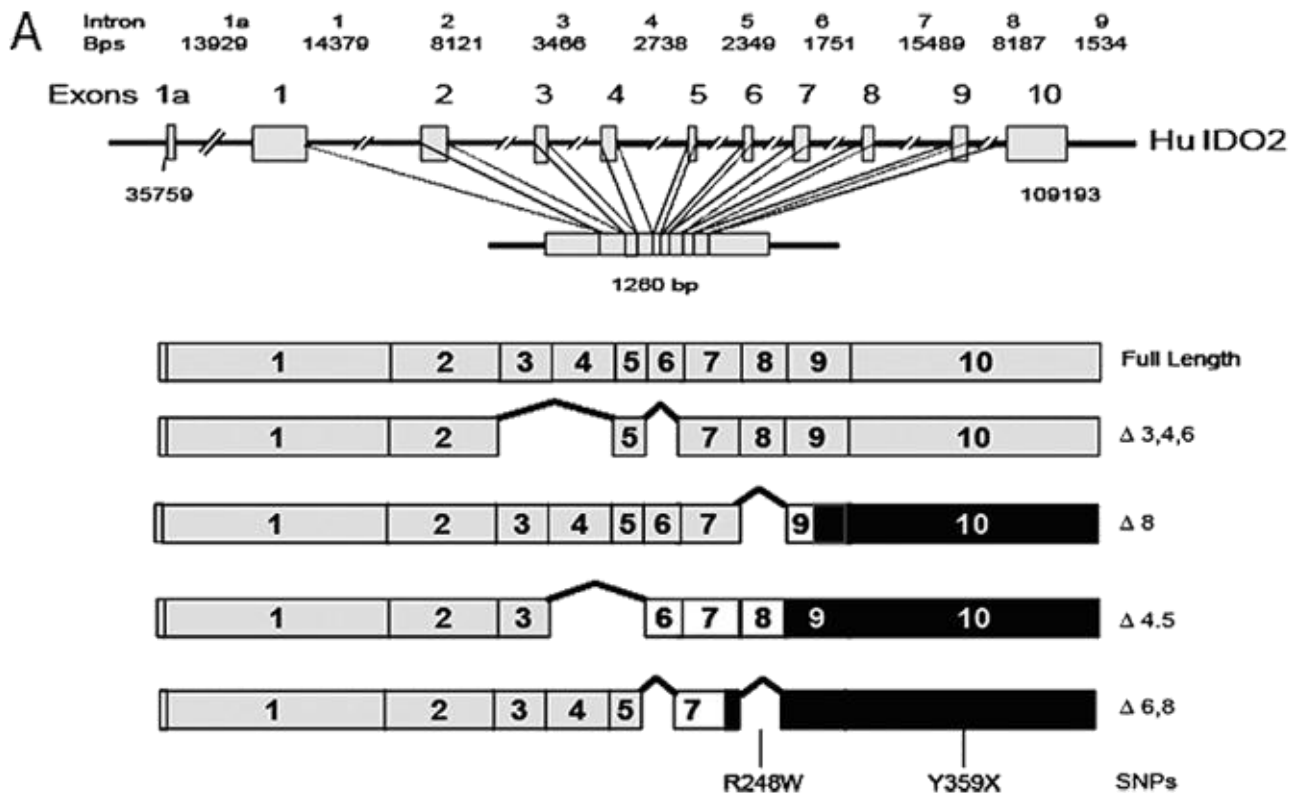


Figura 9. Gene IDO.

1.3.3 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI IDO

La regolazione dell'espressione di IDO dipende da numerosi fattori; in particolare, la sua trascrizione viene indotta a seguito di diversi stimoli di tipo infiammatorio. L'Interferon- γ (IFN- γ) è un importante mediatore negli stati infiammatori e vari studi hanno dimostrato come esso sia il principale induttore della trascrizione di IDO sia *in vitro*, sia *in vivo*, insieme a induttori dell'IFN- γ stesso, quali il Lipopolisaccaride e gli agenti virali.

L'interazione tra IFN- γ e IDO è correlata alla presenza sulla regione promotrice di IDO delle sequenze ISRE e GAS che, rispettivamente, riconoscono IRF-1 e attivano STAT-1 α ed è spiegabile ipotizzando che sia IDO, sia IFN- γ appartengano ad un meccanismo di regolazione atto ad arginare la funzione T-linfocitaria in corso di infiammazione.

Oltre a IFN- γ , altre molecole si sono dimostrate in grado di indurre IDO, tra queste figurano IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , PGE₂, CD40.

Per quanto concerne, invece, l'antagonizzazione di IDO, è emerso che l'ossido di azoto (NO) ed il perossinitrito, entrambi prodotti in corso di infiammazione, sono in grado, il primo, di inibire direttamente IDO e di antagonizzarne l'induzione, il secondo di bloccare la proliferazione e l'attivazione delle cellule T.

1.3.4 ESPRESSIONE DI IDO A LIVELLO CELLULARE

IDO è espresso nel citoplasma di numerosi tipi cellulari (cellule della placenta, del polmone, dell'intestino, della milza, del fegato, del rene, dello stomaco e del cervello) in maniera costitutiva o inducibile. Inoltre, la sua espressione può essere indotta con meccanismo mediato dall'INF- γ nelle cellule di linea mieloide (cellule dendritiche, monociti, macrofagi ed eosinofili), nelle cellule epiteliali, nei fibroblasti, nelle cellule endoteliali e in alcune cellule tumorali^{53; 54; 55}.

Per ciò che concerne le cellule del sistema immunitario, quali i monociti e i macrofagi di derivazione monocitaria, l'espressione della proteina IDO nei primi risulta essere molto bassa, mentre nei secondi esso appare iperespresso dopo l'esposizione all'IFN- γ .

Inoltre, cellule dendritiche ottenute *in vitro* da monociti esprimono costitutivamente la proteina, seppure funzionalmente inattiva, e necessitano dell'esposizione all'IFN- γ per esprimere la forma funzionalmente attiva dell'enzima⁵⁶.

Studi *in vitro* hanno dimostrato che sia nei macrofagi, sia nelle DCs, l'espressione di IDO è comunque limitata ad una specifica sottopopolazione di cellule non aderenti che co-esprime CD123 (catena α del recettore per IL-3) ed

il recettore chemochinico CCR6. Non tutte le cellule CD123⁺CCR6⁺ esprimono comunque IDO e non è ancora stato identificato un *marker* specifico che consenta di isolare *in vitro* sottopopolazioni di DC IDO⁺ ⁵⁷.

Per quanto riguarda gli studi condotti *in vivo*, è stato dimostrato che solo una piccola frazione di DCs esprime IDO. Nel topo solo le cellule dendritiche CD8α⁺ esprimono la proteina a seguito dell'esposizione ad IFN-γ e studi di immunohistochemica hanno evidenziato come anche il trattamento con CTLA4-Ig aumenti l'espressione di IDO unicamente in alcune sottopopolazioni di DCs murine localizzate nella milza. Tali cellule, definite DC plasmacitoidi (pDCs), esprimono i *marker* tipici della via differenziativa B cellulare CD8α e CD19⁵⁸.

Alla luce di ciò è stata postulata un'origine B linfoide per questa sottopopolazione cellulare, dal momento che cellule pro-B CD19⁺ possono generare DCs *in vitro* ⁵⁹.

Sono state oggetto di studio anche le cellule staminali emopoietiche CD34⁺ derivate dal sangue midollare di volontari sani: esse non hanno mostrato l'espressione costitutiva dell'mRNA di IDO, ma, se esposte all'azione di IFN-γ, si sono dimostrate in grado di esprimerlo. Al contrario, non è stata dimostrata la produzione della proteina ⁶⁰.

Tale osservazione ha confermato l'esistenza di un meccanismo regolatorio post-trascrizionale per l'espressione della proteina in cellule staminali emopoietiche, meccanismo successivamente dimostrato anche in altri *subset* cellulari, in particolare a carico delle cellule mesenchimali midollari (MSCs), note per la loro bassa immunogenicità e per la loro capacità di inibire la risposta T-cellulare allogenica. In tali cellule, che non esprimono la proteina in assenza di IFN-γ, l'espressione di IDO risulta inoltre direttamente correlata alla quantità di citochina utilizzata nei saggi *in vitro* ⁶¹. E' probabile che la deplezione di triptofano mediata dall'attività dell'enzima IDO determini l'inibizione T

cellulare esercitata dalle MSCs con un meccanismo simile a quello postulato per spiegare l'azione immunoregolatoria dell'enzima in altri ambiti.

Nonostante la scoperta di IDO2 sia molto recente, alcuni studi hanno già permesso di osservare che nel topo la proteina IDO2 è espressa in modo preminente a livello renale, dell'epididimo, dei testicoli, del fegato⁵², delle ovaie e dell'utero (Weiser, *unpublished*).

IDO e IDO2, oltre ad essere espressi in tipi cellulari diversi, vengono indotti da differenti stimoli.

La varietà di trascritti possibili di IDO e IDO2 indica chiaramente che la quantificazione dell'mRNA non è la metodica di scelta per la valutazione della presenza funzionale di IDO e IDO2: a tale scopo, infatti, si rende necessaria la valutazione della presenza della proteina e la misurazione della sua effettiva attività funzionale.

1.3.5 IDO E TUMORI

Le cellule neoplastiche, nel corso dello sviluppo del tumore, sono in grado di acquisire numerose caratteristiche peculiari, suddivisibili in proprietà intrinseche, quali la capacità di *self-renewing*, ossia di proliferare autonomamente, anche in assenza di segnali proliferativi e la resistenza all'apoptosi; e caratteristiche estrinseche, dipendenti cioè dall'interazione con le cellule dell'ospite, *in primis* la capacità di interagire con il sistema immunitario dell'ospite.

Come già detto in precedenza, il sistema immunitario svolge un duplice ruolo nell'interazione con le cellule neoplastiche, da una parte eliminando le cellule tumorali, dall'altra favorendone l'*escape* operando una pressione selettiva³¹.

E' stato altresì dimostrato che IDO è ampiamente coinvolto in tale processo sia nel sito di sviluppo del tumore, sia a livello dei linfonodi drenanti il tumore. Questo rende IDO un potenziale candidato per la terapia antineoplastica: l'utilizzo dell'inibitore di IDO 1-metiltryptofano (1-MT) risulta nella diminuita proliferazione tumorale dipendente dall'attività T-linfocitaria⁶².

In campo oncologico l'espressione costitutiva di IDO da parte delle cellule neoplastiche si è resa evidente in 25 diversi tipi di tumore⁶³, quali carcinoma prostatico, coloretale, pancreatico, endometriale, ovarico e in molti altri istotipi^{64; 65; 66}. IDO è inoltre espresso dalle cellule dendritiche a livello dei linfonodi di drenaggio⁶⁷.

Numerosi studi hanno chiarito che l'espressione di IDO nei tumori rappresenta una caratteristica di rischio, determinante una prognosi sfavorevole. In particolare, per quanto concerne il carcinoma coloretale, è stato dimostrato che l'espressione di IDO correla con una diminuita infiltrazione linfocitaria a livello del sito tumorale⁶⁶.

L'espressione di IDO da parte dei tumori è stata messa in relazione anche con la progressione neoplastica, in particolare con la produzione di lesioni metastatiche, soprattutto per quanto concerne le metastasi epatiche da carcinoma coloretale, anche se il meccanismo alla base di tale relazione non è ancora stato chiarito⁶⁶.

1.3.6 IDO E NEOPLASIE EMATOLOGICHE

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (HSCT) ha chiarito il fondamentale ruolo operato da parte del sistema immunitario nei confronti del processo leucemogeno nell'ambito delle neoplasie ematologiche.

Anche in questo contesto appare assodato che il sistema immunitario è in grado di riconoscere e distruggere selettivamente le cellule leucemiche, ma che,

al tempo stesso, le cellule blastiche possono acquisire la capacità di eludere le risposte tumore-specifiche; in particolare, le cellule di Leucemia Acuta Mieloide prevengono l'attivazione T-linfocitaria sia attraverso la produzione di fattori solubili, sia mediante interazioni cellula-cellula⁶⁸.

E' stato dimostrato che la proteina IDO attiva risulta essere espressa nelle cellule di LAM, ma non nelle cellule staminali normali CD34⁺, suggerendo che essa possa svolgere un ruolo nel meccanismo di leucemogenesi, almeno in un sottogruppo di pazienti⁶⁹.

Curti *et al.* hanno analizzato campioni provenienti da 54 pazienti affetti da LAM e, utilizzando una metodica di RT-PCR quantitativa, hanno dimostrato che il 26% di essi esprimeva un livello di mRNA francamente elevato, comparabile con quello rilevabile nelle cellule di placenta, utilizzate come controllo positivo. Oltre a ciò, diversi gruppi hanno dimostrato che l'espressione di elevati livelli di mRNA è direttamente correlata con la presenza di una proteina enzimaticamente attiva e inducibile dall'IFN- γ .

Un altro importante aspetto è rappresentato dalla dimostrazione del ruolo svolto, anche in ambito ematologico, dai linfociti T_{reg} a fenotipo CD4⁺CD25⁺.

Essi sono presenti in numero significativo in molte neoplasie ematologiche, quali LAM, Linfomi di Hodgkin (LH) e non Hodgkin (LNH), Mieloma Multiplo (MM), Leucemia Linfatica Cronica (LLC) e Sindromi Mielodisplastiche a rischio elevato (MDS). La relazione esistente tra le cellule derivanti da queste neoplasie e la proteina IDO è stata studiata in un campione di pazienti affetti da LAM ed è stato dimostrato che, *in vitro*, la presenza di elevati livelli di T_{reg} è associata all'iperespressione di IDO da parte delle cellule leucemiche e che tale popolazione di T_{reg} CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ deriva da linfociti T naïve CD4⁻CD25⁺Foxp3⁻⁶⁹.

Risultati analoghi sono stati ottenuti da El Kholy et al. analizzando per l'espressione di IDO, mediante tecnica di RT-PCR, un campione di 50 soggetti, 25 dei quali affetti da LAM e 25 controlli sani. Nessuno dei controlli sani è risultato esprimere IDO ad un livello significativo, mentre il 52% dei pazienti con LAM esprimeva l'mRNA di IDO e, di questi, tutti mostravano un'attività enzimatica, misurata mediante la determinazione della concentrazione di L-chinurenina in lisati di cellule mononucleate. In questo studio, i livelli di espressione della proteina IDO correlavano positivamente con l'età dei pazienti e negativamente con i livelli di emoglobina, confermando il ruolo prognostico negativo già proposto per IDO⁷⁰.

Alla luce di queste osservazioni, Chamuleau et al. hanno analizzato 286 pazienti adulti affetti da Leucemia Mieloide Acuta per l'espressione di IDO e ne hanno verificato l'eventuale associazione con i consueti fattori di rischio alla diagnosi. La metodica utilizzata in tale studio è stata l'analisi mediante *gene-expression profiling*.

L'espressione di IDO non si è dimostrata significativamente correlata a nessuno dei fattori prognostici comunemente considerati, quali sottotipo FAB e caratteristiche citogenetiche, ma dalle analisi sulla sopravvivenza è emerso che tutti i pazienti con prolungato *overall survival* avevano una bassa espressione di IDO. L'analisi multivariata ha inoltre mostrato che l'elevata espressione di IDO rappresenta un fattore prognosticamente sfavorevole, più significativo rispetto all'iperleucocitosi, all'età o alla presenza della mutazione di FLT3-ITD⁷¹.

1.3.7 FUNZIONE DI IDO

Come detto in precedenza, la proteina IDO funzionalmente attiva partecipa alla degradazione del triptofano lungo la via delle chinurenine, da un lato

deprivando di questo essenziale aminoacido il microambiente tissutale, dall'altro determinando l'accumulo dei suoi metaboliti.

I primi studi condotti su IDO sembravano indicare questo enzima come appartenente ai meccanismi della risposta immunitaria innata⁷², ma è stato poi dimostrato come la sua azione sia modulata anche e soprattutto dagli elementi propri dell'immunità acquisita. Tra le molecole in grado di indurre l'espressione e l'attività di IDO figurano il TNF- α , l'IFN- α , l'IFN- β e l'IFN- γ

La deplezione di triptofano mediata dall'azione di IDO, a sua volta attivato dalla presenza di IFN- γ , consente di bloccare *in vitro* e *in vivo* la replicazione di numerosi agenti patogeni di natura microbica, quali *chlamydia pneumoniae*, *toxoplasma gondii*, micobatteri, streptococchi di gruppo B, *citomegalovirus* e i virus dell'*herpes simplex*, mentre l'aggiunta di triptofano permette la ripresa della replicazione di tali agenti⁷³.

E' stato dunque ampiamente dimostrato che IDO riveste un ruolo primario nel controllo della risposta immunitaria, evitando il crearsi di risposte immunitarie eccessive nel corso della crescita tumorale, ma anche in corso di infezioni, autoimmunità, aborto immuno-mediato e rigetto di trapianti.

1.3.7.1 IDO E IMMUNOTOLLERANZA

IDO fu originariamente descritto come fattore contribuente al mantenimento della tolleranza materno-fetale⁶⁹ e la placenta è uno dei primi tessuti in cui è stata osservata l'espressione di IDO.

Nel 1998 Munn ha dimostrato che la placenta murina è protetta dal rigetto grazie ad un meccanismo dipendente dall'espressione di IDO ed ha evidenziato che tale enzima garantisce il mantenimento della tolleranza verso gli alloantigeni fetali nel corso della gravidanza⁷⁴.

Numerosi studi di immunoistochimica hanno poi suggerito che IDO possa essere coinvolto nei meccanismi che regolano le risposte immunitarie materne anche nella placenta umana, con un meccanismo simile a quello descritto nel topo⁷⁵.

Per quanto concerne le patologie autoimmuni, studi eseguiti su modelli animali hanno stabilito che la deplezione di triptofano mediata da IDO determina il passaggio da una risposta Th1-mediata ad una risposta di tipo Th-2, evitando che si instaurino risposte eccessive e, dunque, dannose per l'animale.

In tale ambito, quindi, l'utilizzo di inibitori di IDO potrebbe risultare in una eccessiva attivazione T-linfocitaria e determinare, di conseguenza, un *outcome* peggiore.

Un ulteriore campo di interesse è rappresentato dai trapianti: il ruolo di IDO si è dimostrato importante nell'induzione della tolleranza nei confronti del *graft* sia *in vitro*, sia *in vivo*. Si è osservato che tale effetto si deve alla *up-regolazione* di IDO da parte delle DCs e delle cellule endoteliali, con induzione di tolleranza periferica mediata dall'aumento di T_{reg}⁷⁶.

In campo ematologico, il trapianto di cellule staminali allogeniche (HSCT) è spesso complicato dalla comparsa di *Graft-versus-host Disease* (GVHD), la maggior causa di mortalità e morbidità.

Anche in questo ambito l'analisi dell'espressione di IDO in modelli murini ha permesso di evidenziare che la sua assenza risulta in un aumentato sviluppo di GVHD, soprattutto intestinale⁶⁹.

1.3.7.2 MECCANISMI DI SOPPRESSIONE DELLA RISPOSTA T CELLULARE MEDIATI DA IDO

Nonostante sia ormai chiarito il ruolo svolto da IDO nel creare un ambiente di immunotolleranza anche in ambito neoplastico, i meccanismi tramite cui questa sua funzione si esplica rimangono ancora scarsamente conosciuti.

Sono stati proposti almeno tre diversi meccanismi a valle di IDO che ne mediano tale effetto: azione diretta sui linfociti T, azione mediata dalle APC e il cosiddetto effetto *bystander*⁴⁴.

- Effetti diretti sui linfociti T

Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che la deplezione di triptofano mediata da IDO determina un arresto nella proliferazione delle cellule T e una più spiccata sensibilità ai meccanismi pro-apoptotici. D'altro canto, anche l'accumulo dei metaboliti del triptofano prodotti lungo la via di degradazione delle chinurenine sembra mediare l'effetto immunosoppressivo di IDO.

I risultati esposti sono però frutto di studi eseguiti *in vitro*, mentre sono ancora pochi i dati disponibili *in vivo*, dove, da una parte, il livello di deplezione di triptofano necessario per determinare l'inibizione T-cellulare sembra essere più basso rispetto a quello normalmente presente nel plasma; dall'altra, la concentrazione tossica di metaboliti del triptofano supera abbondantemente le concentrazioni di triptofano normalmente disponibili *in vivo*.

Ad ogni modo, quindi, per poter ipotizzare un ruolo rilevante di tali meccanismi anche *in vivo*, è necessario assumere che il microambiente tissutale che circonda le cellule presentanti l'antigene mostri concentrazioni di triptofano e dei suoi metaboliti significativamente diverse rispetto a quelle plasmatiche.

Tali modelli costituiscono ovviamente dei modelli di immunosoppressione locale, piuttosto che di una vera e propria forma di tolleranza sistemica, e non consentono di spiegare lo stato generalizzato di tolleranza che spesso si osserva nei confronti degli antigeni tumorali. E' necessario supporre, quindi, che IDO sia in grado di agire anche a livello generale. A tale proposito è stato ipotizzato che i linfociti T possano percepire la presenza di livelli diminuiti di triptofano mediante due diversi *pathways*: il primo sarebbe mediato da mTOR (*mammalian target of rapamycin*), il cui segnale è fondamentale per l'inizio della traduzione ribosomiale: la carenza di aminoacidi essenziali determinerebbe l'inibizione del segnale attraverso il *pathway* di mTOR. Il secondo meccanismo proposto dipenderebbe dalla chinasi GCN2: in questo caso, la deplezione di triptofano attiverebbe GCN2, con conseguente arresto della traduzione⁴⁴.

- Effetti indiretti mediati dalle APC IDO⁺

Secondo questa ipotesi IDO altererebbe la funzione della APC diminuendone la capacità di presentare l'antigene o *up-regolando* l'espressione di ligandi ad attività inibitoria, o ancora favorendo la secrezione di citochine regolatorie, quali TGF- β o IL-10⁴⁴.

L'effetto finale sarebbe dunque quello di determinare uno stato di immunotolleranza nei confronti degli antigeni presentati dalle APC esprimenti IDO.

- Effetto *bystander*

IDO è in grado di inibire la risposta T-linfocitaria in maniera dominante, ossia anche nel caso in cui l'antigene venga presentato da APC non esprimenti IDO.

In vivo ciò si riflette nella soppressione della risposta immunitaria a specifici antigeni da parte di una esigua popolazione di DCs IDO⁺, nonostante gli stessi antigeni siano contemporaneamente presentati anche da altre APCs IDO-negative. L'effetto soppressorio dominante (*bystander*) è soltanto locale e potrebbe essere imputabile sia agli effetti dell'attività dell'enzima sul microambiente (deplezione di triptofano, accumulo di metaboliti tossici, presenza di citochine regolatorie), sia ad un effetto diretto delle cellule esprimenti IDO, che potrebbero indurre, in APC IDO⁻, l'espressione di fattori immunomodulanti.

1.4 I LINFOCITI T REGOLATORI (T_{REG})

1.4.1 T_{REG}

Tra i primi studi condotti sui linfociti T regolatori (T_{reg}) figura quello di Gershon *et al.* del 1972⁷⁷, che distinse tali cellule dai linfociti T citotossici ed *helper* e ne identificò la funzione nell'inibire le risposte immunitarie.

Studi *in vivo* dimostrarono che, se linfociti T di animali resi tolleranti a quello stesso antigene venivano trasferiti in topi non esposti ad un dato antigene, i riceventi venivano resi anch'essi tolleranti.

Da studi condotti più recentemente sembra essere emerso che non esista una popolazione di linfociti T con funzione unicamente regolatoria, ma che in risposta a stimoli ambientali di diversa natura, altre popolazioni T-linfocitarie siano in grado di assumere tale funzione. I T_{reg} svolgono la loro funzione o mediante diretto contatto intracellulare o tramite la produzione di mediatori, quali TGF- β o IL-10⁷⁸.

Sembra molto probabile che la maggior parte della produzione di T_{reg} avvenga a livello del timo, ma esistono evidenze che parte della loro produzione

avvenga anche in periferia, in particolari condizioni: cellule T periferiche a fenotipo $CD4^+CD25^-$ possono essere convertite in $CD4^+CD25^+$ tramite un processo che richiede la presenza di GCN2 e che comporta la graduale diminuzione di IL-2 e il contemporaneo incremento di IL-10 e TGF- β ^{79; 80; 81}. Tali cellule non sono in grado di proliferare dopo stimolazione, ma possono sopprimere *in vitro* la proliferazione di cellule responsive.

I linfociti T regolatori sembrano svolgere un ruolo fondamentale anche nell'induzione della tolleranza nei confronti di processi tumorali. Nonostante non siano ancora stati pienamente chiariti i meccanismi alla base di tale osservazione, è dimostrato che l'assenza di T_{reg} determina una normale risposta anti-tumorale, mentre la loro presenza induce tolleranza⁸².

In modelli murini è stata identificata una popolazione di cellule $CD4^+$ esprimenti anche il CD25 (catena α del recettore dell'IL-2) e caratterizzati da spiccata attività soppressiva nei confronti della risposta T cellulare. Tali cellule esprimono costitutivamente il CTLA4, indispensabile regolatore negativo dell'azione T-cellulare *in vivo*.

Per quanto concerne gli studi effettuati sull'uomo, tale popolazione cellulare è stata identificata nel sangue periferico e riconosce un fenotipo di membrana $CD4^+CD25^+Foxp3^+$; esprime inoltre CTLA4, 45RO, HLA-DR e produce IL-10 e TGF- β . La loro attività soppressiva è mirata ai linfociti $CD4^+$ sia naïve, sia di memoria, attraverso un meccanismo indipendente dalle APC.

1.4.2 T_{REG} E IDO

La relazione esistente tra l'azione di IDO e l'azione immunomodulatoria mediata dai linfociti T_{reg} è chiarito da Fallarino F. *et al.*, che dimostra come i T_{reg} determinino l'espressione di elevati livelli di IDO su cellule dendritiche murine *in vitro* tramite il legame tra il CTLA4 presente sui T_{reg} e le molecole

CD80 e CD86 espresse sulle DCs. Tale interazione è presente anche tra i T_{reg} e le cellule dendritiche umane di derivazione monocitaria. Sembra dunque che CTLA4 svolga un ruolo fondamentale nell'induzione di IDO da parte dei T_{reg} e che IDO sia, a sua volta, il meccanismo effettore attraverso cui si esplica l'attività soppressiva dei T_{reg} .

Studi recenti hanno definitivamente dimostrato che l'espressione di IDO da parte di cellule dendritiche determina apoptosi e inibizione della proliferazione delle cellule T e promuove *in vitro* la differenziazione di T_{reg} a partire da cellule T $CD4^+$ naïve⁸³, avvalorando l'ipotesi che esista un meccanismo di *feedback* positivo, tramite cui i T_{reg} inducono l'espressione di IDO che, a sua volta, determina la produzione di nuovi T_{reg} .

1.5 LE CELLULE DENDRITICHE

Le cellule dendritiche (DCs) sono cellule presentanti l'antigene caratterizzate dalla capacità di indurre reazioni immuni primarie e sono in grado di trasferire informazioni dall'ambiente esterno alle cellule del sistema immunitario acquisito.

Oltre a ciò, è stato dimostrato che le DCs possono indurre tolleranza immunologica e partecipano alla regolazione delle risposte T-mediate.

I progenitori midollari di tali cellule danno origine a precursori circolanti immaturi, dotati di funzione fagocitaria. Tali precursori raggiungono i tessuti come cellule immature e possono incontrare direttamente gli agenti patogeni, dando origine alla secrezione di citochine, come l'IFN- α , e attivare così eosinofili, macrofagi e cellule *natural-killer* (NK).

In alternativa, le cellule dendritiche immature, dopo aver catturato gli antigeni, migrano negli organi linfoidi primari, dove si avvia un processo di

maturazione, che le rende in grado di attivare linfociti T antigene-specifici. Questi ultimi attivano di conseguenza cellule T citotossiche a fenotipo CD8⁺, linfociti B, macrofagi, eosinofili e cellule NK⁸¹.

Sia nel modello murino, sia nell'uomo, la popolazione di cellule dendritiche è caratterizzata da elevata eterogeneità, che permette di classificarle in base a: localizzazione anatomica (sangue, organi linfoidi, tessuti periferici), fenotipo (CD14⁺CD11c⁺; LIN-CD11c⁺), sorgente (derivate da monociti dopo stimolazione con GM-CSF e IL-4; o derivate da cellule CD34⁺), funzione (le DCs possono essere responsabili della proliferazione delle cellule B o della differenziazione dei linfociti T in cellule Th1 o Th2).

Tutte le DCs hanno fenotipo HLA-DR e Lin⁻; le diverse sottopopolazioni possono però essere identificate mediante il riconoscimento dei diversi *biomarkers* di superficie⁸⁴.

CELLULE DENDRITICHE	MARKERS DI SUPERFICIE
TUTTE DCs	HLA-DR; Lin-
CD1c+	CD1c; CD11c
pDCs	CD123; CD303; CD304
CD141+	CD141
CMRF44+	CMRF-44; CMRF-56
CD83+	CD-83
LC	CD1a; CD207

Tabella 1. Sottopopolazioni di DCs.

Come detto, le cellule dendritiche possono essere classificate anche a seconda del tessuto di appartenenza o della sorgente cellulare da cui derivano. Si distinguono, così:

- DCs monocitoidi: CD14⁺, CD16^{+/-};
- DCs del sangue: questo sottogruppo viene ulteriormente suddiviso in CD34⁺; CD141⁺; CD16⁺; DCs mieloidi (CD1c⁺CD11c⁺CD13⁺CD33⁺) e DCs plasmacitoidi (CD4⁺CD123⁺⁺CD303⁺CD304⁺).

Le cellule dendritiche immature, non essendo in grado di dare origine ad una efficace co-stimolazione, inducono una risposta tollerogenica e determinano anergia delle cellule T⁸⁵.

1.5.1 IDO E DCs

Numerosi studi hanno indicato come le cellule dendritiche siano in grado di dare origine, a seconda delle condizioni esistenti, sia ad attivazione immunitaria, sia a tolleranza.

Sia l'immunità innata, sia l'immunità specifica possono interagire con le DCs promuovendo l'induzione di un ambiente tollerante o, in alternativa, favorendo la risposta immunitaria mediante la liberazione di differenti classi di citochine.

Le cellule dendritiche immature e le plasmacitoidi determinano la creazione di un ambiente immunotollerante favorendo la differenziazione di linfociti T naïve in linfociti T_{reg} e la loro azione può essere modulata attraverso vari mediatori, tra cui figura IDO.

E' stato dimostrato che IDO viene espresso solamente da alcune sottoclassi di DCs *in vivo*; molti studi sono stati condotti con l'obiettivo di individuare quali siano i segnali in grado di indurre l'espressione di IDO nelle DCs, ma al momento non esistono dati certi a tale proposito.

Nell'uomo non sono state individuate con certezza cellule dendritiche esprimenti IDO in maniera costitutiva e non è stato ancora chiarito se le DCs esprimenti tale enzima siano in grado di interagire con i linfociti T, determinandone l'inibizione.

Gli studi condotti finora hanno portato ad ipotizzare l'esistenza di tre differenti popolazioni di cellule dendritiche umane, in relazione alla loro espressione di IDO:

- DCs IDO⁺, ma incapaci di metabolizzare il triptofano;
- DCs IDO⁺, in grado di metabolizzare il triptofano, ma non capaci di indurre l'anergia delle cellule T⁸⁶;

- DCs IDO⁺ metabolizzanti il triptofano e inibenti la risposta T-cellulare⁸⁷.

Da quanto detto appare chiaro che il ruolo svolto dalle cellule dendritiche nella patologia umana risulta ancora scarsamente conosciuto e che sono dunque necessari ulteriori studi sia *in vitro*, sia *in vivo*, che ne indaghino le proprietà funzionali ed il rapporto che intercorre tra esse e l'espressione dell'enzima IDO.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa Tesi è quello di stabilire l'esistenza di una correlazione tra il livello di espressione del gene IDO (e la conseguente presenza di una proteina funzionalmente attiva) e la ricorrenza delle caratteristiche di rischio all'esordio classicamente considerate nella Leucemia Acuta Mieloide dell'adulto.

Ulteriore obiettivo di questo lavoro è la valutazione di un eventuale rapporto tra l'espressione di IDO e l'*outcome* dei pazienti analizzati, inteso come *rate* di Risposte Complete alla chemioterapia di induzione.

A tale scopo è stato al momento analizzato un campione di 45 pazienti affetti da LAM afferiti all'Istituto di Ematologia "L. e A. Seràgnoli" di Bologna ed è tuttora in corso un ulteriore ampliamento della casistica per confermare i risultati attualmente ottenuti.

L'individuazione, all'interno della popolazione di pazienti affetti da Leucemia Mieloide Acuta, di sottogruppi per cui possano essere evidenziate già all'esordio caratteristiche prognostiche favorevoli o sfavorevoli sta assumendo sempre maggior significato. E' noto, infatti, che nonostante l'elevato *rate* di risposte complete che vengono normalmente ottenute a seguito della polichemioterapia di induzione, molto meno numerosi sono i pazienti che mantengono a lungo tale remissione ed ancora più esiguo è il numero dei lungo-sopravvivenuti.

Da un lato, la ricerca di *markers* prognostici può guidare nella scelta terapeutica, facendo propendere per regimi terapeutici più o meno intensificati a seconda della presunta prognosi della patologia di base. D'altro canto, la possibilità di individuare *markers* molecolari che possano fungere da *target* per strategie terapeutiche mirate riveste un significato molto importante nel trattamento di tale patologia e rappresenta, dunque, un campo di interesse costantemente indagato.

3. PAZIENTI E METODI

Ad oggi è stato analizzato un totale di 45 pazienti adulti affetti da Leucemia Acuta Mieloide afferiti alla U.O. di Ematologia “L. e A. Seràgnoli” di Bologna. I pazienti sono stati stratificati a seconda delle consuete caratteristiche di rischio presenti alla diagnosi:

- Età: i pazienti con età superiore o uguale ai 60 anni sono stati considerati ad alto rischio;
- Iperleucocitosi: un numero totale di leucociti superiore ai 30.000/mmc determina un alto rischio;
- Secondarietà: i pazienti per i quali è nota una precedente esposizione a radio-chemioterapia o nei quali si possa accertare una pre-esistente sindrome mielodisplastica vengono considerati ad alto rischio;
- Citogenetica: i pazienti per cui è disponibile una analisi del cariotipo all'esordio sono stati suddivisi in tre categorie di rischio (*low*, *intermediate* e *high risk*);
- Analisi molecolari: è stata valutata la presenza di specifici geni di fusione (PML-RAR α , CBF β -MYH11, ecc.), ma anche la presenza di mutazioni puntiformi a carico dei geni FLT3 ed NPM. In particolare, pazienti NPM-mutati, ma FLT3 *wild-type* sono stati considerati a basso rischio, mentre pazienti FLT3-mutati (ITD e TKD), indipendentemente dallo *status* mutazionale di NPM, sono stati valutati ad elevato rischio. Sono stati infine considerati a rischio standard i pazienti che non mostravano mutazione né a carico di FLT3, né a carico di NPM.

Globalmente, un paziente è stato assegnato alla categoria ad elevato rischio nel caso fosse presente anche un solo fattore di rischio alla diagnosi.

Infine, è stata valutata, nei pazienti trattati con almeno un ciclo di chemioterapia antitumorale, la risposta all'induzione, essendo i pazienti *Primary-Refractory* ad elevato rischio di ricaduta, qualunque fosse il rischio alla diagnosi. I pazienti appartenenti alle quattro categorie sono risultati comparabili sulla base della chemioterapia di induzione ricevuta.

Su tale campione è stato quindi valutato il livello di espressione del gene IDO mediante *Real-Time* PCR quantitativa e, successivamente, è stato eseguito uno studio mediante *Western Blotting* per valutare l'effettiva presenza della proteina IDO attiva.

- *REAL-TIME PCR*

L'RNA totale è stato estratto da Cellule Dendritiche mature e immature generate *ex-vivo* e da DCs circolanti.

E' stata quindi realizzata una analisi mediante *Real-Time* PCR quantitativa (qRT-PCR) utilizzando il *software* SDS.3 su un ABI PRISM 7900 Sequence Detector (Perkin Elmer).

I risultati provenienti dalla qRT-PCR sono stati successivamente analizzati utilizzando il metodo statistico del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Il livello relativo dell'mRNA di IDO è stato poi calcolato sottraendo il valore del Ct (*cycle threshold*) del gene di controllo, ossia GAPDH, dal valore di Ct del gene IDO.

E' stato infine utilizzato come riferimento l'RNA Umano Universale della *Stratagene* (Agilent Technologies), a cui è stato assegnato il valore di 1. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in doppio.

Al fine di valutare il livello dell'attività di IDO sono stati misurati i valori di chinurenina. DCs mature generate *ex vivo* sono state raccolte, lavate e risospese in una soluzione salina supplementata con 500 μ M di L-triptofano (Sigma

Aldrich) e quindi incubate per 4 ore. E' stato poi raccolto il sovranatante ed è stato analizzato il livello di chinurenina mediante *assay* spettrofotometrico. I sovrinatanti sono stati addizionati con acido tricloroacetico al 30% (Sigma Aldrich; 2:1) e centrifugati a 8000 giri per 5 minuti.

Al termine di tale procedura, 75 µL di questa soluzione sono stati addizionati ad un volume corrispondente di reagente di Ehrlich (AppliChem-VWR International, Milan, Italy). Tre campioni uguali sono stati fatti correre contro una curva standard di chinurenina a concentrazione 6.25-1000 µM (Sigma Aldrich).

La densità ottica è stata dunque misurata utilizzando un *Multiscan EX* (M-Medical, Milan, Italy) a 490 nm.

- *WESTERN BLOTTING*

Le cellule sono state lisate in ghiaccio, in tampone di lisi (Hepes 63.5 mM, MgCl₂ 24 mM, NaCl 396 mM, glicerofosfato, triton, 1ug/ml aprotinina, 1ug/ml leupeptina, 1ug/ml pepstatina A) ed il lisato totale è stato separato mediante SDS PAGE al 10%.

Dopo la corsa, è stato eseguito il *blotting* su membrana di nitrocellulosa per un totale di 90 minuti a temperatura ambiente ad amperaggio costante di 250 mA in tampone di trasferimento contenente metanolo.

Il corretto trasferimento è stato dimostrato tramite la colorazione della membrana con *Rosso Ponceau*.

La membrana è stata poi incubata per 1 ora in *blocking buffer* (PBS/TWEEN 0.2% con 2% di latte e 3% BSA) allo scopo di saturare i siti aspecifici. Per verificare la reale presenza della proteina IDO, la membrana è stata lasciata *over night* a 4°C in incubazione con l'anticorpo primario di coniglio specifico

per IDO1 (gentile concessione di Richard Metz, direttore esecutivo della ricerca alla NewLink Genetics, Philadelphia) diluito 1:2000 in *blocking buffer*.

Al termine di tale operazione, è stata eseguita l'incubazione della membrana a temperatura ambiente per 1 ora con l'anticorpo secondario specifico per il primario (anti-coniglio) e marcato con l'enzima perossidasi (diluito 1:10000 in *blocking buffer*).

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

4. RISULTATI

I 45 pazienti analizzati mediante RT-PCR e, successivamente, mediante esecuzione del Western-Blot sono stati suddivisi in quattro differenti categorie, a seconda del livello di espressione del gene IDO.

Più precisamente, 13/45 pazienti (28,9%) non sono risultati esprimere IDO ad un livello significativo mediante le metodiche sopra citate, 13 (28,9%) hanno dimostrato di esprimere il gene e la proteina da esso codificata ad un livello basso, ma positivo. Dodici pazienti (26,7%) esprimono IDO ad un livello intermedio e, infine, 7/45 pazienti (15,6%) esprimono IDO a livelli elevati.

Alla luce di tali suddivisioni, i pazienti analizzati a livello molecolare sono stati studiati per l'espressione delle caratteristiche di rischio alla diagnosi e per la risposta alla chemioterapia di induzione.

Dei 13 pazienti IDO⁻, 7 (53,8%) avevano un'età all'esordio inferiore ai 60 anni, mentre 6 (46,2%) avevano più di 60 anni. Nel gruppo di pazienti ad espressione bassa di IDO quelli con più di 60 anni erano 7/13 (53,8%), a fronte dei 4/12 (33,3%) nel gruppo ad espressione intermedia e dei 2/7 (28,6%) nel gruppo ad elevata espressione.

L'età mediana nei quattro gruppi di pazienti è risultata pari a:

- Pazienti IDO-negativi: 56 anni (*range* 33-69);
- Pazienti a bassa espressione di IDO: 60 anni (*range* 21-72);
- Pazienti ad espressione intermedia di IDO: 46 anni (*range* 34-68);
- Pazienti con elevata espressione di IDO: 48 anni (*range* 35-68).

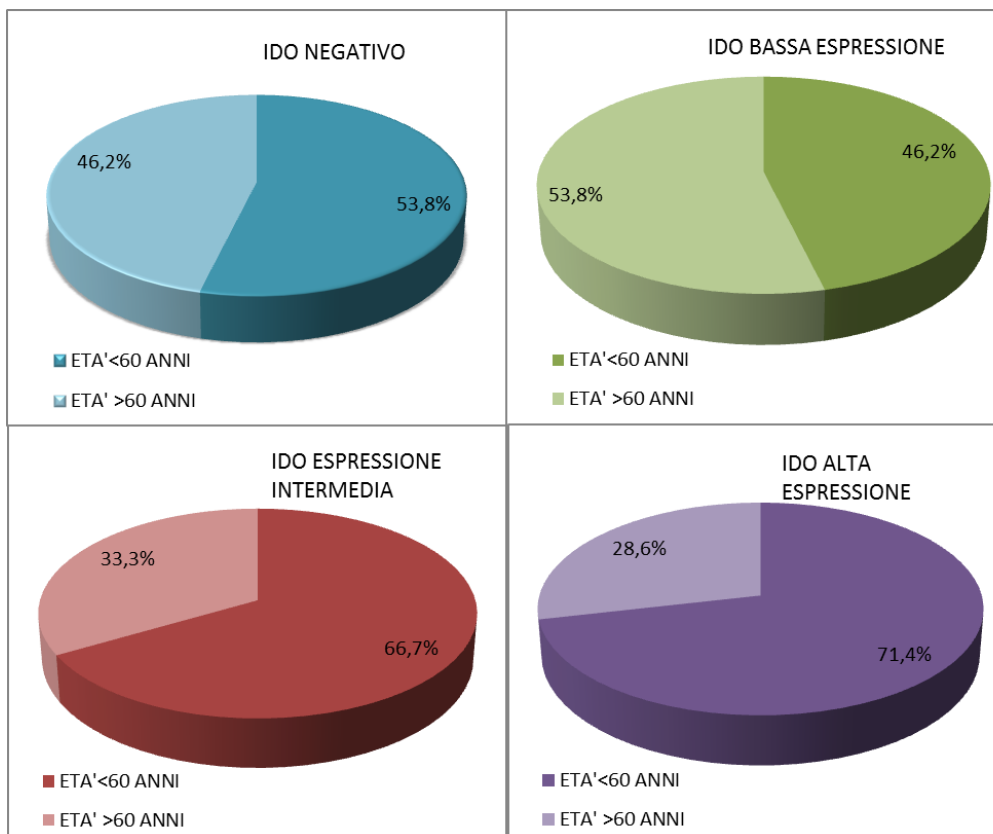


Figura 10. Età alla diagnosi nelle 4 categorie di espressione di IDO.

Una iperleucocitosi, con globuli bianchi totali (WBC) superiori a 30.000/mmc, era presente in 9/13 pazienti IDO-negativi (69,2%), in 5/13 pazienti a bassa espressione (38,5%), in 9/12 pazienti ad espressione intermedia (75%) e in 3/7 pazienti ad elevata espressione (42,9%) di IDO.

E' stato altresì calcolato il numero mediano di globuli bianchi totali all'esordio, risultato pari a :

- Pazienti IDO-negativi: 45.460/mmc (*range* 2400-286.900);
- Pazienti a bassa espressione di IDO: 10.000/mmc (*range* 1440-240.000);
- Pazienti ad espressione intermedia di IDO: 79.850/mmc (*range* 6000-163.900);

- Pazienti con elevata espressione di IDO: 22.700/mmc (*range* 1370-63.400).

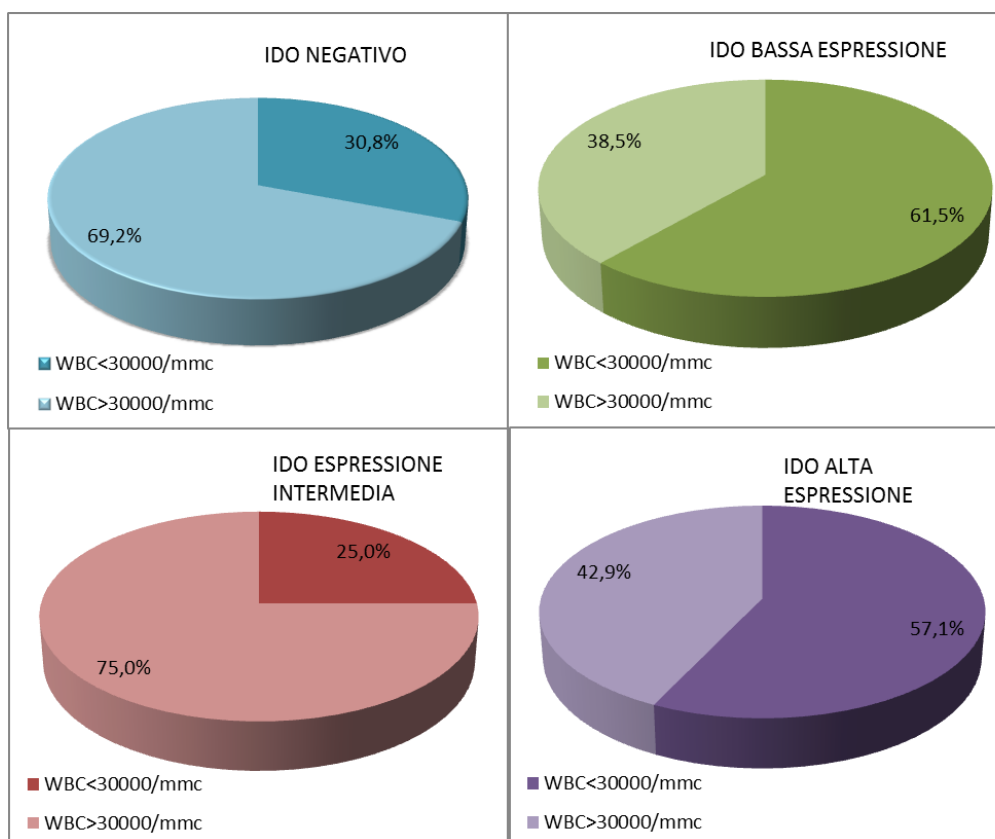


Figura 11. Numero di globuli bianchi alla diagnosi nelle 4 categorie di espressione di IDO.

Tutti i pazienti IDO-negativi e il 100% dei pazienti ad espressione intermedia sono risultati avere una LAM *de novo*; al contrario, il 38,5% dei pazienti a bassa espressione e il 14,3% dei pazienti ad elevata espressione hanno ricevuto diagnosi di LAM secondaria a pregressa Mielodisplasia.

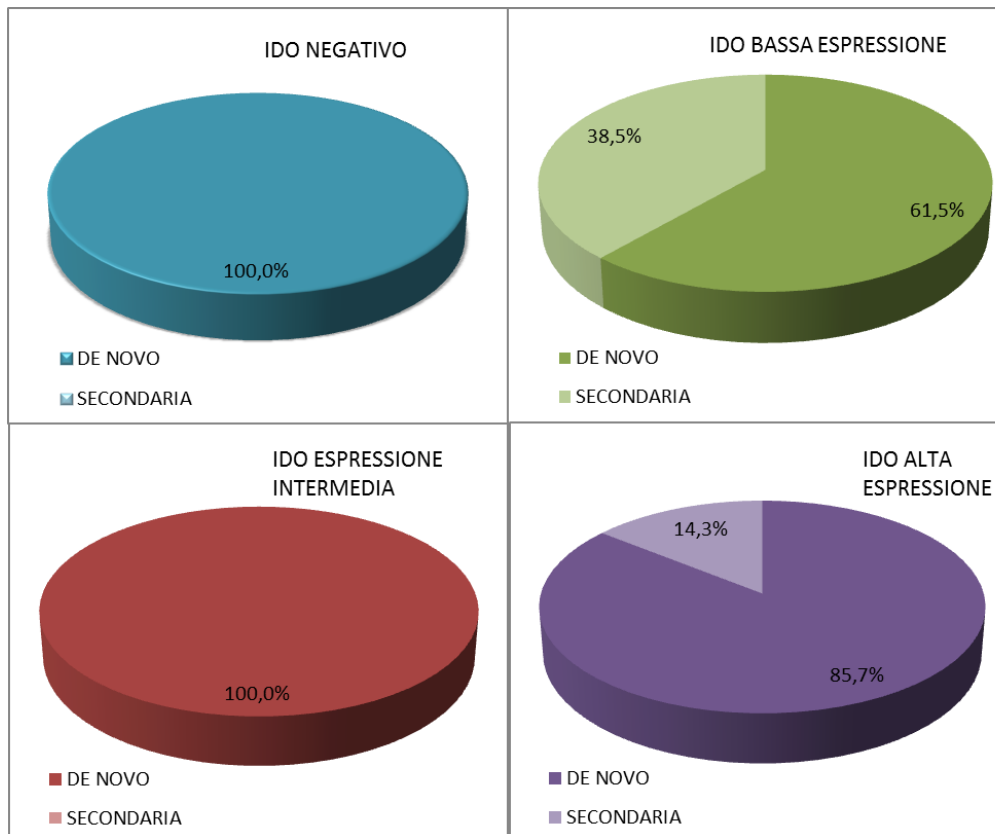


Figura 12. LAM *de novo* vs secondaria nelle 4 categorie di espressione di IDO.

I 45 pazienti sono stati quindi studiati sotto il profilo citogenetico e, su questa base, sono stati classificati in tre differenti categorie di rischio. 3/13 pazienti (23,1%) dei pazienti IDO⁻ avevano caratteristiche di rischio elevato, mentre 1/13 (7,7%) avevano un rischio basso. I rimanenti 9 pazienti (69,2%) avevano caratteristiche di rischio citogenetico standard.

Dei tredici pazienti ad espressione bassa di IDO, 4 (30,8%) sono risultati essere a rischio alto e 9 (69,2%) a rischio intermedio.

I pazienti ad espressione di IDO intermedia avevano caratteristiche di rischio citogenetico standard nell'83,3% dei casi (10/12), rischio basso nell'8,3% dei casi (1/12) e alto nell'8,3% (1/12) dei casi.

Infine, 2/7 pazienti ad espressione elevata di IDO (33,3%) sono stati classificati nella categoria ad alto rischio, 4 (66,7%) a rischio intermedio ed un paziente non è risultato valutabile per rischio citogenetico.

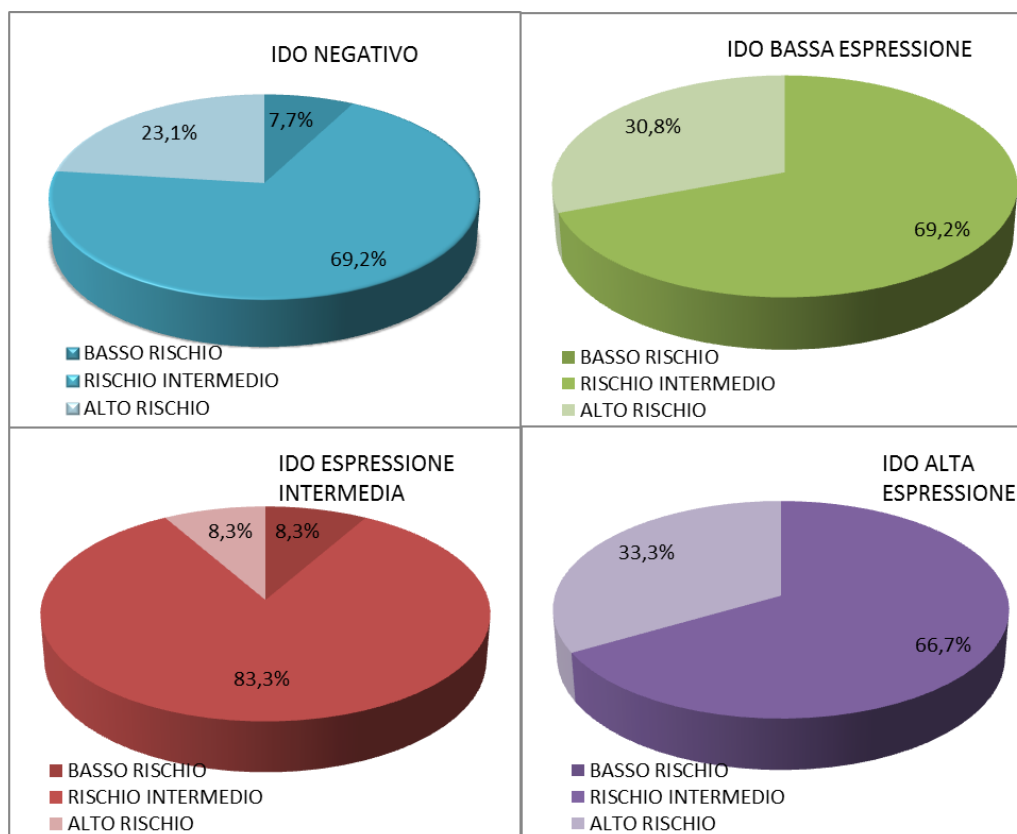


Figura 13. Rischio citogenetico alla diagnosi nelle 4 categorie di espressione di IDO.

Per quanto concerne lo *status* mutazionale di FLT3 ed NPM, nella categoria di pazienti IDO negativi 4 sono risultati essere a rischio elevato (36,4%), 3 a rischio basso (27,3%) e 4 a rischio standard (36,4%). Tra i dodici pazienti valutabili nella categoria ad espressione bassa, 4 (33,3%) erano a rischio elevato, 2 a rischio basso (16,7%) e 6 a rischio standard (50,0%); nella categoria ad espressione intermedia 4 pazienti erano a rischio elevato (36,4%), mentre 2 a

rischio basso (18,2%) e 5 (45,5%) a rischio standard. Un paziente non era valutabile.

Infine, un solo paziente dei sette ad espressione alta di IDO è risultato avere la mutazione di FLT3 ed uno la mutazione isolata di NPM (20,0%), risultando, rispettivamente, a rischio elevato e basso in termini molecolari. Tre pazienti (60%) sono risultati a rischio standard e due non valutabili.

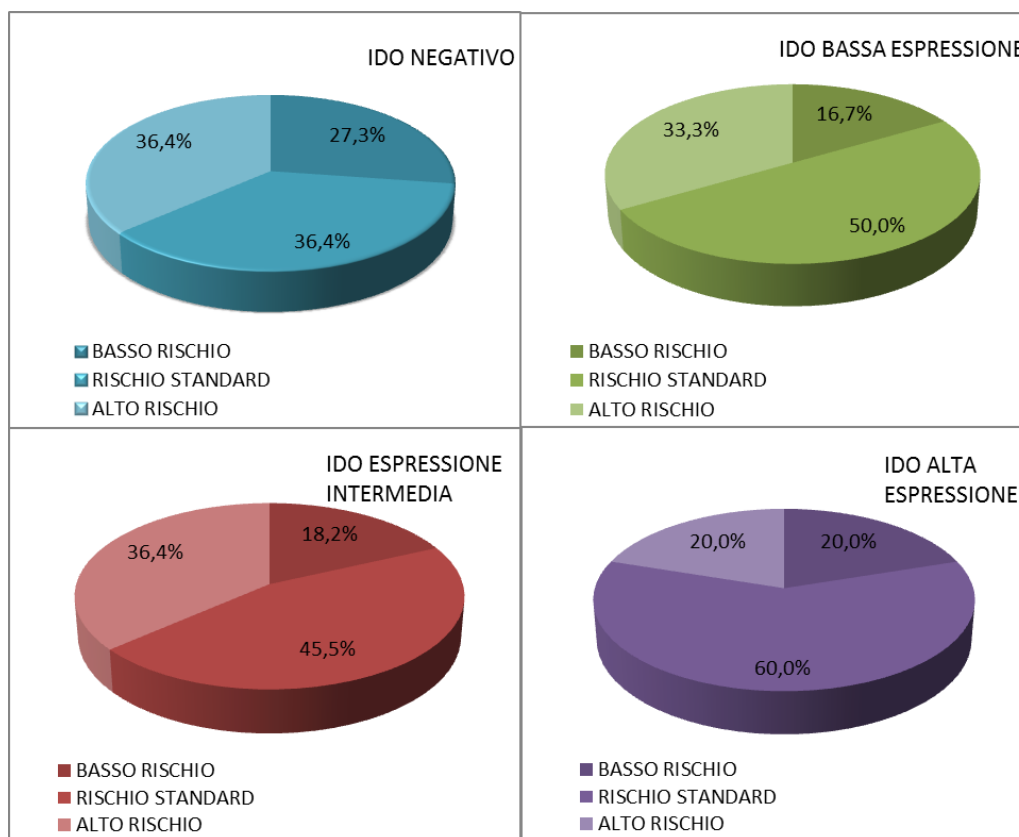


Figura 14. Rischio molecolare alla diagnosi nelle 4 categorie di espressione di IDO.

Globalmente, dunque, in considerazione dei fattori di rischio all'esordio, il 92,3% dei pazienti IDO-negativi e di quelli ad espressione bassa di IDO, il 75% dei pazienti con un livello di espressione intermedio e l'85,7% dei pazienti ad

espressione alta di IDO sono risultati ad elevato rischio, possedendo almeno uno dei suddetti fattori di rischio.

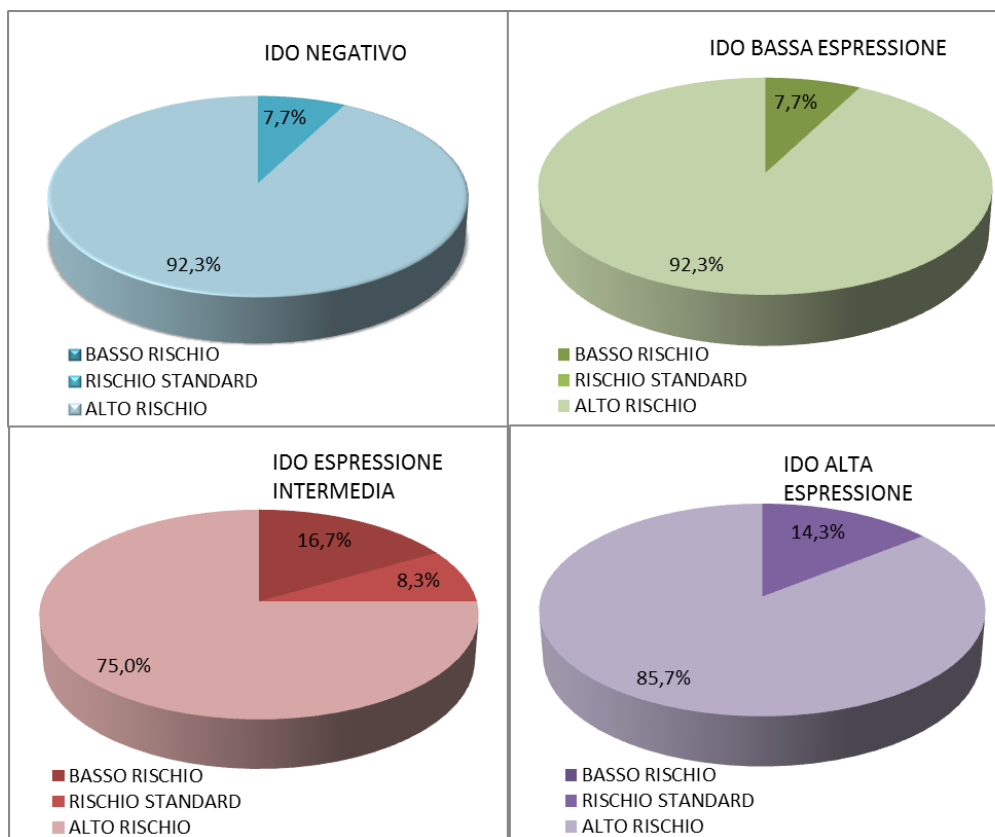


Figura 15. Rischio globale alla diagnosi nelle 4 categorie di espressione di IDO.

I pazienti sono stati poi valutati per risposta alla terapia. Sono stati considerati valutabili i pazienti sottoposti ad almeno un ciclo di chemioterapia di induzione. Per quanto concerne i pazienti anziani, perciò, rientrano in tale analisi soltanto quelli considerati *fit* per l'esecuzione di un regime chemioterapico, mentre sono stati esclusi i pazienti che hanno ricevuto soltanto terapia di contenimento (ad esempio idrossiurea, HU) o terapie sperimentali. I differenti schemi terapeutici utilizzati sono riportati nella Tabella 2.

SCHEMI DI INDUZIONE	IDO NEGATIVO	IDO BASSO	IDO INTERMEDIO	IDO ALTO
<i>ICE</i>	1	0	0	0
<i>My-AIG</i>	1	0	0	0
<i>My-FLAI</i>	4	4	4	3
<i>3-7</i>	2	2	4	2
<i>My-FLAIG</i>	0	0	1	0
<i>My-AI</i>	0	1	0	0
<i>My-AIE</i>	1	1	2	1
<i>My-AIG</i>	1	0	0	0
<i>1-7</i>	2	1	0	1
<i>ATRA-IDA</i>	0	0	1	0
<i>ARA-C DOSI INTERMEDIE</i>	1	0	0	0
<i>1-5</i>	0	1	0	0

Tabella 2. Schemi di chemioterapia di induzione utilizzati.

Tutti i pazienti IDO-negativi sono risultati valutabili per risposta; di questi 10 (76,9%) hanno ottenuto una remissione completa della patologia di base, mentre 3 (23,1%) sono risultati resistenti. Dei tredici pazienti a bassa espressione di IDO, 9 sono risultati valutabili per risposta; 5/9 (55,6%) hanno risposto all'induzione e 4/9 (44,4%) si sono dimostrati resistenti. Dei pazienti ad espressione intermedia, 7 dei 10 valutabili (70%) hanno ottenuto una remissione completa, mentre 3 (30%) sono risultati resistenti.

Nella categoria di pazienti ad elevata espressione di IDO, tutti i 7 pazienti sono risultati valutabili ed hanno ottenuto nel 28,6% (2/7) una Remissione Completa, mentre ben il 71,4% si è dimostrato resistente all'induzione.

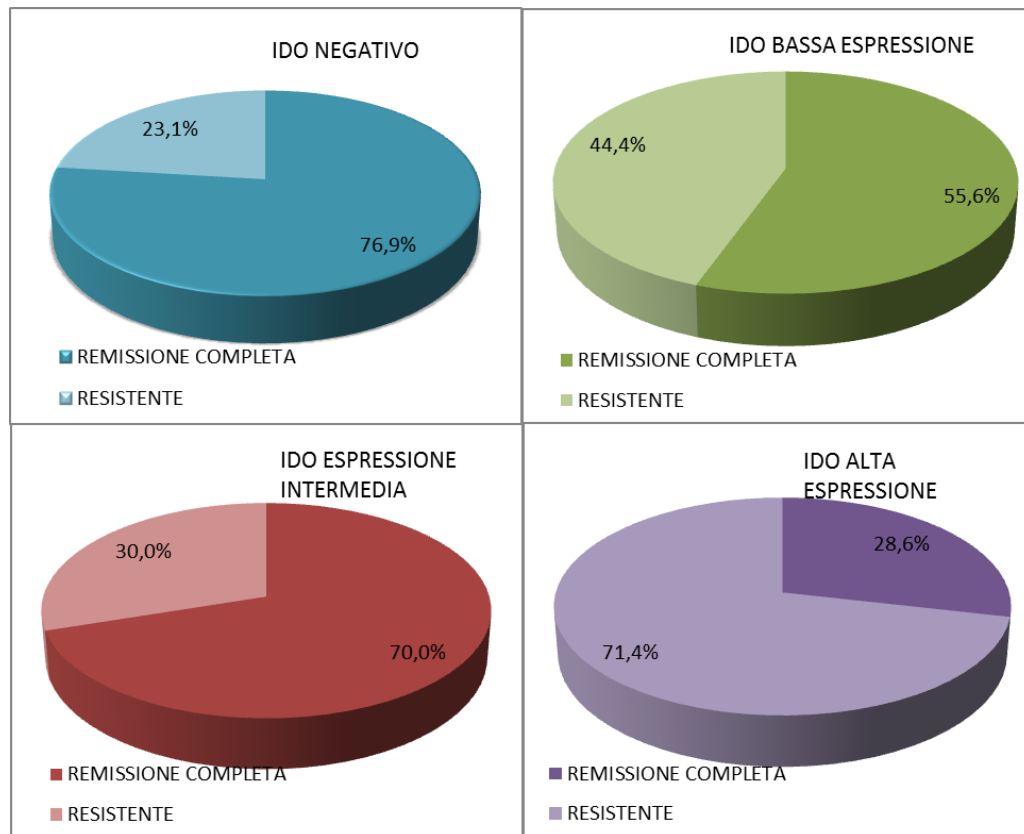


Figura 16. Risposta alla chemioterapia di induzione nelle 4 categorie di espressione di IDO.

CARATTERI DI RISCHIO	PAZIENTI IDO ⁻ (N=13)	PAZIENTI IDO ⁺ BASSA ESPRESSIONE(N=13)	PAZIENTI IDO ⁺ INTERMEDIA ESPRESSIONE(N=12)	PAZIENTI IDO ⁺ ALTA ESPRESSIONE(N=7)
ETA' < 60 ANNI	7 (53,8%)	6 (61,5%)	8 (66,6%)	5 (71,4%)
ETA' > 60 ANNI	6 (46,2%)	7 (38,5%)	4 (33,3%)	2 (28,6%)
WBC < 30000/mmc	4 (30,8%)	8 (61,5%)	3 (25%)	4 (57,1%)
WBC > 30000/mmc	9 (69,2%)	5 (38,5%)	9 (75%)	3 (42,9%)
LAM DE NOVO	13 (100%)	8 (61,5%)	12 (100%)	6 (85,7%)
LAM SECONDARIA	0	5 (38,5%)	0	1 (14,3%)
K BASSO RISCHIO	1 (7,7%)	0	1 (8,3%)	0
K ALTO RISCHIO	3 (23,1%)	4 (30,8%)	1 (8,3%)	2 (33,36%)
K RISCHIO STANDARD	9 (69,2%)	9 (69,2%)	10 (83,3%)	4 (66,7%)
NON VALUTABILI	0	0	0	1
NPM MUTATA/FLT3 WT	3 (36,4%)	2 (16,7%)	2 (18,2%)	1 (20,0%)
FLT3 MUTATO	4 (36,4%)	4 (33,3%)	4 (36,4%)	1 (20,0%)
FLT3 WT/NPM WT	4 (30,8%)	6 (50,0%)	5 (45,5%)	3 (60,0%)
NON VALUTABILI	2	1	1	2

Tabella 3. Caratteristiche di rischio alla diagnosi.

5. DISCUSSIONE

Lo scopo di questa Tesi è quello di analizzare un campione di pazienti adulti affetti da Leucemia Mieloide Acuta per l'espressione di IDO, il gene che codifica per l'enzima Indoleamina 2,3-diossigenasi.

Tale proteina, ampiamente studiata sia in ambiti fisiologici, quali la gravidanza, sia in contesti patologici, quali le neoplasie solide, è responsabile della prima reazione catabolica che porta alla degradazione del triptofano, aminoacido essenziale per la sopravvivenza cellulare.

Numerosi studi hanno evidenziato l'importanza dell'espressione di IDO nella creazione di un microambiente tissutale immunotollerante e, quindi, favorente la crescita tumorale.

Per quanto concerne le neoplasie di pertinenza ematologica, in particolare le Leucemie Acute Mieloidi, è stato dimostrato come le cellule blastiche esprimano il gene IDO e possano produrre, di conseguenza, la proteina funzionalmente attiva.

Il gruppo di Chamuleau *et al.* ha per la prima volta valutato l'associazione tra l'espressione di IDO in un gruppo di 286 pazienti adulti affetti da LAM e la presenza alla diagnosi dei consueti fattori di rischio prognostico, più precisamente l'età, il numero di leucociti, la secondarietà, il cariotipo e le caratteristiche molecolari (presenza di alterazioni a carico dei geni FLT3 ed NPM). L'espressione di IDO è stata valutata in tutti i pazienti mediante l'esecuzione del *Gene Expression Profiling*, in alcuni tramite qPCR. In questo lavoro non è stata eseguita la valutazione del livello di proteina espressa dai pazienti risultati positivi.

Da tale studio è emerso che IDO non correla con alcuno dei fattori di rischio alla diagnosi precedentemente enumerati; al contempo, però, tutti i pazienti con lungo *Overall Survival* (OS) presentano una bassa espressione del gene IDO. Una espressione del gene ad elevati livelli rappresenta un fattore prognostico

sfavorevole in termini di basso *rate* di Risposte Complete alla chemioterapia di induzione, basso OS ed elevata ricorrenza di ricadute (basso *Relapse-Free Survival*, RFS).

La casistica di pazienti considerata in questa Tesi è stata valutata, per quanto concerne l'espressione genica di IDO, mediante l'esecuzione di RT-PCR. I risultati sono stati successivamente controllati eseguendo uno studio di *Western Blotting*, per valutare la presenza della proteina IDO attiva ed i suoi livelli di espressione.

Come detto in precedenza, sono stati al momento valutati 45 pazienti adulti con diagnosi di LAM.

Tali pazienti sono stati suddivisi in quattro differenti categorie, sulla base degli studi molecolari eseguiti: IDO-negativi, IDO⁺, ma con bassi livelli di espressione, IDO⁺, ma ad espressione intermedia e, infine, pazienti con elevata espressione di IDO.

I pazienti sono stati dunque stratificati in categorie di rischio, in considerazione della presenza di fattori di rischio all'esordio e della risposta alla chemioterapia di induzione.

Da tali analisi è emerso che, pur con i limiti derivanti da una casistica al momento poco numerosa, la presenza della proteina IDO non sembra correlare in modo significativo con le caratteristiche di rischio alla diagnosi precedentemente descritte.

I pazienti negativi per l'espressione di IDO e quelli con un livello basso di espressione sembrano avere un'età più avanzata rispetto ai pazienti IDO-positivi ad espressione intermedia ed elevata.

Per quanto concerne l'iperleucocitosi, si può osservare una netta differenza solo considerando i pazienti appartenenti alle due categorie posizionate ai due

estremi (IDO⁻ e IDO⁺ ad elevata espressione), nei quali le mediane del numero totale di WBC sono, rispettivamente, 45.450/mmc e 22.700/mmc.

Al momento non è possibile trarre alcuna conclusione per quanto concerne le caratteristiche di rischio citogenetico e molecolare, probabilmente a causa del ristretto numero di pazienti analizzati.

Sulla base dei risultati ottenuti dallo studio di Chamuleau *et al.*, secondo cui, come già detto, l'espressione di IDO correlava con l'OS e il RFS, i 45 pazienti studiati sono stati valutati anche in base alla risposta alla chemioterapia.

Dei 45 pazienti totali, 39 sono risultati valutabili per risposta, in quanto sottoposti ad almeno un ciclo di chemioterapia.

Sulla base dell'espressione di IDO, possiamo affermare che il 71% dei pazienti ad elevata espressione di IDO si sono dimostrati resistenti alla chemioterapia di induzione, contro il 23% dei pazienti IDO-negativi. Nelle rimanenti due categorie, IDO a bassa espressione e IDO ad espressione intermedia, il *rate* di mancata risposta completa alla chemioterapia di induzione è risultato pari al 44,4% e 30%, rispettivamente.

Tali risultati, oltre ad essere in linea con quelli ottenuti dal gruppo di Chamuleau, aprono ad interessanti spunti di discussione.

Studi recenti hanno dimostrato che l'azione citotossica di alcuni agenti chemioterapici, tra cui le antracicline, farmaci compresi in pressoché tutti i regimi di terapia delle Leucemie Acute Mieloidi, è immunogenica.

Secondo queste evidenze, la morte cellulare indotta da tali farmaci innesca una serie di alterazioni molecolari e biochimiche risultanti nella modificazione della membrana cellulare delle cellule blastiche, nella liberazione di proteine nel microambiente tissutale e nell'attivazione di numerose vie cataboliche intracellulari. Gli eventi sopra elencati sono in grado di interferire con i meccanismi di risposta immunitaria sia a livello locale, sia sistemico, portando

all'esposizione di antigeni tumorali e alla loro presentazione da parte delle APC, in particolare delle Cellule Dendritiche. Queste ultime, a loro volta, si rendono responsabili dell'attivazione di una risposta antitumorale mediata dai linfociti T.

Tali processi sono noti con il nome di Morte Immunologica e rappresentano un campo di crescente interesse scientifico, in quanto mettono in luce l'esistenza di un meccanismo immuno-mediato in grado di potenziare in modo sinergico l'effetto farmacologico degli agenti citotossici, influenzando significativamente l'*outcome* dei pazienti.

Nei pazienti in cui la proteina IDO risulta iper-espressa, si potrebbe dunque ipotizzare la presenza di un meccanismo immunologico sinergico alla chemioterapia di minore entità o addirittura nullo, condizione che spiegherebbe l'elevato *rate* di pazienti resistenti alla chemioterapia di induzione evidenziato sia nella casistica fiamminga, sia in quella oggetto di questa Tesi.

La presenza di IDO e, dunque, il crearsi di un ambiente tollerante nei confronti della leucemia, grazie all'azione delle DCs e all'attivazione dei linfociti T regolatori, potrebbe influenzare in modo negativo e rendere meno efficiente il meccanismo della morte immunologica, permettendo a parte delle cellule leucemiche di sopravvivere, impedendo così al paziente di ottenere la Remissione Completa a seguito della terapia di induzione.

Un ulteriore punto di discussione è rappresentato dal ruolo svolto dalla *Leukemia Stem Cell* (LSC), la cellula da cui trae origine la LAM e caratterizzata dalla spiccata capacità di *self-renewing*.

Tale cellula, essendo normalmente quiescente, è classicamente considerata poco o affatto responsiva all'azione degli agenti chemioterapici, che possiedono un'azione generalmente ciclo-specifica.

L'espressione dell'enzima IDO anche a questo livello potrebbe potenziare tale caratteristica della cellula staminale leucemica, proteggendola completamente dall'azione citotossica della chemioterapia.

Tale meccanismo potrebbe essere alla base del mantenimento di una quota variabile di cellule staminali leucemiche, rappresentanti la cosiddetta Malattia Minima Residua, in grado di determinare la ricomparsa della patologia di base.

Da quanto detto finora appare chiaro che il ruolo prognostico svolto dalla proteina Indoleamina 2,3-diossigenasi nell'ambito delle neoplasie ematologiche e, in particolare, nella Leucemia Acuta Mieloide dell'adulto, merita di essere ulteriormente approfondito.

Sulla base delle ipotesi sopra descritte, inoltre, IDO potrebbe anche rappresentare un possibile *target* terapeutico: bloccare la sua azione immunomodulante potrebbe favorire il meccanismo della morte immunologica e prevenire o ridurre il mantenimento della Malattia Minima Residua.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Tura S., Baccarani M., *Corso di malattie del sangue e degli organi emopoietici*, Esculapio, Bologna; 2003.
2. Goldman L., Ausiello D., *Cecil Textbook of Medicine*, Philadelphia, Saunders; 2004.
3. Kumar V., Fausto N., Abbas A., *Robbin's & Cotran's Pathologic Basis of Disease*, Philadelphia, Saunders; 2004.
4. Griffin J.D., Linch D. et al., *A monoclonal antibody reactive with normal and leukemic human myeloid progenitor cells*, *Leuk Res*; 1984; 8: 521-534.
5. Dinndorf P.A., Andrews R.G et al., *Expression of normal myeloid-associated antigens by acute leukaemia cells*, *Blood*; 1986; 67: 1048-1054.
6. Bennett J.M., Katovsky D., Daniel M.T., et al., *Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO)*, *Br. J. Haematol.*; 1991; 78:325-329.
7. Trotman L.C., Alimonti A., Scaglioni P.P., Koutcher J.A., Cordon-Cardo C., Pandolfi P.P., *Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function*; *Nature*; 2006; 441:523-527
8. Grignani F., Ferrucci P.F., Testa U. et al., *The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells*, *Cell*; 1993; 74:423-431.
9. Sanz M.A., Martin G., Gonzalez M. et al., *Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group*, *Blood.*; 2004; 103:1237-1243.

-
10. Grimwade D., Walker H., Oliver F., et al., *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial*, The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties Blood; 1998; 92:2322-2333.
 11. Cleary M.L., *A new angle on a pervasive oncogene*, Nat Genet.; 1999; 23:134-135.
 12. Cairoli R., Beghini A., Grillo G., et al., *Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study*, Blood; 2006; 107:3463-3468.
 13. Schittenhelm M.M., Shiraga S., Schroeder A. et al., *Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies*, Cancer Res.; 2006; 66:473-481.
 14. Ogawa S., Kurokawa M., Tanaka T. et al., *Structurally altered Evi-1 protein generated in the 3q21q26 syndrome*, Oncogene; 1996; 13:183-191.
 15. Parry P., Djabali M., Bower M. et al., *Structure and expression of the human trithorax-like gene 1 involved in acute leukemias*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.; 1993; 90:4738-4742.
 16. Armstrong S.A., Staunton J.E., Silverman L.B. et al., *MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia*, Nat. Genet.; 2002; 30:41-47
 17. Soares L.M., Zanier K., Mackereth C., Sattler M., Valcarcel J., *Intron removal requires proofreading of U2AF/3' splice site recognition by DEK*, Science; 2006; 312:1961-1965.

-
18. Fu G.K., Grosveld G., Markovitz D.M., *DEK, an autoantigen involved in a chromosomal translocation in acute myelogenous leukemia, binds to the HIV-2 enhancer* Proc, Nat. Acad. Sci. U.S.A.; 1997; 94:1811-1815.
 19. Shearer B.M., Knudson R.A., Flynn H.C., Ketterling R.P., *Development of a D-FISH method to detect DEK/CAN fusion resulting from t(6;9)(p23;q34) in patients with acute myelogenous leukemia*, Leukemia; 2005; 19:126-131.
 20. Small D., Levenstein M., Kim E. et al., *STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.; 1994; 91:459-463.
 21. Abu-Duhier F.M., Goodeve A.C., Wilson G.A. et al., *FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group*, Br J Haematol; 2000; 111:190-195.
 22. Piccaluga P.P., Bianchini M., Martinelli G., *Novel FLT3 point mutation in acute myeloid leukaemia*, Lancet Oncol.; 2003; 4:604.
 23. Frohling S., Scholl C., Gilliland D.G., Levine R.L., *Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications*, J Clin Oncol.; 2005; 23:6285-6295.
 24. Falini B., Mecucci C., Tiacci E. et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*, N. Engl J Med.; 2005; 352:254-266.
 25. Falini B., Nicoletti I., Martelli M.F., Mecucci C., *Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features*, Blood; 2007; 109:874-885.

-
26. Anderson K., Rusterholz C., Mansson R. et al., *Ectopic expression of PAX5 promotes maintenance of biphenotypic myeloid progenitors coexpressing myeloid and B-cell lineage-associated genes*, Blood; 2007; 109:3697-3705.
 27. Tiacci E., Pileri S., Orleth A. et al., *PAX5 expression in acute leukemias: higher B-lineage specificity than CD79a and selective association with t(8;21)-acute myelogenous leukemia*, Cancer Res.; 2004; 64:7399-7404.
 28. Rowe J.M., *Optimal induction and post-remission therapy for AML in first remission*, Hematology Am Soc Hematol Educ Program; 2009; 396-405.
 29. Juliusson G., Antunovic P., Derolf A. et al., *Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry*, 2009 113: 4179-4187.
 30. Burnet M., *Cancer: a biological approach*, Br Med J. 1957 Apr 13;1(5023):841-7.
 31. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H. et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*, Nature Immunol. 2002;3:991-99.
 32. Swann J.B., Smyth M.J., *Immune surveillance of tumors*, J Clin Invest. 2007 May;117(5):1137-46.
 33. Katz J.B., Muller A.J., Prendergast G.C., *Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumor immune escape*, Immunol Rev. 2008 Apr;222:206-21.
 34. Abbas A.J., Lichtman A.H., Pober J.S., *Immunologia cellulare e molecolare*, Piccin, 2002.
 35. Jiang H., Chess L., *An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation*, J Clin Invest. 2004 Nov;114(9):1198-208.

-
36. O'Garra A., Vieira P., *Regulatory T cells and mechanisms of immune system control*, Nat. Med. 2004;10:801-805.
37. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune disease*, J. Immunol. 1995;155:1151-1164.
38. Ball H.J., Yuasa H.J., Austin C.J. et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway*, Int J Biochem Cell Biol. 2009 Mar;41(3):467-71.
39. Pfefferkorn E.R., *Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan*, Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Feb;81(3):908-12.
40. Munn D.H., Shafizadeh E., Attwood J.T. et al., *Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism*, J Exp Med. 1999;189(9):1363-72.
41. Mellor A.L., Keskin D.B., Johnson T. et al., *Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses*, J Immunol. 2002 Apr 15;168(8):3771-6.
42. Frumento G., Rotondo R., Tonetti M. et al., *Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase*, Exp Med. 2002 Aug 19;196(4):459-68.
43. Fallarino F., Grohmann U., Vacca C. et al., *T cell apoptosis by tryptophan catabolism*, Cell Death Differ. 2002 Oct;9(10):1069-77.
44. Mellor A.L., Munn D.H., *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*, Nature Rev. Immunol. 2004;4:762-773.

-
45. Sugimoto H., Oda S., Otsuki T. et al., *Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006;103(8):2611-6.
46. Thomas S.R., Stocker R., *Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway*, Redox Rep. 1999;4(5):199-220.
47. Thomas S.R., Salahifar H., Mashima et al., *Antioxidants inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase in IFN-gamma-activated human macrophages: posttranslational regulation by pyrrolidine thiocarbamate*, J Immunol. 2001;166(10):6332-40.
48. Samelson-Jones B.J., Yeh S.R., *Interactions between nitric oxide and indoleamine 2,3-dioxygenase*, Biochemistry 2006;45(28):8527-38.
49. Ball H.J., Sanchez-Perez A., Weiser S. et al., *Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice*, Gene 2007;396(1):203-211.
50. Metz R., Duhadaway J.B., Kamasani U. et al., *Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D1-methyl-tryptophan*, Cancer Res. 2007;67(15):7082-7087.
51. Yuasa H.J., Takubo M., Takahashi A et al., *Evolution of vertebrate indoleamine 2,3-dioxygenase*, J. Mol. Evol. 2007;65(6): 705-714.
52. Ball H.J., Yuasa H.J., Austin C.J.D. et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway*, Int J Biochem Cell Biol. 2009 Mar;41(3):467-71.

-
53. Hönig A., Rieger L., Kapp M. et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance*, J Reprod. Immunol. 2004;61(2):79-86.
54. Musso T., Gusella G.L., Brooks A. et al., *Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes*, Blood 1994;83(5):1408-11.
55. Munn D.H., Sharma M.D., Lee J.R. et al., *Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase*, Science, 2002;297(5588):1867-70.
56. Jürgens B., Hainz U., Fuchs D. et al., *Interferon-gamma-triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells*, Blood, 2009;114(15):3235-43
57. Terness P., Chuang J.J., Bauer T. et al., *Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: too much ado about IDO?* Blood 2005;105(6):2480-6.
58. Miwa N., Hayakawa S., Miyazaki S. et al., *IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion*, Mol Hum Reprod. 2005;11(12):865-70.
59. Björck P., Kincade P.W., *CD19⁺ pro-B cells can give rise to dendritic cells in vitro*, J Immunol. 1998;161(11):5795-9.
60. Kurz K., Gluhcheva Y., Zvetkova E. et al., *Interferon-gamma-mediated pathways are induced in human CD34⁺ haematopoietic stem cells*, Immunobiology 2009.

-
61. Jones B.J., Brooke G., Atkinson K. et al., *Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells*, *Placenta*, 2007;28(11-12):1174-81.
62. Godin-Ethier J., Hanafi L.A., Piccirillo C.A. et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives*, *Clin Cancer Res*, 2011; 17:6985-6991.
63. Uyttenhove C., Pilotte L., Théate I. et al., *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*, *Nat Med*. 2003 Oct;9(10):1269-74.
64. Okamoto A., Nikaido T., Ochiai K. et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells*, *Clin Cancer Res*. 2005;11(16):6030-9.
65. Ino K., Yoshida N., Kajiyama H. et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer*, *Br J Cancer*, 2006;95(11):1555-61.
66. Brandacher G., Perathoner A., Ladurner R. et al., *Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor infiltrating T cells*, *Clin Cancer Res*. 2006;12(4):1144-51.
67. Munn D.H., Sharma M.D., Hou D. et al., *Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes*, *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(2):280-90.
68. Buggins A.G.S., Milojkovic D., Arno M.J. et al., *Microenvironment Produced by Acute Myeloid Leukemia Cells Prevents T Cell Activation and Proliferation by Inhibition of NF- κ B, c-Myc, and pRb Pathways*, *J Immunol* 2001;167;6021-6030.

-
69. Curti A., Trabanelli S., Salvestrini V. et al., *The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology*, Blood, 2009;113: 2394-2401.
70. El Kholy N.M., Sallam M.M., Ahmed M.B. et al., *Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in acute myeloid leukemia and the effect of its inhibition on cultured leukemia blast cells*, Medical Oncology, Med Oncol. 2011 Mar;28(1):270-8.
71. Chamuleau M.E., van de Loosdrecht A.A., Hess C.J. et al., *High INDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) mRNA level in blasts of acute myeloid leukemic patients predicts poor clinical outcome*, Haematologica. 2008 Dec;93(12):1894-8.
72. Taylor M.W., Feng G.S., *Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan catabolism*, 1991;5(11)2516-22.
73. Schmidt S.K., Müller A., Heseler K. et al., *Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase*, Eur. J Immunol. 2009;39(10):2755-64.
74. Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T., et al., *Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism*, Science, 1998;281(5380):1191-3.
75. Kudo Y., Boyd C.A., Spyropoulou I. et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta*, J Reprod. Immunol. 2004;61(2):87-98.
76. Guillonneau C., Hill M., Hubert F.X. et al., *CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase*, J Clin Invest. 2007 Apr;117(4):1096-106.

-
77. Gershon R.K., Cohen P., Hencin R. et al., *Suppressor T cells*, J Immunol. 1972;108(3):586-90.
78. Fehérvári Z., Sakaguchi S., *CD4⁺ Tregs and immune control*, J Clin. Invest. 2004;114(9):1209-17.
79. Fallarino F., Grohmann U., You S. et al., *The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells*, J Immunol. 2006 Jun 1;176(11):6752-61.
80. Apostolou I., Sarukhan A., Klein L. et al., *Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen*, Nat Immunol. 2002 Aug;3(8):756-63.
81. Thorstenson K.M., Khoruts A., *Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen*, J Immunol. 2001 Jul 1;167(1):188-95.
82. Nishikawa H., Kato T., Tawara I. et al., *Accelerated chemically induced tumor development mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells in wild-type hosts*, Proc Natl Acad Sci USA, 2005 Jun 28;102(26):9253-7.
83. Curti A., Pandolfi S., Valzasina B. et al., *Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells*, Blood, 2007;109(7):2871-7.
84. Banchereau J., Briere F., Caux C. et al., *Immunobiology of dendritic cells*, Annu. Rev. Immunol. 2000;18:767-811.
85. Jonuleit H., Knop J., Enk A.H., *Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells*, Arch. Dermatol. Res. 1996;289(1):1-8.

86. Terness P., Chuang J.J., Bauer T. et al., *Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: too much ado about IDO?* Blood. 2005;105(6):2480-6.
87. Hwu P., Du M.X., Lapointe R. et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation* Immunol. 2000;164(7):3596-9.