

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

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

Ciclo XXV

Settore concorsuale di afferenza: 06-D3
Settore scientifico disciplinare: MED-15

**STUDIO DELLA VIA DI SEGNALE
PI3K/Akt/mTOR
NELLE CELLULE DENDRITICHE**

Presentata da: Dr.ssa FRANCESCA ULBAR

Coordinatore dottorato

Prof. Stefano Pileri

Relatore

Dr.ssa Lucia Catani

Esame finale anno 2013

INDICE

1. INTRODUZIONE	2
1.1. LE CELLULE DENDRITICHE	2
1.2. MORFOLOGIA DELLE CELLULE DENDRITICHE	3
1.3. ETEROGENEITA' DELLE CELLULE DENDRITICHE	4
1.4. FUNZIONI DELLE CELLULE DENDRITICHE	6
1.4.1. Captazione dell'antigene	6
1.4.2. Processazione dell'antigene	7
1.4.3. Presentazione dell'antigene	10
1.5. RUOLO CLINICO DELLE CELLULE DENDRITICHE	11
1.6. GVHD.....	12
1.7. LA VIA DI SEGNALE PI3K/Akt/mTOR	15
1.7.1. PI3K.....	17
1.7.2. Akt.....	18
1.7.3. mTOR.....	18
1.8. FARMACI IMMUNOSOPPRESSORI.....	22
1.8.1. La rapamicina	23
1.8.2. La perifosina	24
2. OBIETTIVO DEL PROGETTO DI RICERCA	26
3. MATERIALI E METODI	28
3.1 Reagenti	28
3.2.Separazione cellulare.....	28
3.3. Colture cellulari	29
3.4. Apoptosi.....	30
3.5. Fenotipo delle APC	31
3.6. Produzione di citochine infiammatorie	31
3.7. Analisi della capacità allostimolatoria delle APC	32
4. RISULTATI	33
4.1. EFFETTI DELLA RAPAMICINA	33
4.2. EFFETTI DELLA PERIFOSINA	43
5. DISCUSSIONE	48
6. BIBLIOGRAFIA.....	54

1. INTRODUZIONE

1.1. LE CELLULE DENDRITICHE

Le cellule dendritiche (DC) sono cellule accessorie appartenenti al sistema immunitario (SI), il cui ruolo è la presentazione dell'antigene per l'induzione di una risposta immunitaria. Infatti, affinché si dia inizio alla risposta immunitaria le cellule del sistema immunitario adattivo (linfociti T e B) devono essere istruite da particolari cellule definite cellule presentanti l'antigene (APC) quali cellule dendritiche (DC), monociti, macrofagi, linfociti B e in parte cellule endoteliali e cellule staminali CD34+.

Le cellule del sistema immunitario adattivo agiscono contro agenti patogeni insieme alle cellule del sistema immunitario innato; quest'ultimo è rappresentato da cellule ad attività fagocitica quali neutrofili, macrofagi e cellule natural killer, cioè ad attività citotossica naturale, oltre che da fattori del complemento e da mediatori dell'infiammazione.

Le DC sono le APC conosciute più potenti perchè in grado di indurre una risposta immunitaria primaria¹, ma al tempo stesso capaci anche di indurre tolleranza immunitaria² e di determinare il tipo di risposta immunitaria T-mediata.

Le DC sono cellule che presentano l'antigene "professionali", così definite in quanto possiedono le molecole specifiche richieste per presentare l'antigene e mostrano sulla loro superficie le molecole accessorie necessarie per una corretta risposta immunitaria.

1.2.MORFOLOGIA DELLE CELLULE DENDRITICHE

Le DC sono di forma stellata per la presenza di lunghi prolungamenti citoplasmatici, i dendriti; quando sono osservati al microscopio elettronico questi dendriti sono lunghi (>10 µm), sottili e spinosi; osservati al microscopio a contrasto di fase i dendriti sembrano estendersi e ritrarsi dal corpo cellulare¹. La forma e la motilità di tali cellule rispecchiano le loro funzioni, che sono la captazione degli antigeni, la selezione e l'attivazione dei linfociti T antigene-specifici.

Le DC esistono in due forme diverse ognuna delle quali ha caratteristiche fenotipiche, morfologiche e funzionali distinte: cellule dendritiche immature e cellule dendritiche mature.

Le DC immature fenotipicamente mostrano sulla loro superficie un'elevata espressione del CCR1, CCR5 e CCR6 e del CD68; bassa è invece l'espressione del CCR7, CD86, CD80, CD40 e CD83; sono cellule in grado di catturare e processare gli antigeni che incontrano. Le DC mature invece hanno ad alti livelli di CD83, CD86, CD49, CD80, MHCII e CD1a espressi sulla superficie; queste cellule sono in grado di presentare gli antigeni stimolando i linfociti T. Le due diverse funzioni non sono interscambiabili e sono segregate nel tempo. Tutto ciò rende le DC delle buone cellule presentanti l'antigene.

1.3. ETEROGENEITA' DELLE CELLULE DENDRITICHE

Le DC rappresentano una popolazione estremamente eterogenea, da un punto di vista ontogenetico, anatomico, fenotipico e funzionale. In generale, le cellule dendritiche sono classificate su base ontogenetica in mieloidi e linfoidi (queste ultime più comunemente chiamate plasmocitoidi). Va comunque precisato che l'origine linfoide delle DC plasmocitoidi è ancora da dimostrare in modo definitivo.

Le DC mieloidi² (mDC) risiedono nei tessuti, sia nel contesto degli epitelii, come le cellule di Langerhans, che indovate nello stroma, le DC stromali, dove svolgono una funzione di sentinelle. Le mDC si dal punto di vista fenotipico possono essere caratterizzate per l'espressione del CD11c, CD1c (BDCA-1), CD141 (BDCA-3) Le mDC che risiedono nei tessuti captano antigeni esogeni, li processano e li presentano nel contesto delle molecole MHC. In presenza di stimoli ambientali di origine patogenica (rilevati attraverso recettori specifici detti Toll Like Receptors, TLRs o Nod Like Receptors NLR) o infiammatoria (rilevato attraverso le molecole della famiglia del recettore del TNF, come il CD40) le DC maturano e acquisiscono la capacità di migrare ai linfonodi attraverso le vie linfatiche. La migrazione ai linfonodi è necessaria per la presentazione dell'antigene ai linfociti T: le mDC mature si localizzano infatti nelle aree T. La presentazione di antigeni da parte delle mDC mature determina l'innescò di una risposta immunitaria generalmente di tipo Th1 (T helper 1). In vitro le mDC sono generate dai monociti, usati come precursori, con l'aggiunta di fattori di crescita e di citochine specifiche; ad esempio in presenza del fattore di crescita

GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) e della citochina IL-4 si ottengono DC immature CD1a⁺ e CD14⁻ che se stimulate inducono una risposta Th1³; in presenza di GM-CSF e IFN- α (interferon- α) si ottengono cellule dendritiche parzialmente mature che se stimulate inducono una risposta Th1⁴. In vitro quindi differenti cocktail colturali stimolano la maturazione dei monociti a differenti tipi di APC⁵. In vivo è stato evidenziato che parte dei monociti circolanti nel sangue periferico può differenziarsi in DC (mieloidi) al passaggio dell'endotelio. Le caratteristiche funzionali e fenotipiche delle cellule dendritiche generate dai monociti non sempre sono coincidenti con quelle osservate in vivo.

Le DC plasmocitoidi⁶ (pDC) risiedono nei linfonodi, e migrano ai tessuti periferici solo in caso di infiammazione. Le pDC sono caratterizzate fenotipicamente come CD11c⁺, CD303⁺ (BDCA-2), CD304⁺ (BDCA-4) e CD123⁺. I dati in vitro suggeriscono un loro possibile ruolo regolatorio^{7,8}, facilitato dal fatto che le pDC si localizzano nelle aree T cellulari in forma immatura. Studi più recenti però mostrano che le pDC possono maturare, in presenza di molecole di origine patogena, soprattutto virale, in potenti APC capaci di iniziare risposte Th1. Le pDC sono quindi plastiche, e possono determinare la funzione dei linfociti T a cui presentano l'antigene a seconda degli stimoli che ricevono dal microambiente.

Le mDC a loro volta mostrano una spiccata plasticità. E' noto infatti che le DC mieloidi immature sono fondamentali per il mantenimento della tolleranza periferica⁹. Inoltre le mDC che maturano in presenza di

determinate sostanze, quali citochine (come l'IL-10 e il TGF- β) o glucocorticoidi, acquisiscono proprietà tollerogeniche piuttosto che immunogeniche.

1.4. FUNZIONI DELLE CELLULE DENDRITICHE

Le DC sono cellule estremamente versatili in grado di catturare e processare gli antigeni ed in seguito a ciò presentare i complessi MHC-peptide a distinte sottopopolazioni di linfociti T.

1.4.1. Captazione dell'antigene

Le DC immature sono molto efficienti nell'assunzione degli antigeni² in quanto possono impiegare differenti meccanismi quali:

a) la macropinocitosi, mediante la quale le DC formano delle ampie vescicole pinocitotiche in cui i soluti ed i liquidi dell'ambiente circostante sono campionati;

b) l'endocitosi mediata dal recettore come i recettori lectinici di tipo C (es. il recettore del mannosio e DEC-205)¹⁰⁻¹⁵ od i recettori che legano Fc γ di tipo I (CD64) e di tipo II (CD32), che permettono la captazione di immunocomplessi o di particelle opsonizzate¹⁶;

c) la fagocitosi, che permette l'assunzione di particelle come ad esempio le particelle di lattice¹⁷, frammenti di cellule necrotiche o apoptotiche mediante il CD36 e le integrine $\alpha\beta$ 3 e $\alpha\beta$ 5¹⁸⁻²⁰; virus e

batteri compreso il micobatterio²¹⁻²² ed anche i parassiti intracellulari come la *Leishmania major*²³.

Nelle DC l'endocitosi mediata dal recettore e la macropinosi sono talmente efficienti che, affinché l'antigene sia presentato ai linfociti T, sono sufficienti concentrazioni picomolari e nanomolari di queste cellule rispetto alle concentrazioni micromolari necessarie delle altre APC.

Poiché la captazione dell'antigene fornisce alle dendritiche dei segnali di maturazione, questa loro capacità diminuisce rapidamente.

1.4.2. Processazione dell'antigene

Le DC sono in grado di processare gli antigeni attraverso vie ben differenziate con le quali si generano i complessi tra i peptidi e le molecole di classe I o II:

Associazione sulle molecole di classe I: l'associazione dei peptidi sulle molecole di classe I del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC I) può avvenire sia attraverso una via endogena che una via esogena.

Prendendo in considerazione la via endogena, dapprima si ha la degradazione in peptidi delle proteine citosoliche derivanti da patogeni intracellulari o da proteine proprie (self), ed in seguito l'associazione di tali peptidi sulle molecole di classe I di nuova sintesi; la formazione del complesso MHC-peptide avviene all'interno del reticolo endoplasmatico.

La processazione antigenica nel citoplasma inizia con la coniugazione delle proteine con molte copie di un piccolo peptide, l'ubiquitina; le proteine così "ubiquitinate" sono indirizzate al proteasoma. All'interno

del proteasoma le proteine sono degradate in peptidi della lunghezza di 8-10 aminoacidi ed in seguito traslocati attivamente nel reticolo endoplasmatico tramite dei trasportatori transmembrana (TAP-1 e TAP-2) che accomodano questi peptidi nella tasca delle molecole di classe I. Accanto a questa via classica di processazione e assemblaggio, le DC possono bloccare sulle molecole di classe I anche peptidi derivanti da antigeni extracellulari particolati o derivanti da immunocomplessi provenienti direttamente dall'ambiente extracellulare. A tal proposito sono state descritte due modalità di presentazione degli antigeni esogeni: una via TAP indipendente ed una via TAP dipendente; quest'ultima sembra essere coinvolta nella generazione di una risposta immunitaria verso gli antigeni dei trapianti²⁴, antigeni particolati²⁵, tumori²⁶ e virus²⁷; sembra essere coinvolta anche nello sviluppo della tolleranza immunitaria²⁸.

Associazione sulle molecole di classe II: gli antigeni captati tramite la macropinocitosi, l'endocitosi mediata dal recettore e la fagocitosi sono presentati in associazione alle molecole di classe II del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC II). Le DC, a differenza dei macrofagi, possiedono moltissime molecole di classe II. Queste molecole si trovano all'interno di compartimenti specializzati noti col nome di MIICs (compartimenti ricchi di molecole MHC di classe II). I compartimenti MIIC sono ex strutture endosomiche di forma multilamellare e multivescicolare²⁹⁻³⁰ all'interno delle quali sono contenute le molecole HLA-DM che hanno la funzione di promuovere il legame del peptide alle molecole MHC di classe II.

Dopo la captazione dell'antigene e la sua degradazione nell'endosoma, i peptidi così generati sono trasportati nei compartimenti MIIC. In seguito alla formazione del complesso MHC-peptide, gli MIIC si convertono in vescicole non-lisosomiali che scaricano il loro contenuto sulla superficie cellulare. Nelle DC immature le molecole di classe II sono rapidamente internalizzate e degradate, e in seguito ad uno stimolo infiammatorio-maturativo si ha un aumento della sintesi e della traslocazione in superficie dei complessi MHC-peptide, dove rimangono stabili per diversi giorni e quindi disponibili per il riconoscimento da parte dei linfociti T CD4+³¹⁻³⁴. I diversi recettori di superficie usati dalle DC per catturare gli antigeni e le sottili differenze nei tagli proteolitici, possono determinare la natura dei peptidi immunodominanti presentati dalle molecole di classe II³⁵. Queste differenze nella processazione antigenica permettono il reclutamento di linfociti T CD4+ con diversa specificità del TCR espandendo così la risposta immunitaria.

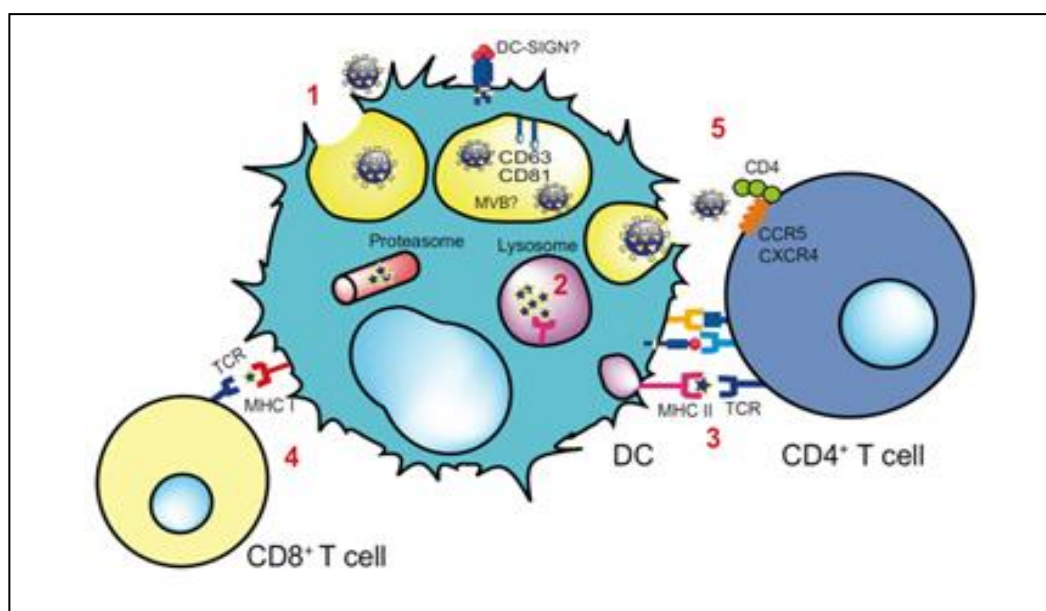


Fig.1. Funzione delle DC (I): processazione dell'Ag.

1.4.3. Presentazione dell'antigene

Le DC hanno la capacità unica di stimolare i linfociti T CD4+ vergini (naive) sia in vitro che in vivo. Quando si iniettano nei topi DC precedentemente esposte ad un antigene si ha una forte risposta dei linfociti T Ag-specifici³⁶.

Le DC sono importanti anche nella stimolazione dei linfociti T CD8+. In vitro le DC possono stimolare la proliferazione di linfociti T CD8+ allogenici³⁷ in modo diretto senza l'aiuto dei linfociti T helper³⁸⁻³⁹, anche se spesso necessitano del loro aiuto.

La presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche ai linfociti T avviene attraverso il riconoscimento dell'antigene stesso associato alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità. Si ha un' interazione tra il recettore delle cellule T (TCR) ed il complesso MHC-peptide. Questa interazione costituisce il primo segnale. L'associazione DC-linfocita T è mediata da diverse molecole di adesione quali le integrine $\beta 1$ e $\beta 2$ ed i membri della superfamiglia delle immunoglobuline (CD2, CD50, CD54 e CD58)⁴⁰⁻⁴¹. Per sostenere l'attivazione dei linfociti T è necessario quindi un secondo segnale fornito dall'interazione tra le molecole costimolatorie presenti sulle cellule dendritiche (CD40, CD80, CD86) ed i loro ligandi espressi sui linfociti T. Infine esiste un terzo segnale, fornito dalle citochine, che determina il tipo di risposta dei linfociti T (es. Th1 o Th2 o Treg). L'insieme di questi tre segnali fa sì che si abbia una completa risposta immunitaria da parte dei linfociti T.

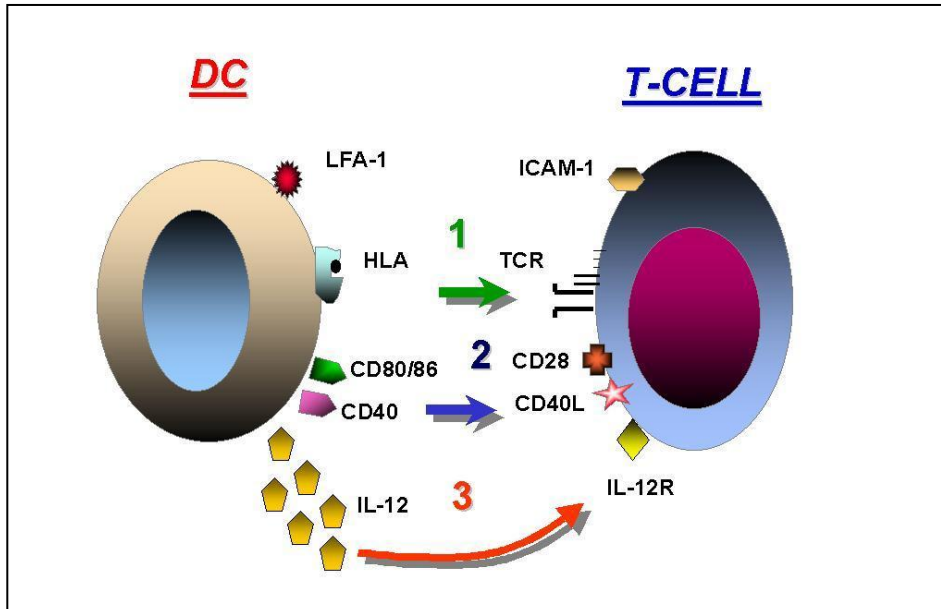


Fig.2: funzione delle DC (II): presentazione dell'antigene

1.5. RUOLO CLINICO DELLE CELLULE DENDRITICHE

Dato il loro ruolo nel controllo dell'immunità, le DC sono oggetto di interesse in molte situazioni cliniche nelle quali sono coinvolti i linfociti T: trapianti, allergie, malattie autoimmuni, immunodeficienza, vaccinazioni e protezione verso infezioni e tumori. Nelle malattie autoimmuni come la psoriasi e l'artrite reumatoide si è osservato un aumento del numero e del grado di attivazione delle DC. Le DC presenti nel polmone sembrano avere un ruolo importante nello sviluppo dell'asma allergica. Nel trapianto e nell'allergia da contatto le DC si sono rivelate importanti nell'induzione sia dell'immunità che della tolleranza. In questa tesi prenderemo in considerazione il ruolo delle

cellule dendritiche nella malattia del trapianto contro l'ospite (graft-versus-host-disease o GVHD).

1.6. GVHD

La GVHD è la principale causa di morbidità e mortalità dopo trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche. La GVHD è causata dai linfociti T maturi del donatore che sono infusi nel ricevente insieme alle cellule staminali. I linfociti T riconoscono antigeni di istocompatibilità espressi dalle cellule del ricevente. I linfociti T sono quindi necessari allo sviluppo di GVHD, come dimostrato dal fatto che la loro eliminazione selettiva dall'infuso di cellule staminali si associa a marcata riduzione dell'incidenza di GVHD.

Nelle risposte alloimmunitarie (ad es. alloantigeni), che sono alla base della GVHD, sono conosciute due possibili vie di presentazione degli antigeni di istocompatibilità del ricevente ai linfociti T del donatore: i linfociti T possono vedere gli antigeni direttamente sulla superficie delle APC del ricevente (via diretta) oppure possono vedere gli stessi antigeni dopo che sono stati processati dalle APC del donatore (via indiretta). Se nelle risposte ad antigeni maggiori di istocompatibilità la via diretta potrebbe essere più rilevante, non vi sono ragioni teoriche o sperimentali per ritenere che nelle risposte ad antigeni minori di istocompatibilità essa prevalga su quella indiretta. Secondo questo schema, sia le APC del ricevente che quelle del donatore contenute nel

graft (il prodotto che contiene le cellule staminali), potrebbero egualmente contribuire allo sviluppo di GVHD.

Il ruolo delle APC nell'innescare della GVHD acuta è stato postulato da Ferrara et al. nel 1991⁴². Secondo il modello patogenetico di Ferrara (Fig.3), la GVHD origina dalla successione di tre fasi: la fase del danno tissutale (1) indotto dalla terapia di condizionamento; la fase afferente (2) o di presentazione dell'antigene; e la fase efferente (3) durante le quali le cellule effettrici determinano ulteriore danno tissutale. Le APC hanno un ruolo essenziale nella fase di presentazione dell'antigene. Il danno tissutale che si determina durante la fase 1 induce attivazione delle APC mediata da citochine infiammatorie, come il Tumor Necrosis Factor- α (TNF α), e da molecole di origine patogena, come il lipopolisaccaride (LPS).

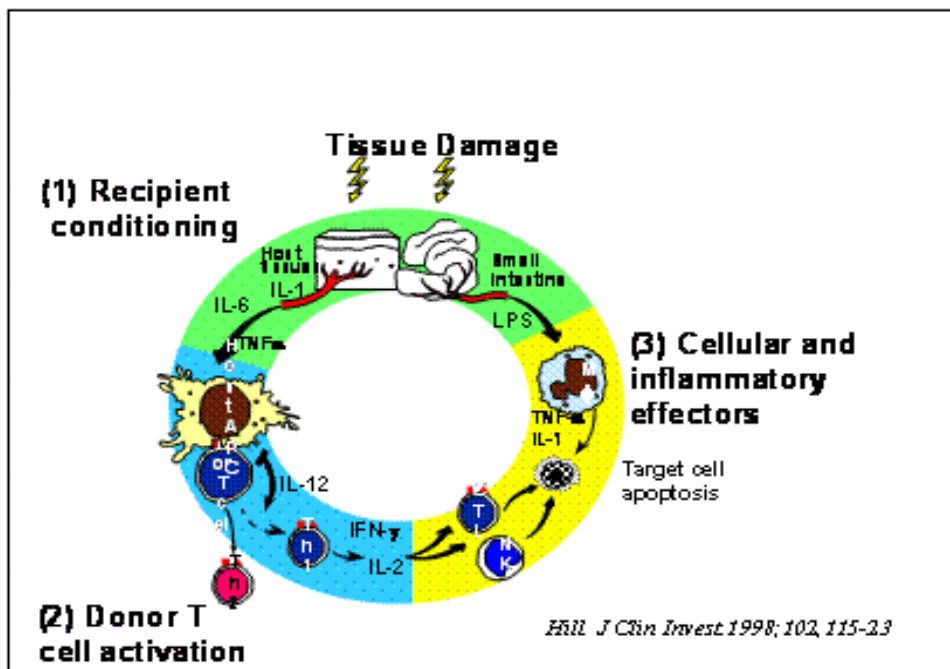


Figura 3: patogenesi della GVHD acuta.

Il ruolo delle APC del ricevente e del donatore nella GVHD acuta è stato definito in studi eseguiti a partire dal 1999 in modelli murini di GVHD acuta. Questi studi hanno dimostrato formalmente che lo sviluppo di GVHD acuta è mediato dalle APC del ricevente che sopravvivono alla terapia di condizionamento. L'eliminazione delle APC del ricevente prima del trapianto previene la GVHD acuta indipendentemente dal tipo di differenza antigenica⁴³⁻⁴⁴ (maggiore o minore) e dal tipo di linfocita T responsabile della risposta⁴⁵ (CD4 o CD8).

Le APC del donatore possono contribuire allo sviluppo di GVHD acuta in assenza di APC del ricevente⁴⁶ e in alcuni modelli promuovono il mantenersi e l'espandersi della GVHD acuta, una volta che questa è stata innescata dalle APC del ricevente⁴⁵.

Molto poco si sa invece del ruolo delle APC nella GVHD cronica, soprattutto alla luce della mancanza di adeguati modelli murini. Uno studio recente⁴⁷ suggerisce che i linfociti T che causano GVHD acuta hanno bisogno di riconoscere gli antigeni di istocompatibilità sulla superficie delle APC del donatore per potere propagare la GVHD dopo 20-30 giorni dal trapianto (un tempo compatibile, almeno nel topo, con la definizione di GVHD cronica).

Anche se le APC includono numerose popolazioni cellulari, evidenze sperimentale suggeriscono che le cellule dendritiche e i monociti, capaci di differenziare a dendritiche, sono i soli in grado di attivare i linfociti T naive. Poiché si ritiene che la GVHD sia mediata da linfociti T naive, è possibile ipotizzare che le cellule dendritiche e i monociti siano

le popolazioni di APC responsabili della GVHD, anche se questo non è mai stato formalmente dimostrato.

1.7. LA VIA DI SEGNALE PI3K/Akt/mTOR

La via di segnale fosfatidilinositolo 3-kinasi (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) è una via cruciale in molti processi fisiologici, quali la progressione del ciclo cellulare, la trascrizione, la traduzione, il differenziamento, l'apoptosi, la motilità e il metabolismo cellulare⁴⁸. Infatti, questa via rappresenta una delle vie molecolari principali coinvolte nella sopravvivenza cellulare, che viene deregolata in molte neoplasie maligne e che può contribuire, se alterata, sia alla patogenesi tumorale che all'induzione della resistenza alle terapie. (Fig.4).

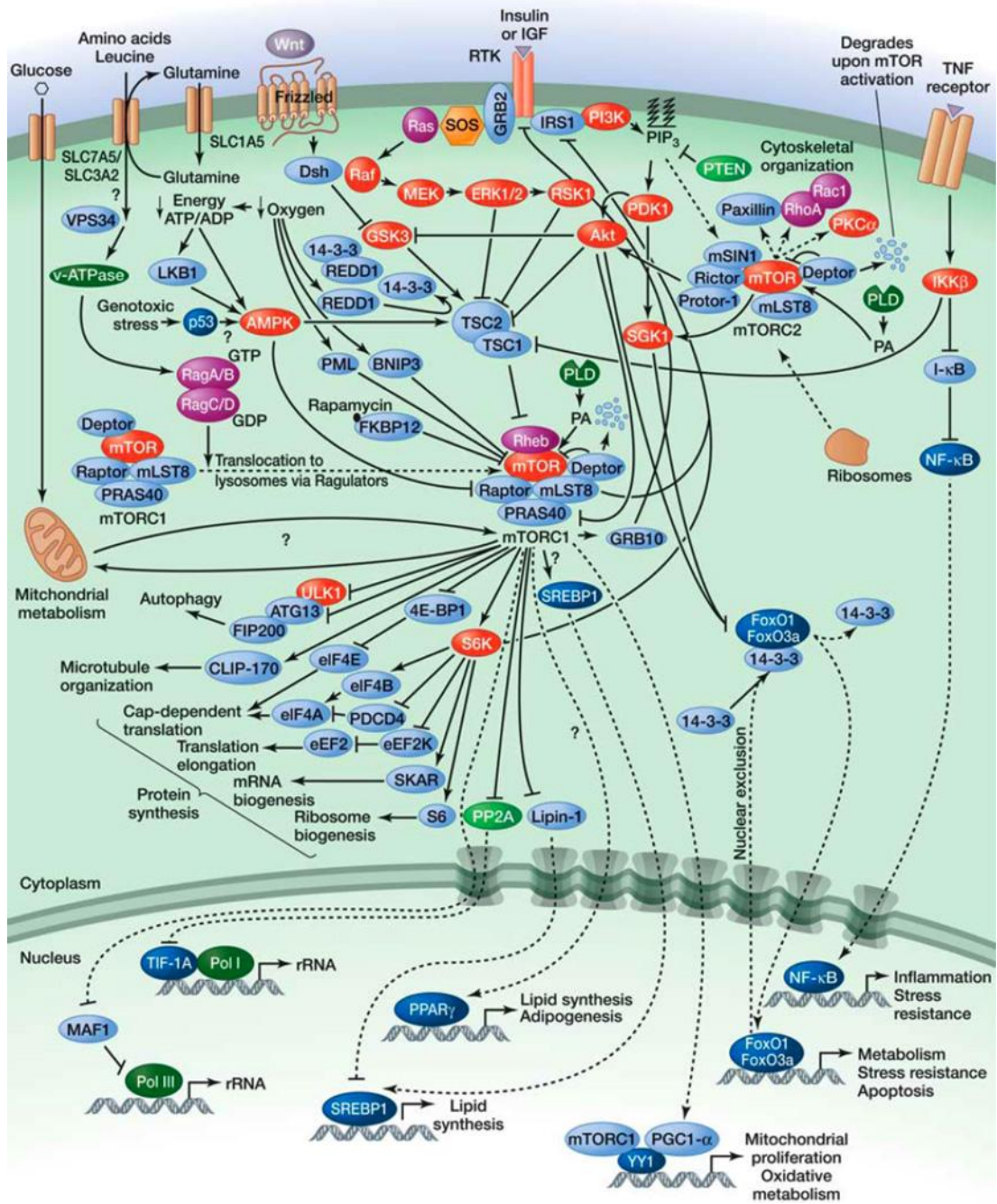


Fig. 4. Via di segnale PI3K/Akt/mTOR

1.7.1. PI3K

La famiglia degli enzimi PI3K è caratterizzata dalla capacità di fosforilare il gruppo -OH nel lipide inositolo. Comprende tre differenti classi: I, II, III; ciascuna classe presenta caratteristiche diverse sia nella struttura molecolare che nella specificità di substrato. Le PI3-kinasi di classe I sono state maggiormente studiate⁴⁹ in quanto collegate agli stimoli extracellulari, come i fattori di crescita e le citochine. In seguito al legame attraverso il recettore di membrana, le PI3K di classe I fosforilano il substrato fosfatidil-inositolo 4,5 bifosfato [PtdIns (4,5)P₂] a fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato [PtdIns (3,4,5)P₃]⁵⁰. PtdIns (3,4,5)P₃ recluta sulla membrana citoplasmatica proteine contenenti il dominio PH (pleckstrin homology), tra le quali la proteina chinasi fosfoinositide dipendente (PDK1) e Akt. Le PI3K di classe I sono ulteriormente suddivise in due sottotipi: A, tirosin chinasi attivate dal recettore (RTK), Ras e dai recettori accoppiati alle proteine G (GPCR) e B, chinasi attivate da GPCR. Le PI3K di classe IA sono enzimi eterodimerici composti da una subunità regolatoria (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ , p50 α) e una subunità catalitica (p110 α , p110 β , p110 δ). Le chinasi PI3K di classe IB hanno la subunità regolatoria p101 e la subunità catalitica p110 γ . Entrambe le subunità p110 α e p110 β svolgono un ruolo fondamentale durante lo sviluppo embrionale; invece le subunità p110 γ e p110 δ sono principalmente coinvolte nelle funzioni del sistema immunitario⁵¹. Le PI3K chinasi di classe II fosforilano preferenzialmente il fosfatidil-inositolo 3 fosfato, e sono espresse negli organi e nei tessuti dei mammiferi⁵². L'unica chinasi di classe III è

vps34⁵³ (vacuolar protein sorting 34) ed esiste come eterodimero. E' coinvolta nel nutrimento, nell'endocitosi e nell'autofagia.

1.7.2. Akt

Akt è una proteina serina/treonina chinasi di 57-kDa⁵⁴. La famiglia comprende tre isoforme altamente conservate⁵⁰ ma con differenze funzionali: Akt1/ α , Akt2/ β e Akt/ γ . Akt contiene un dominio PH (pleckstrin homology) con il quale interagisce con i prodotti lipidici fosforilati di PI3K, principalmente con il PIP₃, sintetizzati a livello della membrana. Il legame di Akt con il PIP₃ induce un cambiamento conformazionale di Akt che ne permette l'attivazione in seguito alla fosforilazione del residuo Thr308, da parte della protein-chinasi fosfoinositide dipendente 1 (PDK1), e del residuo Ser473, da parte della chinasi PDK2. La fosforilazione di entrambi questi residui è necessaria per la completa attivazione di Akt; la sua attività è però modulata da una complessa rete di proteine regolatrici che interagiscono con i diversi domini coinvolti nell'attivazione. L'attività di Akt è fondamentale in molti processi cellulari che influenzano la sopravvivenza e il differenziamento cellulare⁵⁴.

1.7.3. mTOR

mTOR (mammalian target of rapamycin) è una chinasi serina-treonina atipica di 289kDa, della famiglia delle chinasi correlate alle PI3K, altamente conservata che mostra un dominio catalitico COOH-terminale con un'alta omologia di sequenza con PI3K⁵⁴; questa omologia spiega il

perché si ha una cross-inibizione di mTOR da parte di farmaci diretti verso PI3K⁵⁵. mTOR gioca un ruolo centrale nella regolazione della crescita e della proliferazione cellulare, a livello traduzionale, e nella progressione del ciclo cellulare.

È costituito da due complessi multiproteici, mTORC1⁵⁶ (mTOR/raptor/mLST8/PRAS40/FKBP38) sensibile alla rapamicina e mTORC2 (mTOR/riCTOR/mLST8/SIN1/proctor) insensibile alla rapamicina se non in seguito a trattamento prolungato⁵⁷. (Fig.5) mTORC1 è un effettore a valle di Akt e la sua attività è controllata da una rete di segnali che include Ras/Raf/MEK/ERK e una cascata di segnale LKB/ AMPK. mTORC1 è caratterizzato dall'interazione tra mTOR e le sue proteine regolatorie associate, che ne regolano la funzione creando come un'impalcatura per reclutare i substrati di mTORC1. Questa subunità è sensibile alla rapamicina e ai suoi analoghi (rapalogs). La rapamicina e i suoi analoghi sono inibitori allosterici di mTORC1; non si legano al dominio catalitico ma si associano a FKBP-12 portando al disassemblaggio del complesso mTORC1, inducendo l'inibizione della sua attività. Quindi mTORC1 controlla la traduzione in risposta a fattori di crescita e nutrienti fosforilando la chinasi p70S6 (p70S6K) e 4E-BP1. A sua volta P70S6K fosforila la proteina ribosomiale p40, S6, che partecipa alla traduzione di mRNA, e fosforila anche eIF4B (eucariotic initiation factor 4B) che è coinvolto nella traduzione. La fosforilazione di 4E-BP1 risulta nel rilascio di eIF4E, che in associazione con eIF4G stimola l'inizio della traduzione. Infatti 4E-BP1 non fosforilato interagisce con il fattore eIF-4E e previene la

formazione del complesso eIF4F, bloccando l'interazione tra eIF-4G e eIF-4E. mTORC1 regola diversi passaggi chiave della sintesi proteica⁵⁶, controllando l'espressione di proteine che promuovono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, come c-Myc, ciclina D1, STAT3, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 etc. Akt regola il complesso mTORC1 fosforilando e inibendo il gene TSC-2 (tuberous sclerosis 2), che è una proteina GAP (GTP-ase activating protein) che si lega a TSC-1 (tuberin) formando un complesso e bloccando la proteina G Rheb. L'inibizione di TSC-2 permette alla proteina Rheb di accumularsi in uno stato legato a GTP e di attivare mTORC1.

Il meccanismo che controlla mTORC2 non è ancora ben noto; l'attivazione di questo complesso è comunque collegata alla via di segnale PI3K. mTORC2 fosforila Akt sulla Ser473, studi recenti hanno dimostrato che la subunità mTORC2 diventa sensibile alla rapamicina dopo un trattamento prolungato⁵⁷.

Akt e mTOR sono regolati tra loro da circuiti a feedback sia positivi che negativi, che ne permettono una corretta attivazione. Se Akt attiva mTORC1, quest'ultimo a sua volta regola Akt inibendolo, attraverso un meccanismo di controllo negativo; infatti se mTORC1 viene inibito si ha un'iperattivazione di Akt e dei suoi substrati, sia in vivo che in vitro⁵⁸.

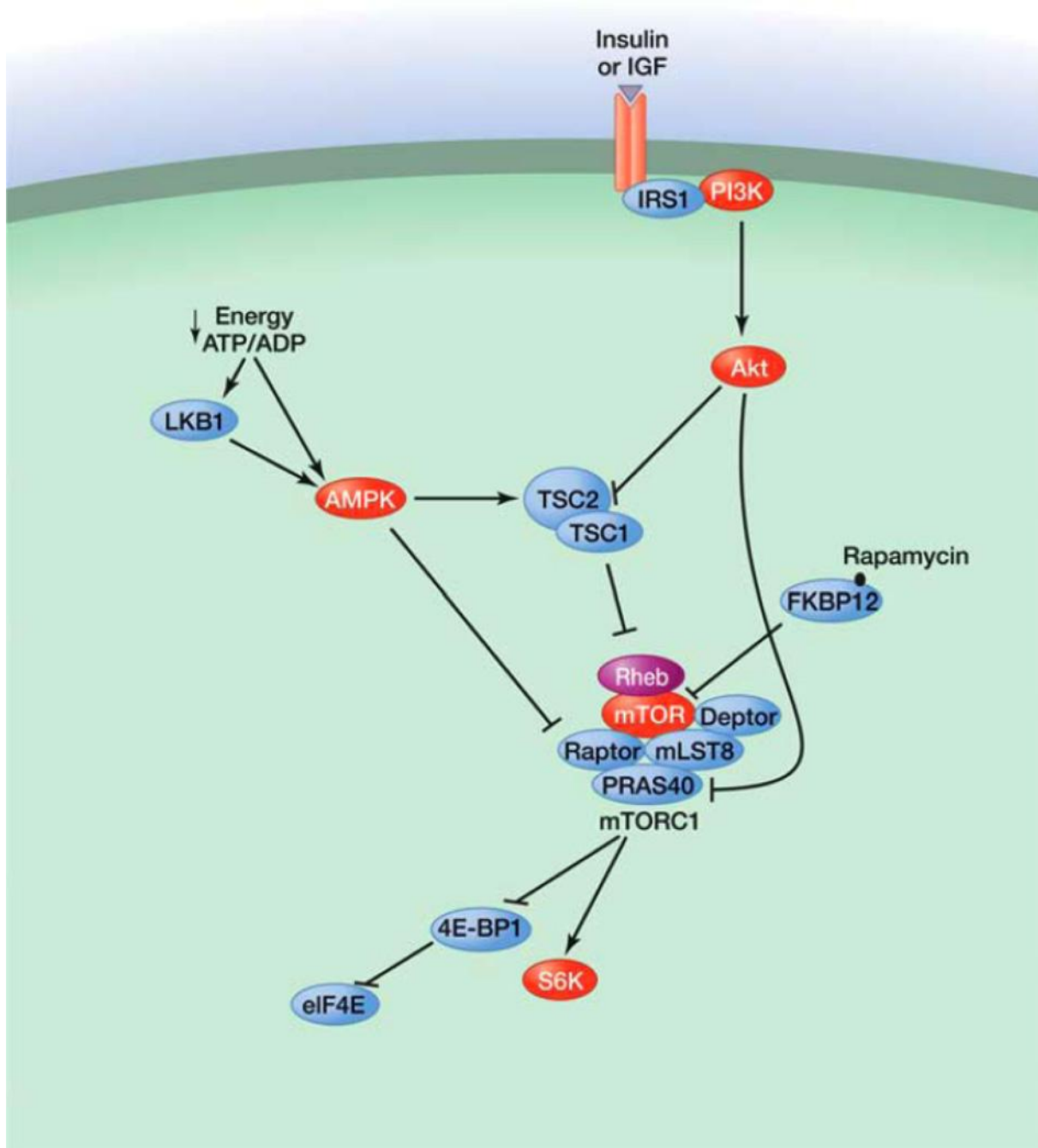


Fig.5. complesso di mTOR nel dettaglio

1.8. FARMACI IMMUNOSOPPRESSORI

L'effetto dei farmaci immunosoppressori sulle cellule effettrici ed accessorie del sistema immunitario non è completamente noto. Spesso l'interesse dei ricercatori è rivolto all'individuazione dell'azione specifica dei diversi trattamenti sui linfociti T, sulle cellule dendritiche e sullo scambio di informazioni bidirezionale fra DC e linfociti T, allo scopo di trovare il meccanismo che consenta di bloccare completamente l'attivazione del sistema immunitario.

Nelle malattie immunologiche i linfociti T agiscono come effettori del danno tissutale, proprio per questo motivo sono considerati importanti bersagli degli agenti immunosoppressori⁵⁹. Le cellule dendritiche e i monociti sono però responsabili della risposta primaria Ag-specifica dei linfociti T e quindi sono il secondo bersaglio preso in considerazione. Eliminare selettivamente o alterare la funzione delle APC, durante la fase di condizionamento, resta infatti l'obiettivo principale per ridurre il rischio di GVHD acuta. Ad oggi però non ci sono dei farmaci diretti verso queste cellule; la maggior parte dei farmaci comunemente usati in clinica quali ad es. anticorpi monoclonali (Campath)⁶⁰ o policlonali (ATG)⁶¹ o nuovi farmaci citotossici (Bortezomib) o immunosoppressivi (Prednisone) pur se promettenti hanno mostrato effetti pleiotropici che hanno portato ad una aumentata soppressione immunitaria con un aumento del rischio di infezione. Agire attraverso il blocco della via di segnale PI3K/Akt/mTOR fondamentale per la crescita cellulare e la proliferazione, potrebbe essere la strategia giusta. Esistono infatti diversi farmaci capaci di alterare questa via di segnale che sono

utilizzati per curare neoplasie solide o nel trattamento di alcuni tipi di leucemie che agiscono in maniera mirata su quei meccanismi che sono alla base della trasformazione neoplastica, ma che sono anche alla base di tutti i processi di proliferazione cellulare e apoptosi.

Per lo studio degli effetti dei farmaci immunosoppressori sulle APC in vitro, possono essere utilizzate DC ottenute a partire da monociti coltivati in un terreno di coltura adeguato e in presenza di differenti stimoli proliferativi. Monociti coltivati in presenza del GM-CSF da solo mostrano un differenziamento simil- macrofagico, le cellule che si ottengono sono in grado di captare e presentare l'antigene⁶². Monociti coltivati in presenza di GM-CSF e IL-4 differenziano a cellule dendritiche immature CD14- che possono essere indotte alla maturazione e che inducono una risposta Th1³, in presenza di GM-CSF e INF- α si ottengono cellule dendritiche più mature ma in grado di maturare ulteriormente inducendo una risposta Th1⁴. Altre citochine , quali ad esempio l'IL-13, l'IL-15, l'IL-3 etc in aggiunta al GM-CSF, possono indurre il differenziamento dei monociti ad APC⁵.

1.8.1. La rapamicina

La rapamicina è un macrolide che deriva dall'actinomicete "*Streptomyces hygroscopicus*" isolato nell'Isola di Pasqua (Rapanui) da cui proviene il nome. La rapamicina è una molecola con attività antifungina e antitumorale e con proprietà immunosoppressive⁶³. Oggi viene utilizzata principalmente nella profilassi del trapianto di organi solidi, per prevenire il rigetto⁶⁴. La rapamicina agisce legandosi

all'FKBP12, che è una isoforma dell FK-506 BP, e interagendo con il complesso proteico mTOR, bloccandone le sue funzioni⁶⁵. La rapamicina si lega specificamente alla subunità mTORC1 inibendone la fosforilazione. Anche se inizialmente sono stati studiati solo gli effetti immunosoppressivi sull'attività dei linfociti T e B, con alterata produzione di citochine infiammatorie e inibizione della proliferazione cellulare, diversi lavori scientifici⁶⁶⁻⁶⁹ ne hanno dimostrato la capacità ad eliminare o alterare la funzione delle DC. mTOR è infatti una chinasi critica nel meccanismo di sopravvivenza delle cellule dendritiche derivate da monociti e il suo blocco inibisce diverse funzioni delle DC. Nel 2003 Woltman⁶⁶ afferma che, in vitro, la rapamicina induce apoptosi nelle cellule dendritiche originate da monociti o CD34 attraverso l'up-regolazione di p27 e mcl-1. Inoltre è stato dimostrato che la rapamicina inibisce la macropinocitosi e l'endocitosi mediata dal recettore e che gli effetti sono indipendenti dalla maturazione delle cellule dendritiche e dall'apoptosi cellulare⁶⁸. Questi dati hanno portato a considerare la rapamicina un potenziale farmaco candidato per l'eliminazione delle APC prima del trapianto allogenico.

1.8.2. La perifosina

La perifosina è un farmaco sintetico che appartiene alla classe degli alchilfosfolipidi; è un analogo dei fosfolipidi di membrana. La perifosina agisce in maniera dose-dipendente su Akt, inibendone la fosforilazione; si lega al dominio PH di Akt, impedendo al PIP₃ di interagire e di ancorare Akt alla membrana cellulare⁷⁰. Recentemente è stato dimostrato che la perifosina agisce sull'attività sia del complesso

mTORC1 che del complesso mTORC2 deregolando il livello di mTOR, raptor, rictor, p70S6K e 4E-BP1, e incrementandone la loro degradazione⁷¹. La perifosina inoltre, è stata già testata in diversi studi clinici di fase I e fase III e non risulta tossica⁷²⁻⁷³ Questi dati rendono la perifosina molto interessante per il ruolo che potrebbe svolgere contro le APC, in vivo, nella fase di condizionamento prima del trapianto.

2. OBIETTIVO DEL PROGETTO DI RICERCA

Il trapianto allogenico di cellule staminali, spesso è l'unica soluzione esistente per la cura di diverse malattie ematologiche; la GVHD, è la più grave complicazione che si può avere a seguito del trapianto allogenico e riduce la qualità e la durata della vita dei pazienti dopo il trapianto. La GVHD è causata dai linfociti T del donatore che riconoscono gli antigeni presentati dalle APC del ricevente. Le APC hanno quindi un ruolo fondamentale nell'innescare la GVHD. Le più importanti APC sono le cellule dendritiche. Ad oggi non esistono dei farmaci diretti in modo specifico contro le APC ma si conoscono i meccanismi molecolari che regolano le funzioni cellulari fondamentali; la via di PI3K-Akt-mTOR, in particolare, è cruciale alla sopravvivenza e al differenziamento delle cellule dendritiche. L'obiettivo di questo studio, quindi, è stato quello di analizzare gli effetti del blocco della via di PI3K, da parte di farmaci sperimentali, sul differenziamento, sulla maturazione e sulla funzione di varie sottopopolazioni di DC. I farmaci valutati sono stati la rapamicina, che provoca il blocco di mTOR, e la perifosina, un inibitore di Akt. Per fare questo è stato utilizzato un sistema sperimentale che prevede la generazione delle APC, a partire da monociti coltivati in vitro con differenti fattori di crescita o dai precursori circolanti delle DC; il fenotipo e la funzioni di queste cellule sono stati studiati in vitro mediante analisi citofluorimetriche. Il sistema utilizzato, facilmente riproducibile e confrontabile, potrà essere utilizzato come una piattaforma metodologica di partenza per testare nuovi farmaci in fase

sperimentale che presenteranno buone potenzialità nell'azione diretta contro le APC circolanti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Reagenti

La rapamicina (Sigma) è stata utilizzata alla concentrazione di 10 ng/ml. L' LY294002 (Sigma) è stato usato alla concentrazione di 50 μ M. La perifosina (Selleck Chemicals) è stata usata alla concentrazione di 2,5-5 μ M. Tutte le molecole utilizzate sono state dissolte in DMSO e conservate a -80°C.

I fattori di crescita, le citochine e gli stimoli utilizzati per le colture cellulari sono stati: GM-CSF (Mielogen, Schering Plug) usato alla concentrazione di 1000U/ml; IL-4 (R&D System) e IFN- α (Roche) utilizzati alle concentrazioni 800U/ml e 1000U/ml rispettivamente; IL-3 (Biodesign International) usata alla concentrazione di 100 ng/ml; LPS (Sigma) e IFN- γ (Pierce Endogen) usati alle concentrazioni 1 μ g/ml e 1000U/ml rispettivamente; CpG (HBT) usato alla concentrazione di 2 μ M. Tutti questi reagenti sono stati risospesi in PBS.

La Brefeldina A (Sigma) è stata utilizzata alla concentrazione di 10 μ g/ml.

3.2. Separazione cellulare

Le cellule mononucleate (MNC) sono state prelevate da buffy coat ottenuti da donatori sani, forniti dal centro trasfusionale dell'ospedale S. Orsola-Malpighi di Bologna. Le MNC sono state separate mediante centrifugazione su gradiente di densità generato con Ficoll-Lympholyte-H (Cederlane). I monociti, i linfociti, le cellule dendritiche plasmacitoidi e mieloidi circolanti sono stati isolati attraverso una selezione

immunomagnetica effettuata utilizzando anticorpi specifici (anti-CD14 per separare i monociti, anti-CD3 per i linfociti, anti-BDCA-1 e anti-BDCA-4 per le mDC e le pDC rispettivamente (Miltenyi)) coniugati a biglie magnetiche. La separazione, come da protocollo fornito dalla ditta di produzione, prevede la marcatura delle cellule MNC con le biglie coniugate all'anticorpo di interesse, per 15 min a 4°C e poi il successivo passaggio della frazione cellulare attraverso delle colonne, posizionate in un magnete midi MACS, per la selezione positiva delle cellule. La purezza della separazione, determinata in citofluorimetria, è sempre stata superiore al 95%.

3.3. Colture cellulari

I monociti purificati sono stati coltivati in terreno completo e risospesi alla concentrazione di 10^6 cell/ml di terreno. Il terreno è costituito da RPMI 1640 contenete 25 mM HEPES, 1U/ml di penicillina, 1µg/ml di streptomicina, 100 mM di L-glutamina, 50 µM di 6β-mercaptoetanololo, 1% di amminoacidi non essenziali (tutti Invitrogen) e 10% di siero fetale bovino (FBS), inattivato a 56 °C per 30 minuti. I monociti sono stati differenziati ad APC in presenza di GM-CSF o di GM-CSF e IL-4 o IFN-α per 6 giorni, a 37°C e al 5% CO₂ , con atmosfera umidificata. Dopo tre giorni di coltura sono stati sostituiti 500 µl di medium con terreno fresco contenete le citochine di cui sopra. La rapamicina o la perifosina sono state aggiunte all'inizio della coltura alla concentrazione di 10 ng/ml e 5µM rispettivamente; dopo 6 giorni dalla piastratura le cellule sono state raccolte e utilizzate per lo studio dell'apoptosi e del

fenotipo (DC immature). Per lo studio della funzione le cellule sono state ripiastrate per 18 ore in presenza di LPS e IFN- γ , alle concentrazioni indicate precedentemente. La conta delle cellule è stata eseguita con Trypan Blue, sono state contate solo le cellule vive.

Le mDC purificate sono state coltivate in presenza di GM-CSF e IL-4 per 2 giorni e attivate con LPS e IFN- γ ; le pDC sono state coltivate con IL-3 e attivate con CPG.

In alcuni esperimenti le cellule sono state preincubate con l'IFN- α o con l'IFN- γ prima della coltura alle condizioni sopra citate.

3.4. Apoptosi

L'apoptosi è stata determinata in base all'espressione della fosfatidilserina sulla membrana e alla permeabilità a coloranti vitali (Propidio Ioduro). E' stato utilizzato un kit commerciale della Roche secondo le istruzioni del produttore. Le cellule raccolte sono state prima lavate due volte con PBS quindi incubate con un tampone contenente Annexina V FITC per 10 minuti al buio ed infine risospese in un secondo tampone contenente PI. L'acquisizione al citofluorimetro è stata eseguita entro 20 minuti. Le cellule Annexina V negative sono state considerate cellule vitali. Le cellule Annexina V positive e PI negative sono state considerate in apoptosi precoce, le cellule doppio marcate Annexina V positive-PI positive sono state considerate in apoptosi tardiva, entrambi i tipi sono stati considerati nella popolazione delle cellule apoptotiche. L'acquisizione e l'analisi sono

state eseguite su FACSCantoII usando il software FACSDiva (Becton Dickinson).

3.5. Fenotipo delle APC

Per studiare l'espressione di molecole di superficie sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali, tutti acquistati dalla BD: anti-CD1a, anti-CD14, anti-CD80, anti-CD86, e anti-HLA-DR con i rispettivi controlli isotipici. Per il processo di marcatura sono state utilizzate 10^6 cellule per condizione incubate con 10 μ l degli appropriati anticorpi monoclonali per 15 minuti al buio, dopo 2 lavaggi con PBS le cellule sono state direttamente acquisite su FACSCantoII.

3.6. Produzione di citochine infiammatorie

La produzione di citochine infiammatorie è stata valutata dopo la stimolazione delle diverse sottopopolazioni di APC con gli adeguati stimoli. Sono state valutate la produzione di TNF- α , IL-12 e IFN- α , mediante una marcatura con anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi e successiva analisi citofluorimetrica. Le cellule (2×10^5) sono state coltivate in terreno completo con gli stimoli, per 18 h, in piastre da 96 pozzetti a fondo conico. Per inibire la secrezione di citochine, è stata aggiunta la Brefeldina A insieme agli stimoli. Al termine del tempo di incubazione le cellule sono state raccolte, fissate e successivamente permeabilizzate con il kit FIX&PERM della Caltag, seguendo il protocollo fornito dal produttore. Gli anticorpi utilizzati per la marcatura sono stati: anti Human TNF- α PE (BD), anti human IL-

12 PE (R&D); anti human IFN- α PE (BD) e IgG1 PE come controllo isotipico (BD). I campioni sono stati analizzati con il citofluorimetro.

3.7. Analisi della capacità allostimolatoria delle APC

Per studiare la capacità delle APC, coltivate nelle diverse condizioni in presenza o meno del farmaco di interesse, è stata effettuata una coltura mista (MLR) tra le APC e dei linfociti T CD3+ allogenic. Le APC sono state coltivate nelle specifiche condizioni colturali in presenza o meno del farmaco di interesse per 6 giorni, maturate a dendritiche mature con gli adeguati stimoli, successivamente irradiate (3000 CGy CS137) e aggiunte in rapporto 1:10 con cellule T allogeniche purificate, in piastre da 96 pozzetti. Dopo 4 giorni di MLR è stata misurata la proliferazione dei linfociti T utilizzando il kit della bromodeossiuridina (BrdU Flow Kit BD Pharmingen). Le cellule dendritiche sono state marcate con la soluzione di BrdU e incubate a temperatura ambiente per 45 minuti; successivamente le cellule sono state fissate e permeabilizzate e trattate con DNasi per 1 ora a 37°C per l'esposizione della BrdU incorporata. Infine è stata fatta una marcatura di superficie con l'anti-BrdU fluorescente e la 7-AAD. Le cellule sono state analizzate al citofluorimetro.

4. RISULTATI

4.1. EFFETTI DELLA RAPAMICINA

Al fine di valutare gli effetti della rapamicina sul differenziamento e la maturazione delle DC, queste ultime sono state generate da monociti come descritto in letteratura⁵. Inizialmente sono stati testati differenti fattori di crescita quali GM-CSF, IL-4, IFN- α , IL-13, IL-15, così da ottenere differenti popolazioni di APC; infatti, a seconda delle condizioni colturali utilizzate si possono ottenere, in vitro, DC con caratteristiche fenotipiche e funzionali diverse⁵. Sulla base dei lavori scientifici presenti in letteratura⁶⁶⁻⁶⁷, i fattori di crescita scelti sono stati GM-CSF, IL-4 e IFN- α perché inducevano i monociti a differenziare a DC immature. I monociti purificati sono stati incubati con GM-CSF con o senza IL-4 o IFN- α in presenza o meno di rapamicina (utilizzata sempre alla concentrazione di 10ng/ml) e sono stati coltivati per 3 e 6 giorni. L'inibizione di mTOR da parte della rapamicina provocava una riduzione del recupero cellulare sia dopo 3 giorni (riduzione del 40% \pm 1,8 p: 0,1) che dopo 6 (riduzione del 57% \pm 20, p:0,006) in presenza di GM-CSF e IL-4. Se i monociti erano coltivati con GM-CSF da solo o con GM-CSF e IFN- α la rapamicina non aveva effetti sul numero delle APC recuperate. (fig.1.)

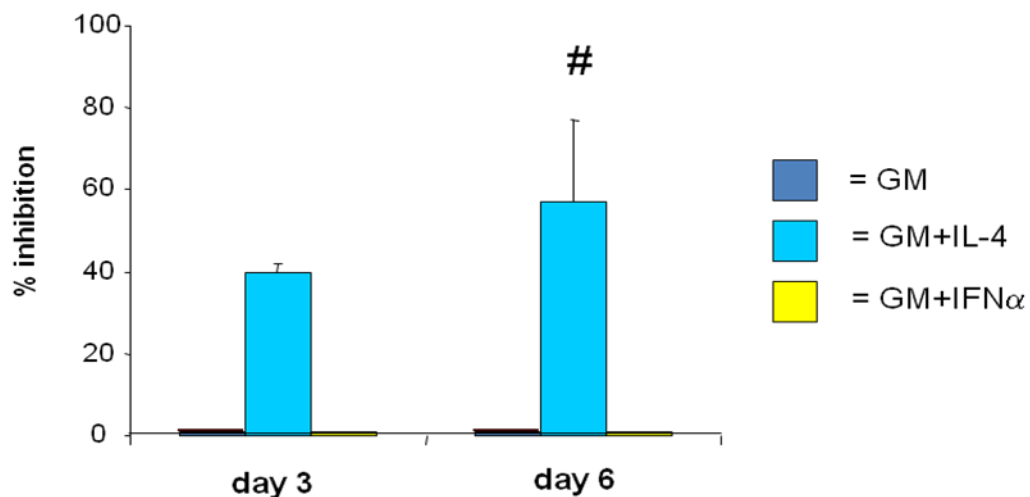


Fig.1: Recupero cellulare. Il recupero cellulare è espresso come % di inibizione rispetto al campione di controllo ed è stato determinato con Trypan Blue. Media di 12 esperimenti. (# p: 0,006).

Per valutare se il ridotto recupero dei monociti indotto dalla rapamicina fosse avvenuto mediante apoptosi, è stata analizzata la morfologia delle cellule raccolte. L'apoptosi è caratterizzata da picnosi nucleare, frammentazione nucleare, frammentazione cellulare e bolle sulla membrana. Le cellule raccolte dopo coltura con rapamicina a 3 e 6 giorni presentavano caratteristiche citologiche compatibili con apoptosi (dati non mostrati). Inoltre è stata analizzata in citofluorimetria la presenza di fosfatidilserina sulla membrana (segno di apoptosi precoce) e l'ingresso del colorante vitale PI nella cellula (segno di apoptosi tardiva). Come mostrato nella figura 2 è stato osservato un aumento significativo della percentuale di cellule in apoptosi precoce (AnnV+ PI-) e in apoptosi tardiva (AnnV+PI+) tra i monociti coltivati con GM-CSF e IL-4 in presenza di rapamicina (65% \pm 13 in media (con rapamicina) vs 40% \pm 20 (cellule di controllo) p= 0.023). L'inibizione di mTOR non aveva effetti valutabili sull'andamento dell'apoptosi nei monociti coltivati con il solo GM-CSF o

con il GM-CSF e IFN- α (fig.2). L'inibizione di mTOR provocava un incremento dell'apoptosi nei monociti coltivati in presenza di IL-4 per almeno 3-4 giorni.

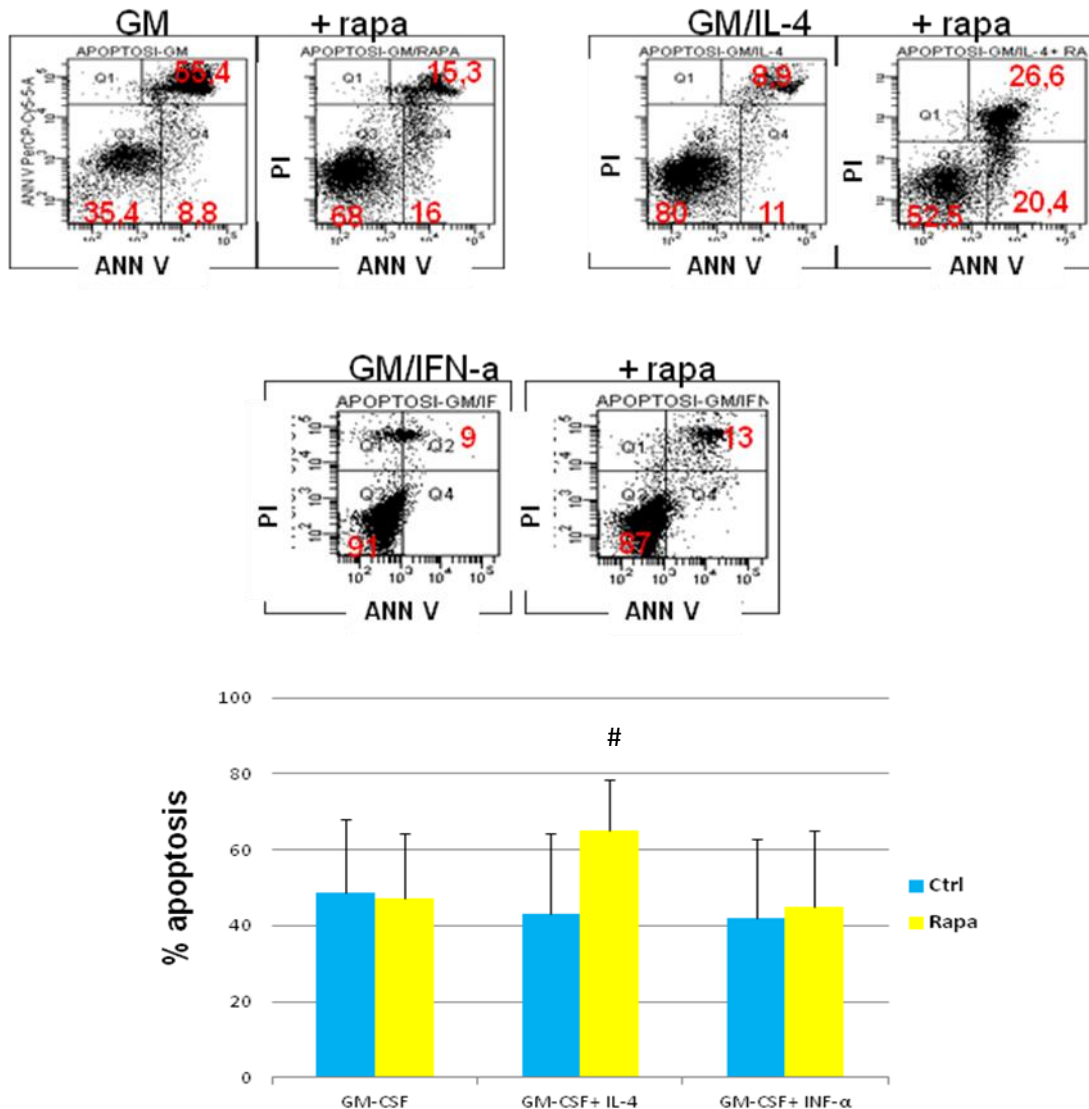


Fig.2. Apoptosi. Nella figura sono riportati nella prima parte i plot di analisi dell'apoptosi al citoflorimetro. Il grafico mette a confronto le cellule di controllo e le cellule con rapamicina, ottenute in condizioni sperimentali diverse dopo 6 giorni di coltura. Legenda: GM: GM-CSF; IL-4: Interleuchine-4, IFN- α : Interferon- α Rapa: rapamicina; ANN V: annexine V. (#= p, 0,023).

Infine, l'inibizione di mTOR non aveva effetti sulla sopravvivenza e sull'apoptosi delle cellule dendritiche mieloidi e plasmacitoidi

circolanti purificate (fig.3). Si osservava una percentuale elevata di cellule in apoptosi tardiva, che però non era riconducibile alla presenza della rapamicina ma solo alla difficoltà tecnica di mantenere la vitalità delle cellule dendritiche circolanti in vitro.

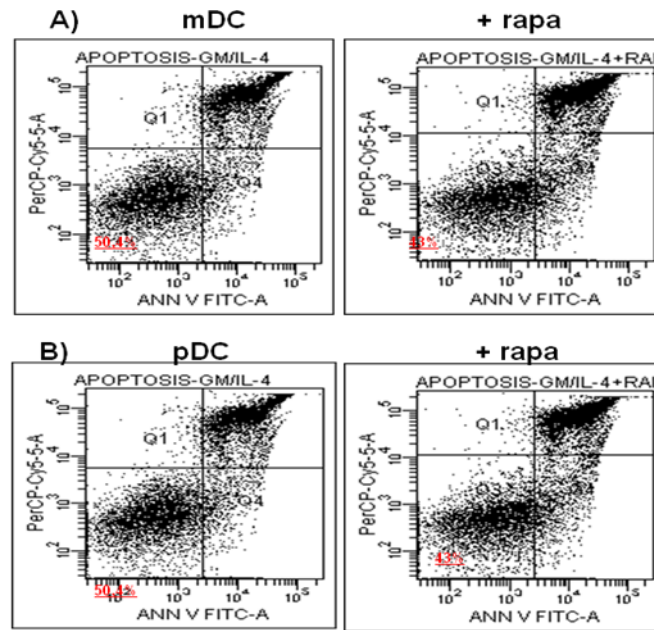


Fig.3 Apoptosi nelle mDC e pDC. Plot di analisi che mostrano le cellule coltivate per 2 giorni in presenza o meno di rapamicina. Le cellule AnnV- PI- sono le cellule vitali.

Successivamente sono stati studiati gli effetti della rapamicina sulla maturazione e sul differenziamento delle APC derivate dai monociti. Le cellule dendritiche immature sono state generate a partire da monociti con il GM-CSF e IL-4 o IFN- α o in presenza del solo GM-CSF per 6 giorni in presenza o assenza di rapamicina, come già descritto; le cellule sono state poi analizzate al citofluorimetro per l'espressione sulla loro superficie di marcatori associati con il differenziamento e la maturazione cellulare (fig 4.).

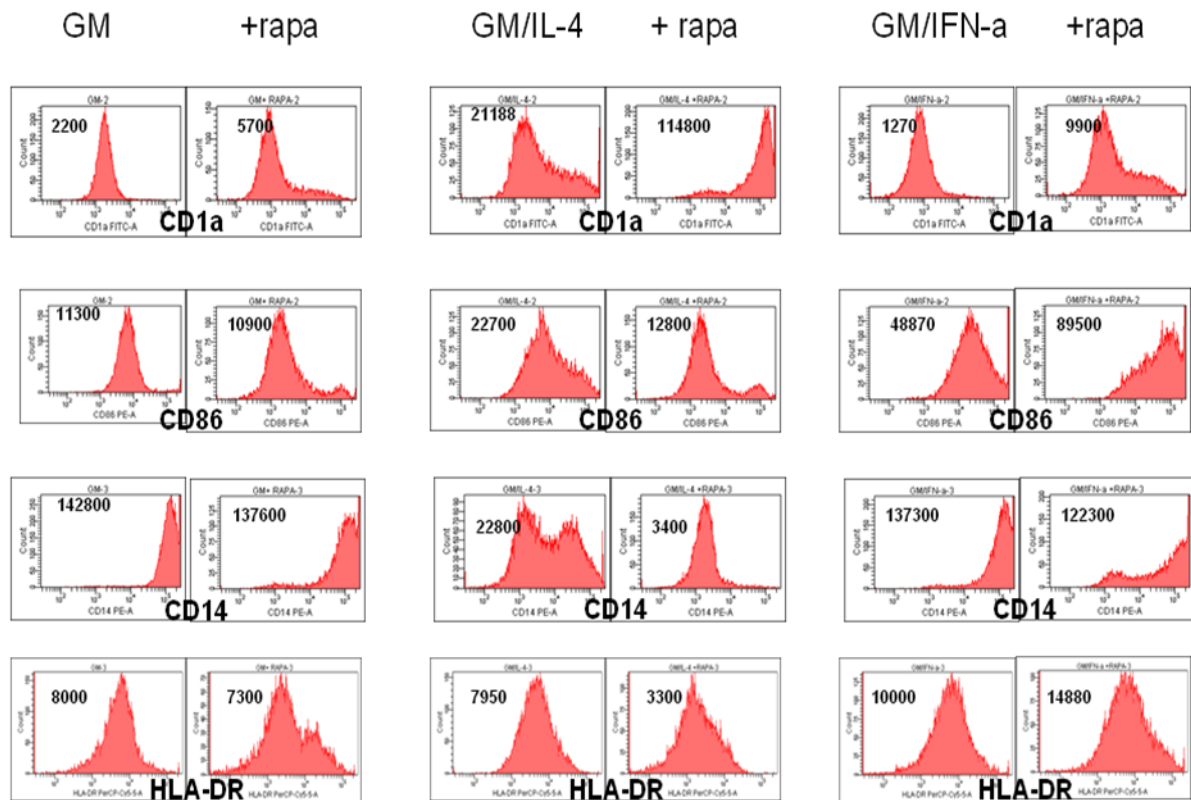


Fig.4. Fenotipo delle APC. Gli istogrammi sono rappresentativi del fenotipo delle cellule dendritiche coltivate in presenza o meno di rapamicina. Il valore riportato sugli istogrammi corrisponde al Mean di intensità di fluorescenza. Legenda: GM: GM-CSF; GM/IL-4: GM-CSF+IL-4; GM/IFN- α : GM-CSF+IFN- α ; rapa:rapamicina.

Per rendere l'analisi più oggettiva possibile è stata calcolata l'intensità media di fluorescenza rispetto al controllo isotipico (MIF). L'analisi del fenotipo evidenzia che i monociti coltivati con il GM-CSF mantenevano un'espressione elevata di CD14. Il CD14 è un marcatore specifico dei monociti che viene perso durante il differenziamento a cellula dendritica. Inoltre la rapamicina non riduceva l'espressione del CD14 (MIF= 80 ± 46 vs 68 ± 60 con rapamicina). Per quanto riguarda invece l'espressione del CD1a, molecola espressa selettivamente dalle cellule dendritiche immature, i valori erano confrontabili con quelli delle cellule di controllo (cellule coltivate alle stesse condizioni ma non trattate con rapamicina). In alcuni esperimenti è stato osservato un piccolo aumento di CD1a con la rapamicina, anche se il CD1a è poco

espresso a conferma del differenziamento monocitico-macrofagico (MIF= 3 ± 1 vs 12 ± 10 con rapamicina). I monociti coltivati con GM-CSF e IL-4 esprimevano il fenotipo tipico delle cellule dendritiche immature. L'espressione del CD14, bassa nelle cellule di controllo, non era alterata dalla presenza della rapamicina nel terreno di coltura (MIF= $2,6 \pm 0,3$ vs 3 ± 2.5 con rapamicina) mentre l'espressione del CD1a, elevata nelle cellule dendritiche immature, veniva incrementata (MIF= 23 ± 17 vs 60 ± 38 con rapamicina). In presenza di IFN- α non si osservava una riduzione dell'espressione del CD14 mentre anche in questo caso c'era un lieve aumento dell'espressione del CD1a ma che comunque restava bassa. Come mostrato nelle figura 2 l'espressione del CD86, molecola di costimolazione, sulle cellule dendritiche derivate da monociti coltivati con GM-CSF e IL-4 diminuiva in presenza di rapamicina rispetto al controllo (MFI= 17 ± 13 vs 9 ± 6 con rapamicina). In presenza del solo GM-CSF o del GM-CSF con IFN- α non è stato osservato un cambiamento significativo dell'espressione del CD86. L'espressione dell'HLA-DR non veniva alterata significativamente in nessuna delle condizioni analizzate. Alla luce di questi dati, si può affermare che l'inibizione di mTOR da parte della rapamicina altera il fenotipo dei monociti coltivati in presenza di IL-4 inducendo una up-regolazione del CD1a e una riduzione del CD86, suggerendo un fenotipo più immaturo, mentre non provoca cambiamenti fenotipici significativi nei monociti coltivati con GM-CSF o con GM-CSF e IFN- α .

E' stata quindi analizzata la funzione delle DC in presenza di rapamicina. La capacità funzionale dei monociti coltivati in presenza di

rapamicina è stata analizzata valutando la produzione di citochine quali IL-12 e TNF- α e la capacità di stimolare linfociti CD3+ allogenici (prove effettuate solo nei monociti coltivati in presenza di GM-CSF da solo o con IL-4). Per valutare la capacità di queste cellule di produrre le citochine infiammatorie, le DC immature sono state stimulate con LPS e IFN- γ , dopo sei giorni di coltura nelle diverse condizioni sperimentali. Come mostrato nella figura 5, la rapamicina inibiva la produzione di TNF- α e IL-12, dopo attivazione della via di TLR4, da parte delle DC differenziate da monociti in presenza di IL-4. L'inibizione che si osservava era completa: 90% in media per entrambe le citochine TNF- α e IL-12 (p:0,0001).(fig.5.)

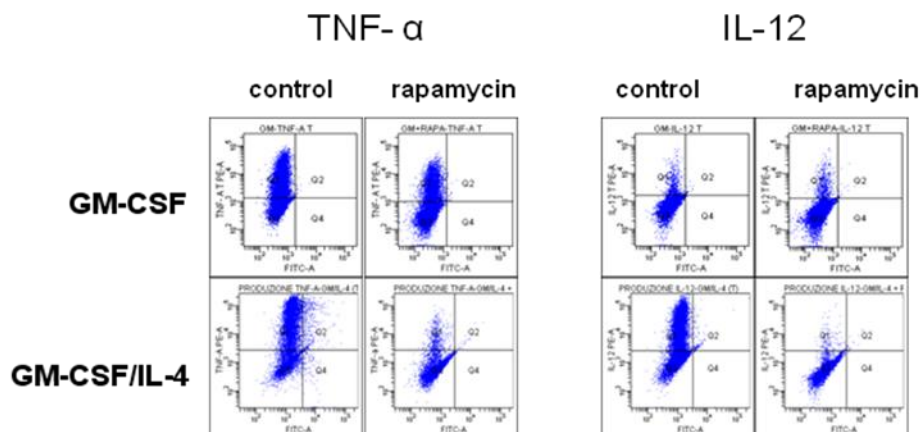


Fig.5 Produzione citochine infiammatorie: i plot raffigurano la produzione di TNF- α e IL-12 da parte di DC coltivate in presenza o meno di rapamicina.

La produzione di citochine, TNF- α e IL-12, non veniva invece alterata quando ad essere stimulate erano le APC generate in presenza del solo GM-CSF (fig.5) così come la produzione di IFN- α da parte delle pDC stimulate con CpG. Nelle mDC coltivate per 2 giorni con GM-CSF e IL-4 la produzione di TNF- α , a seguito di stimolazione con LPS e IFN- γ non sembrava ridursi. I dati ottenuti dimostrano che la rapamicina regola

la produzione di citochine infiammatorie solo nelle APC originate da monociti e solo in presenza di IL-4. Per studiare dopo quanto tempo le cellule diventavano sensibili alla rapamicina sono stati effettuati dei saggi di cinetica; è stato dimostrato che gli effetti della rapamicina sulle cellule coltivate in presenza di IL-4 sono tempo dipendenti. Erano necessari almeno tre giorni di coltura affinché la produzione di citochine venisse ridotta; la massima inibizione è stata osservata dopo 6 giorni di coltura. (fig.6).

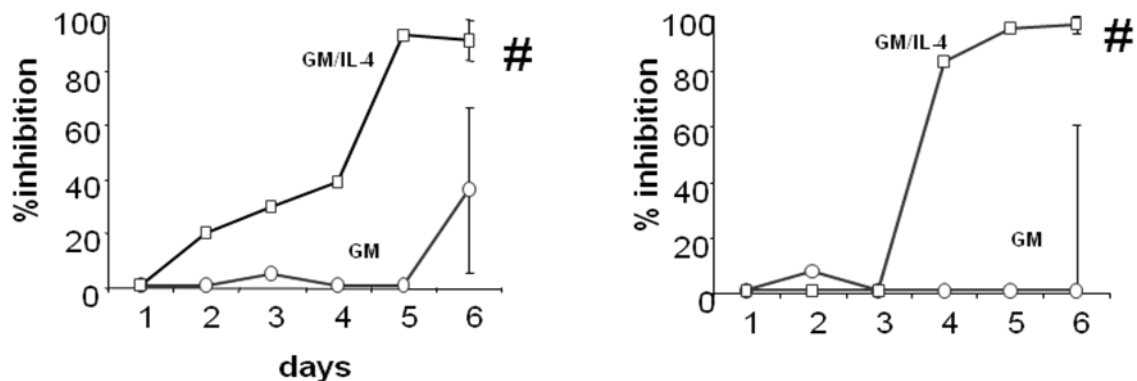


Fig. 6. Saggi di cinetica. I grafici riportano l'inibizione della produzione di TNF- α e IL-12 rispetto al controllo nel tempo. (# p: 0,0001)

Per continuare a studiare gli effetti della rapamicina sulla funzione delle APC generate da monociti, è stata valutata la loro capacità allostimolatoria. La valutazione della proliferazione è stata effettuata dopo una coltura mista tra linfociti CD3 allogeni e le APC mature coltivate a partire da monociti e poi successivamente stimulate con LPS. Le DC generate con l'IL-4 in presenza di rapamicina riducevano il loro potenziale stimolatorio, in una MLR. (fig.7.)

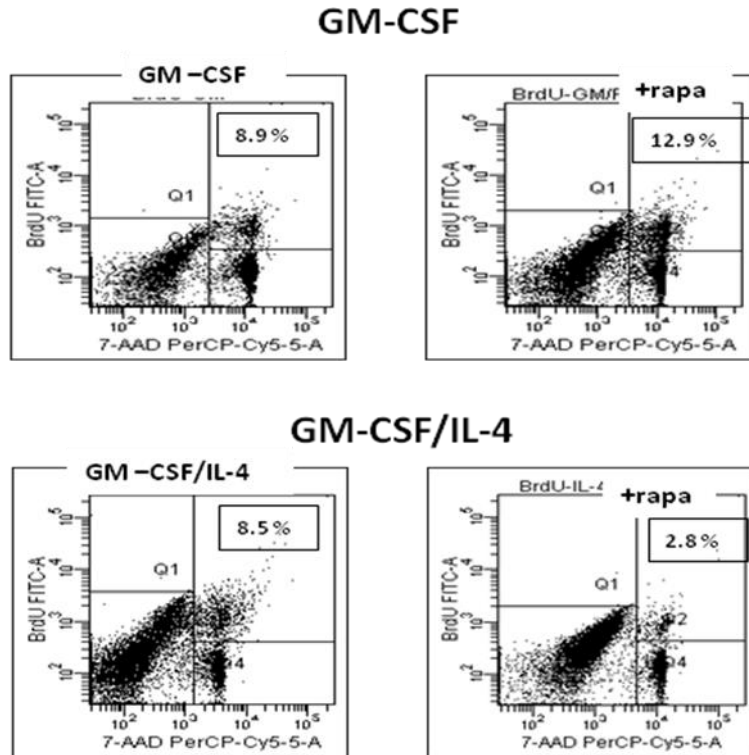


Fig.7 MLR. Il sistema con la BrdU permette di osservare le cellule in proliferazione, che corrispondono alle cellule che cadono nel quadrante in alto a destra. I plot sono un esempio rappresentativo di 3 esperimenti,

Nella figura 7 si può osservare inoltre, che le APC generate in presenza di GM-CSF erano insensibili alla rapamicina.

Questi risultati confermano che l'azione della rapamicina è dipendente dalla presenza dell'IL-4 nel terreno di coltura durante il differenziamento dei monociti ad APC.

Per valutare se l'IL-4 è necessaria agli effetti del blocco della via di PI3K a monte di mTOR i monociti sono stati trattati in coltura con un inibitore di PI3K (LY294002) per sei giorni in presenza o assenza di IL-4 (fig.8).

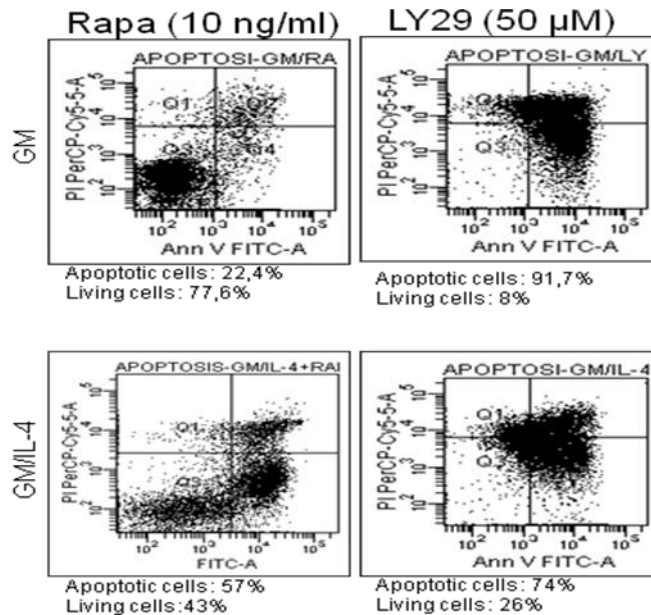


Fig. 8. Inibitori della via di segnale PI3K/Akt/mTOR. Confronto tra diversi inibitori della via di segnale di PI3K/Akt /mTOR attraverso un saggio di apoptosi analizzato al citofluorimetro.

Il blocco di PI3K induceva un aumento di apoptosi notevole, pari al 90% se comparato al 50-60% che si aveva bloccando mTOR con la rapamicina nei monociti coltivati nelle diverse condizioni. L'apoptosi in questo caso era indipendente dall'IL-4. Di conseguenza sembra che l'IL-4 aumenti la sensibilità dei monociti alla rapamicina ma non agli inibitori generali della via di PI3K. Per confermare questo dato, cioè che l'attivazione del segnale dipendente dall'IL-4 è necessario per l'induzione dell'apoptosi da parte della rapamicina, è stato testato se il blocco della via di segnale di STAT6, il più importante fattore di trascrizione a valle del recettore dell'IL-4, prevenisse l'apoptosi indotta dalla rapamicina. Il trattamento con gli interferoni (IFN- α e IFN- γ) blocca la via di segnale di STAT6 riducendo la fosforilazione di STAT6 a seguito di stimolazione del recettore⁷⁴. E' stato fatto un pretrattamento dei monociti per 2 h con IFN- α e con IFN- γ ; quindi

sono stati coltivati in terreno di coltura contenente GM-CSF con o senza IL-4 in presenza o meno di rapamicina (fig 9).

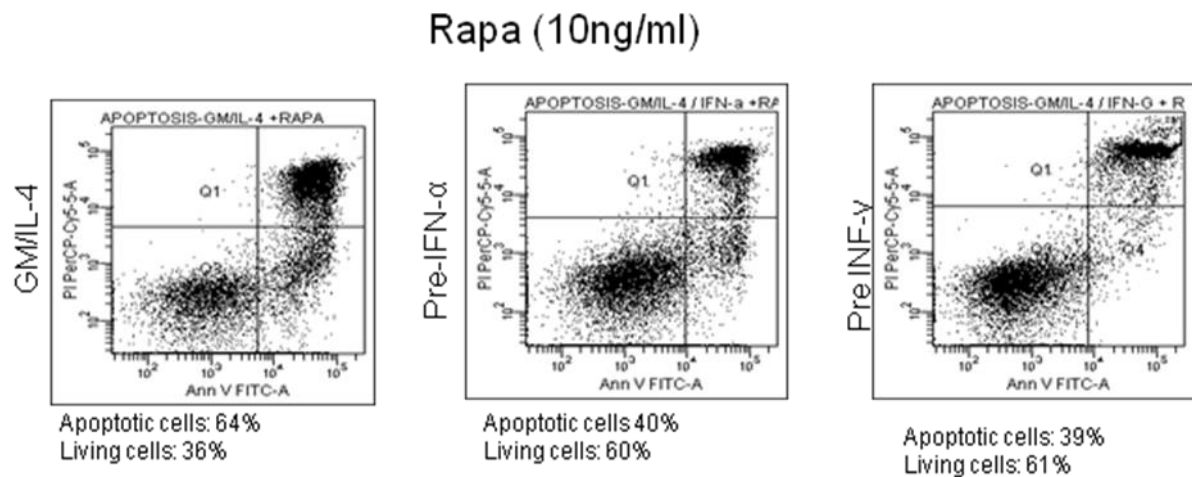


Fig 9: Effetto del pretrattamento con gli IFN. Analisi dell'apoptosi dopo preincubazione delle cellule con gli IFN prima di aggiungere la rapamicina. La percentuale di apoptosi è confrontata con il controllo (cellule non pretrattate con gli IFNs e coltivate in presenza di rapamicina).

Come mostrato nella figura 9 la preincubazione con gli interferoni riduceva la percentuale di apoptosi nelle DC differenziate in presenza di IL-4 e rapamicina. Questi dati confermano che l'attivazione della via di segnale dipendente dall'IL-4 aumenta l'induzione di apoptosi delle DC da parte della rapamicina.

4.2. EFFETTI DELLA PERIFOSINA

La seconda molecola testata è stata la perifosina che blocca AKT, molecola target a monte di mTOR, senza provocare tossicità. Sono stati valutati gli effetti della perifosina nelle DC differenziate in coltura in presenza di GM-CSF e di GM-CSF e IL-4.

I monociti sono stati trattati con perifosina, a partire dal primo giorno di coltura, a due diverse concentrazioni, scelte sulla base di dati sperimentali descritti in altri lavori scientifici⁷²⁻⁷³(fig.10.).

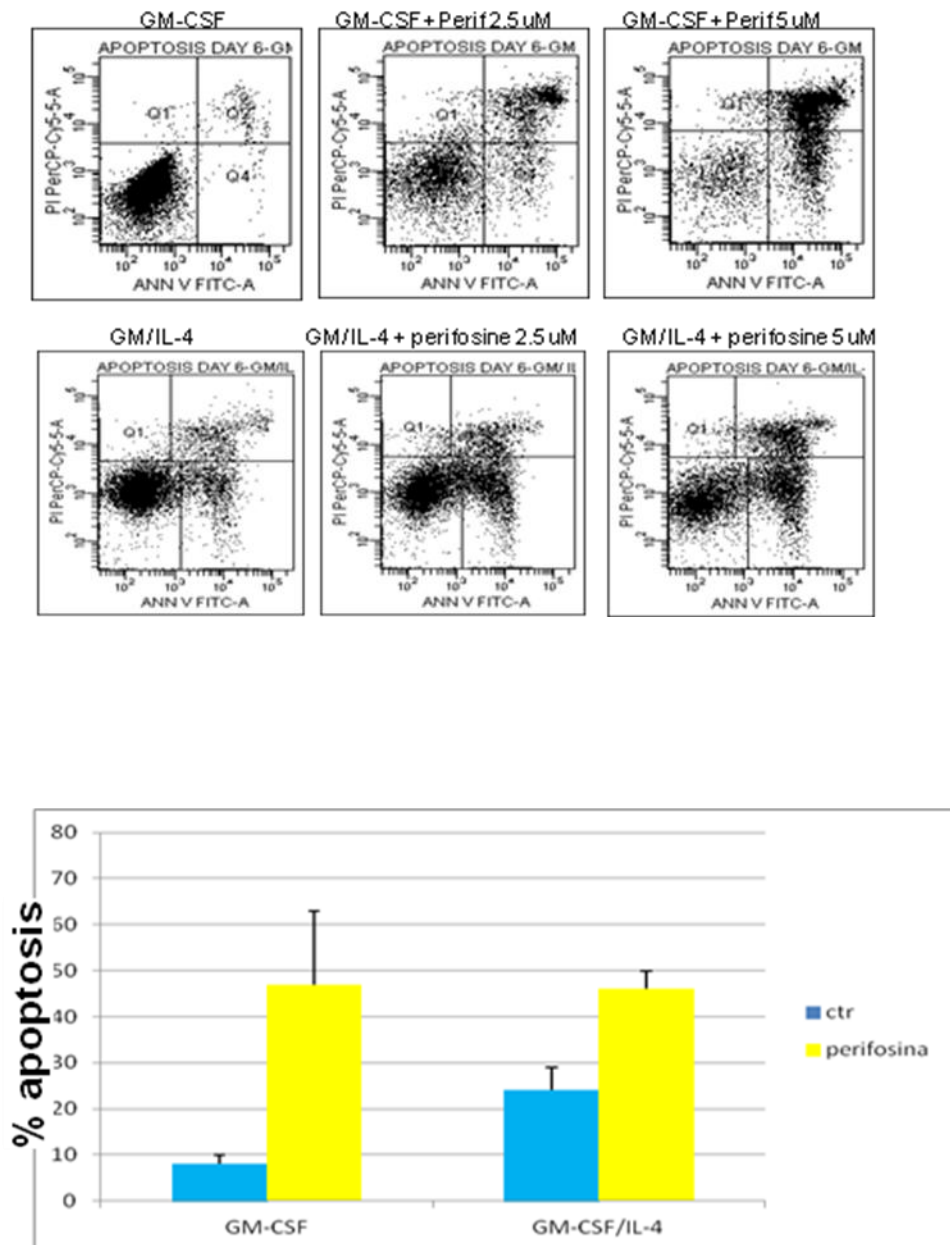


Fig.10. Apoptosi. Nella prima parte della figura sono riportati dei plot raffigurativi dell'apoptosi delle cellule dendritiche coltivate in presenza di diverse concentrazioni di perifosina. Il grafico esprime i valori medi in percentuale.

Si osserva che la perifosina induceva un aumento di apoptosi sia nei monociti coltivati con il GM-CSF (8% ± 2 vs 46% ± 16 con perifosina)

che in presenza di GM-CSF e IL-4 ($24\% \pm 5$ vs $47\% \pm 4$ con perifosina). L'effetto era visibile già a partire dal giorno 2 (Fig. 11) ed era dose dipendente (Fig. 10). Questi dati hanno dimostrato un effetto indipendente dai fattori di crescita presenti nel terreno di coltura.

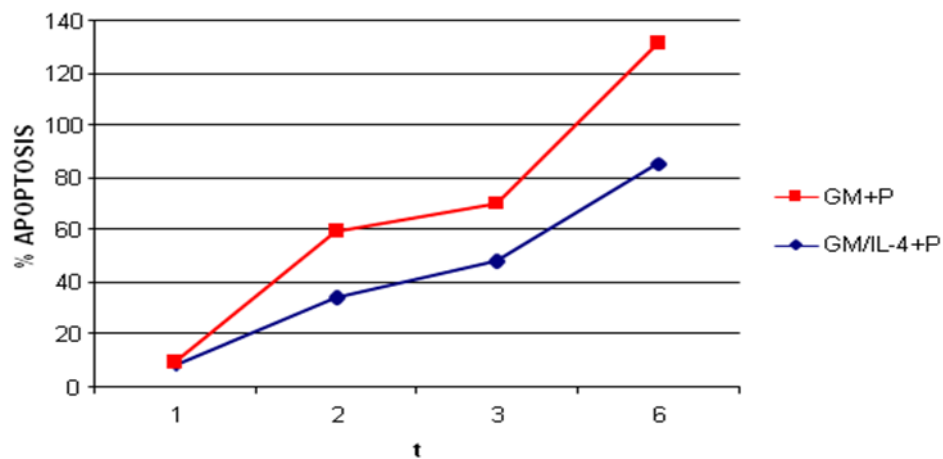


Fig. 11. Cinetica. Cinetica dell'effetto della perifosina sull'induzione dell'apoptosi in APC derivate da monociti dopo 6 giorni di coltura.

Dal punto di vista fenotipico, le DC immature ottenute dai monociti, coltivati con GM-CSF o con il GM-CSF e l'IL-4 in presenza di perifosina, non sembravano diverse rispetto alle cellule di controllo; infatti l'espressione dei marcatori di differenziamento e maturazione quali CD1a, CD14, CD86 non ne risultava influenzata (fig 12). Come mostrato nella figura 12, le DC derivate da monociti coltivati in presenza di perifosina avevano un fenotipo simile alle cellule di controllo a differenza invece delle DC ottenute in presenza di rapamicina che come precedentemente discusso, mostravano un fenotipo alterato con incremento del CD1a e riduzione del CD86.

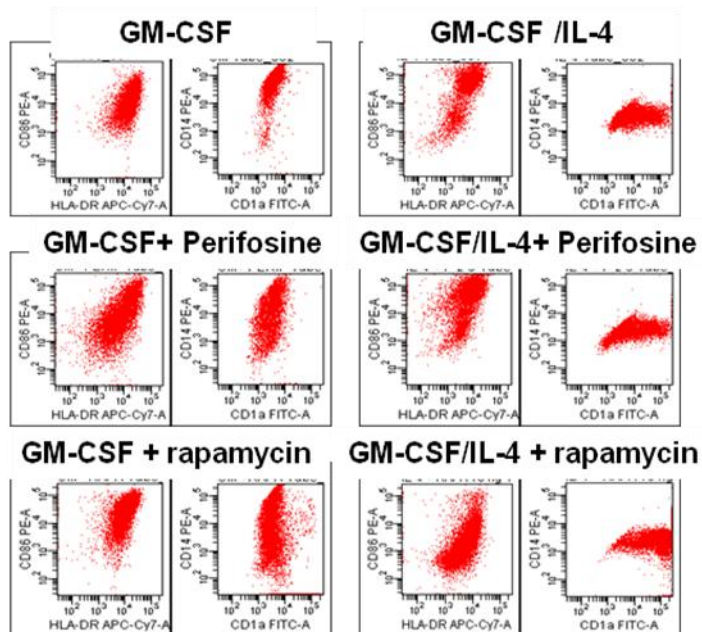


Fig.12. Valutazione citoflorimetrica dell'espressione delle molecole CD86, CD1a, CD14 e HLA-DR in presenza o meno di perifosina e di rapamicina, da parte di DC derivate da monociti in presenza di GM-CSF o GM-CSF e IL-4.

Successivamente è stata valutata la funzione la produzione di TNF- α . La produzione di questa citochina era inibita in presenza di perifosina sia nelle APC differenziate con GM-CSF che con GM-CSF e IL-4. (fig 13). Nei monociti coltivati solo con il GM-CSF si osservava un'inibizione pari al 60% e nei monociti coltivati con GM-CSF e IL-4 intorno al 20%. Questi dati dimostrano che la perifosina agisce contro le cellule dendritiche differenziate da monociti inducendo apoptosi e alterandone la funzione e lo fa in maniera indipendente dai fattori di crescita presenti nel terreno di coltura.

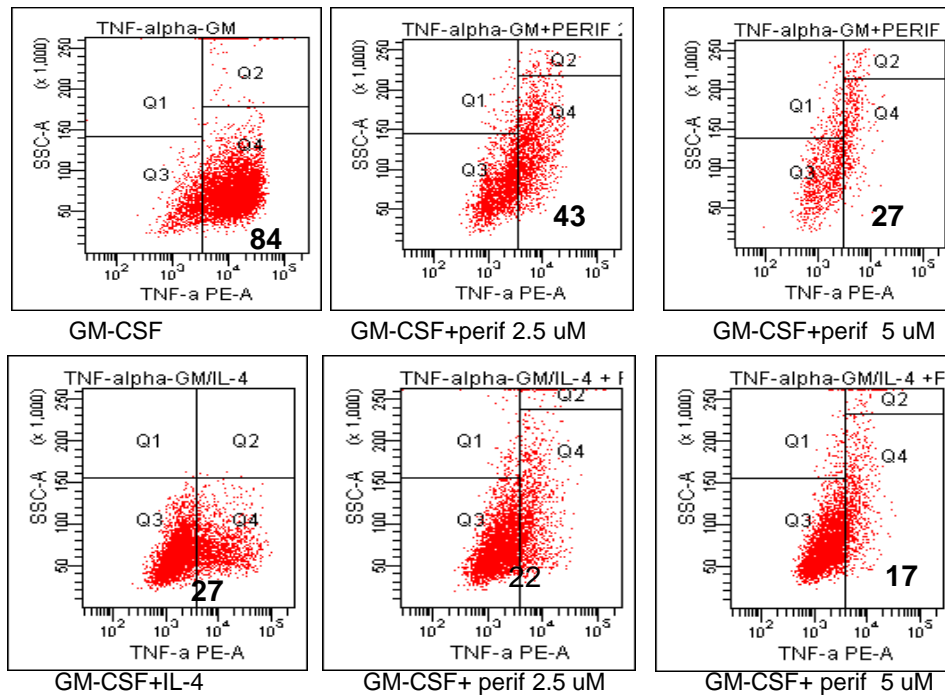


Fig.13. Produzione di TNF- α . Valutazione citofluorimetrica della produzione di TNF- α . Esempio rappresentativo di tre esperimenti.

5. DISCUSSIONE

L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di studiare l'azione di alcuni farmaci, già in uso clinico o sperimentale, sulla sopravvivenza e sulla funzione delle cellule che presentano l'antigene, in vitro. Le molecole scelte sono state la rapamicina e la perifosina, perché entrambe colpiscono, seppur a diversi livelli, la via di segnale PI3K/Akt/mTOR fondamentale per la sopravvivenza e la proliferazione cellulare delle APC. I dati ottenuti dopo aver studiato la rapamicina, dimostrano che quest'ultima agisce sulla sopravvivenza e sulla funzione di DC differenziate a partire da monociti, in vitro, solo in presenza di IL-4. I monociti coltivati in presenza del solo GM-CSF o con IFN- α e le cellule dendritiche circolanti risultano infatti resistenti all'effetto della rapamicina. I nostri dati hanno confermato che la rapamicina riduce il recupero cellulare inducendo l'apoptosi delle cellule dendritiche derivate da monociti⁶⁷⁻⁶⁹⁻⁷⁵, ma in più dimostrano che questo effetto si ha solo in presenza dell'IL-4 e che le DC circolanti sono resistenti. Già Woltman nel 2003 dimostra che i monociti sono resistenti alla rapamicina; solo in un lavoro⁷⁵, si afferma che la rapamicina induce la morte cellulare dei monociti. Questo dato sembra contrastare con i nostri dati e con i precedenti ma in realtà in questo lavoro i monociti sono coltivati in assenza di GM-CSF, che blocca l'effetto della rapamicina. Noi non abbiamo ritenuto utile privare i monociti del GM-CSF perché la stimolazione del recettore del GM-CSF è essenziale alla

sopravvivenza dei monociti *in vitro*⁷⁷. I nostri risultati evidenziano inoltre un effetto tempo dipendente; la massima induzione di apoptosi si osserva al giorno sei e a partire dal quarto giorno, mentre dopo tre giorni di coltura non si ha un aumento dell'apoptosi rispetto alle cellule coltivate in assenza di rapamicina. Woltman et al. osservano un aumento dell'apoptosi già a partire dal giorno due, utilizzando però una concentrazione di rapamicina superiore di circa dieci volte.

La rapamicina altera il fenotipo delle APC coltivate in presenza dell'IL-4. Come già osservato nelle cellule dendritiche mature⁶⁷ anche nelle cellule dendritiche differenziate in presenza di IL-4 la rapamicina induce l'espressione del CD1a, mentre l'espressione del CD14 e della molecola di costimolazione CD86 diminuiscono. Le cellule dendritiche generate in presenza di rapamicina appaiono più differenziate anche se meno potenti nella stimolazione dei linfociti T, come dimostrato anche dagli studi funzionali (fig. 5-6).

Le DC derivate dai monociti coltivati in presenza di rapamicina e di IL-4 appaiono quindi funzionalmente alterate. Diversi lavori hanno mostrato una ridotta produzione di IL-12 e IL-10⁶⁷ e una ridotta capacità stimolatoria da parte di cellule dendritiche mature esposte alla rapamicina^{67,76}. I nostri dati confermano che nelle APC differenziate con l'IL-4 la rapamicina inibisce la produzione di TNF- α e di IL-12 mentre i monociti coltivati col solo GM-CSF producono elevati livelli di TNF- α e IL-12 anche se esposti alla rapamicina. L'effetto inibitorio si osserva a partire dal giorno tre ed è massimo al

giorno sei. Solo APC ottenute da monociti coltivati con l'IL-4 presentano una ridotta capacità di stimolare linfociti allogenici.

Abbiamo confrontato l'effetto della rapamicina con l'effetto dell'inibizione PI3K, bersaglio a monte di mTOR, target molecolare della rapamicina, su monociti coltivati in presenza o meno di IL-4 per vedere se la presenza dell'IL-4 potesse influenzarne l'azione. PI3K è fondamentale per la via di segnale che porta all'attivazione di mTOR a seguito dell'attivazione di recettori di fattori di crescita come quello del GM-CSF. Woltman⁶⁶ conferma che il blocco di PI3K induce l'apoptosi nelle cellule dendritiche ma non nei monociti coltivati senza GM-CSF, che potrebbe invece stimolarne la dipendenza da PI3K. Abbiamo osservato una quasi completa induzione di apoptosi nei monociti coltivati in presenza di GM-CSF con o senza IL-4 da parte degli inibitori di PI3K. I dati suggeriscono quindi che l'IL-4 è necessaria all'induzione di apoptosi solo se è mTOR ad essere bloccato.

Questi risultati ci portano a concludere che la rapamicina agisce solo sui monociti con un meccanismo IL-4 dipendente. La conferma è stata ottenuta bloccando la via di segnale dell'IL-4 attraverso il blocco di STAT6 mediante IFNs⁷⁴. Nelle cellule pretrattate con IFNs si è osservata una riduzione di apoptosi indotta dalla rapamicina. Il ruolo dell'IL-4 sembra quindi essere centrale nella regolazione degli effetti del blocco di mTOR da parte della rapamicina. Anche Hackstain osserva che l'azione della rapamicina è associata a una down-regolazione del recettore dell'IL-4 mediata dal recettore FKBP12⁶⁸. Il

meccanismo alla base della dipendenza dell'azione della rapamicina dall'IL-4 è ancora sconosciuto ma si potrebbe ipotizzare che l'IL-4 renda la cellula più sensibile all'attività di mTOR per la sopravvivenza inibendo le vie alternative a mTOR stimulate sempre da PI3K. Questa nostra ipotesi potrebbe essere supportata dall'osservazione che il blocco di mTOR causa apoptosi in assenza di GM-CSF, quindi in assenza di attivazione di PI3K. Questo effetto è comunque limitato ai monociti, in quanto la presenza di IL-4 non aumenta la sensibilità alla rapamicina delle cellule dendritiche mieloidi circolanti. Anche Monti⁶⁷ ha dimostrato che la rapamicina agisce sulle cellule dendritiche solo se presente durante il differenziamento.

Le cellule dendritiche circolanti sono cellule rare difficili da studiare in vitro. Sia le mDC circolanti che le pDC circolanti risultano resistenti alla rapamicina. I nostri dati hanno mostrato che le mDC già differenziate non sono sensibili alla rapamicina nemmeno quando esposte all'IL-4. Sulle mDC gli unici dati che ci sono ad oggi⁷⁶ non solo rafforzano l'ipotesi che le cellule mature siano insensibili alla rapamicina ma mostrano che la rapamicina induce un aumento del potenziale infiammatorio. L'inibizione di mTORC1 in queste cellule, mediata dalla rapamicina, aumenta l'attivazione di NF- κ B e quindi porta ad un aumento della produzione di citochine infiammatorie e del potenziale allostimolatorio. Riguardo agli effetti della rapamicina sulle pDC, i nostri dati suggeriscono la resistenza di queste cellule alla rapamicina.

Visto il ruolo delle APC nell'induzione della aGVDH e alla luce dell'importanza di riuscire ad eliminare o alterare queste cellule prima del trapianto durante la fase del condizionamento la rapamicina è stata considerata un buon farmaco candidato. Inoltre in pazienti sottoposti a trapianto di rene il trattamento con rapamicina induce un aumento del potenziale immunostimolatorio delle mDC circolanti. Quindi non possono essere esclusi effetti modulatori di tipo attivatorio sui monociti che differenziano in vivo a DC.

La perifosina è un inibitore di Akt e quindi potrebbe avere effetti più estesi rispetto alla rapamicina. La perifosina è stata utilizzata sperimentalmente con cellule di mieloma umano⁷³ e non ha riportato effetti di tossicità, quindi potrebbe diventare un buon candidato in vivo per l'eliminazione selettiva delle APC prima del trapianto allogenico di cellule staminali, con una conseguente riduzione del rischio di sviluppare aGVHD. In letteratura non ci sono dati riguardo a effetti specifici verso le cellule dendritiche. I dati ottenuti dimostrano un potenziale ruolo della perifosina nell'indurre apoptosi nelle cellule dendritiche ottenute da monociti coltivati sia con GM-CSF che con GM-CSF e IL-4; le cellule coltivate in presenza di perifosina sono anche meno capaci di produrre citochine infiammatorie. Il fatto che l'effetto della perifosina è indipendente dai fattori di crescita presenti nel terreno di coltura è promettente; questo farmaco potrebbe agire sulla sopravvivenza delle APC, eliminandole durante la fase di condizionamento in vivo, nei pazienti che si sottoporranno a trapianto di cellule staminali, riducendo il

rischio di GVHD. Sicuramente ulteriori saggi cellulari e molecolari in vitro sono richiesti.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
- 2) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B e Palucka K. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18:767-811.
- 3) Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp. Med* 1994; 179: 1109-1118.
- 4) Santini S.M, Lapenta C, Logozzi M et al. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 1777-88.
- 5) Conti L; Gessani S. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances. *Immunobiology* 2008 213: 859-870.
- 6) Colonna M, e altri. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; 5: 1219-26.
- 7) Kuwana M, e altri. Induction of antigen-specific human CD4+ T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2547-57.
- 8) Gilliet M, e altri. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195: 695-704.
- 9) Steinman RM, e altri. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685-711.
- 10) Mommaas AM, Mulder AA, Jordens R, Out C, Tan MC, Cresswell P, Kluin PM, Koning F. Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur J Immunol* 1999; 29: 571-80.
- 11) Engering AJ, Cella M, Fluitsma D, Brockhaus M, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A, Pieters J. The mannose receptor functions as a high

- capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2417-25.
- 12) Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375: 151-55.
 - 13) Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182:389-400.
 - 14) Tan MC, Mommaas AM, Drijfhout JW, Jordens R, Onderwater JJ, et al. Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997; 27:2426-35.
 - 15) Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by Langherans cells in vitro. *J Exp Med* 1993; 178:509-19.
 - 16) Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc γ receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 1996; 157:541-48.
 - 17) Matsuno K, Ezaki T, Kudo S, Uehara Y. A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and traslocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med* 1996; 183:1865-78.
 - 18) Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via α v β 5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 188:1359-68.
 - 19) Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998 392:86-89.
 - 20) Rubartelli A, Poggi A, Zocchi MR. The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the α (v) β 3 integrin and requires intracellular calcium. *Eur J Immunol* 1997; 27:1893-900.

- 21) Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 1993; 178:479-88.
- 22) Rescigno M, Granucci F, Citterio S, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today* 1999; 20:200-3.
- 23) Moll H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today* 1993; 14:383-87.
- 24) Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 1976; 143:1283-88.
- 25) Kovacsovics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, Rock KL. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:4942-46.
- 26) Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 1994; 264:961-65.
- 27) Sigal LJ, Crotty S, Andino R, Rock KL. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 1999; 398:77-80.
- 28) Kurts C, Carbone FR, Barnden M, Blanas E, Allison J, Heath WR, Miller JF. CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J Exp Med* 1997; 186:2057-62.
- 29) Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, van Veen CJ, et al. MHC class II compartments and kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol* 1995; 154:5715-24.
- 30) Nijman HW, Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, et al. Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med* 1995; 182:163-74.

- 31) Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F e altri. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 1997; 185:317-28.
- 32) Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell P, Steinman RM. High levels of major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 1997; 186:665-72.
- 33) Cella M, Engering A, pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997; 388:782-87.
- 34) Pierre P, Turley SJ, Gatti E, e altri. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 1997;388:787-92.
- 35) Butz EA, Bevan MJ. Differential presentation of the same MHC class I epitopes by fibroblasts and dendritic cells. *J Immunol* 1998; 160:2139-44.
- 36) Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med* 1990; 172:631-40. Erratum. *J Exp Med* 1990; 172(4):1275.
- 37) Inaba K, Young JW, Steinman RM. Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J Exp Med* 1987; 166:182-94.
- 38) Young JW, Steinman RM. Dendritic cells stimulate primary human cytotoxic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J Exp Med* 1990; 171:1315-32.
- 39) McCoy KD, Hermans IF, Fraser JH, Le Gros G, Ronchese F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) can regulate dendritic cell-induced activation and cytotoxicity of CD8(+) T cells independently of CD4(+) T cell help. *J Exp Med* 1999; 189:1157-62.
- 40) Bell D, Young JW, Banchereau J. Dendritic cells. *Adv. Immunol* 1999 72:255-324.
- 41) Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90:3245-87.
- 42) Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991; 324:667-74.

- 43) Ruggeri L, e altri. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097-2100.
- 44) Shlomchick W, e altri. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999; 285:412-5.
- 45) Anderson Be, e altri. Distinct roles for donor-and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood* 2005; 105:2227-34.
- 46) Matte CC, e altri. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med* 2004; 10:987-92.
- 47) Tivol E, e altri. Emergent autoimmunity in graft versus host disease. *Blood* 2005;105(12):4885-91.
- 48) Yuan TL; Cantley LC; PI3K pathway alteration in cancer variation on a theme. *oncogene* 2008; 27:5497-510.
- 49) Martelli AM; Evangelisti C; Chiarini F; James A McC. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget* 2010; 1:89-103.
- 50) Brazil DP; Yang ZZ; Hemmings BA. Advances in protein kinase B signaling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 2004; 29:233-42.
- 51) Fruman DA, Bismuth G. Fine tuning the immune response with PI3K. *Immunol. Rev* 2009; 228:253-272.
- 52) Kok K., Geering B., Vanhaesebroeck B. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci* 2009; 34:115-27.
- 53) Backer JM., The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 2008; 410:1-17.
- 54) Martelli AM., Faenza I., Billi AM. Et al. Intranuclear 3-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? *Cell signal* 2006;18: 1101-7.
- 55) Memmott RM, Dennis PA. AKT-dependent and independent mechanism of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal* 2009; 21:656-64.

- 56) Dunlop EA, Tee AR. Mammalian target of rapamycin complex 1: signaling inputs, substrates and feedback mechanism. *Cell signal* 2009; 21: 827-35.
- 57) Rosner M, Hengstchlager M. Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complex mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of mTORC2 components rictor and sin1. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 2934-48.
- 58) Breuleux M, Klopfenstein M, Stephan C, et al.: Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition. *Mol Cancer Ther* 2009;8:742-53
- 59) Matsue H, Yang C. Contrasting impact of immunosuppressive agents on bidirectional dendritic cell-T cell interaction during antigen presentation *J Immunol* 2002; 169:3555-64.
- 60) Klanginsirikul P., Carter G.I., Byrne J.L., Hale G., Russell N.H.. Campath-1G causes rapid depletion of circulating host dendritic cells (DCs) before allogeneic transplantation but does not delay donor DC reconstitution. *Blood*. 2002 April 1; 99(7):2586-91.
- 61) Fang L., Fehse B., Engel M., Zander A., Kroger N.. Antithymocyte globulin induces ex vivo and in vivo depletion of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Transplantation*. 2005 Feb 15; 79(3):369-71.
- 62) Garrigan K, Moroni-Rawson P, et al. Functional comparison of spleen dendritic cells and dendritic cells cultured in vitro from bone marrow precursors. *Blood* 1996; 88: 3508-12.
- 63) Fasolo A, Sessa C. mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 1717-34.
- 64) Kahan B.D. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomized multicentre study The Rapamune US Study Group. *Lancet* 2000 Jul 15; 194-202.
- 65) Abraham RT, Gibbons JJ. The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twist and turns in the road to cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13:3109-14.
- 66) Woltman AM, Van der Kooij S.W, Coffey PJ, Offringa R, Daha MR, Van Kooten C. Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in

- human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression. *Blood* 2003 Feb 15; 101(4): 1439-45.
- 67) Monti P., Mercurio A., Leone B.E., Di Carlo V., Allavena P. and Piemonti L.. Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. *Transplantation*. 2003 Jan 15; 75(1):137-145.
- 68) Hackstein H., Taner T., Zahorchak A.F., Morelli A.E., Logar A.J., Gessner A. and Thomson A.W.. Rapamycin inhibits IL-4-induced dendritic cells maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood*. 2003 Jun 1; 101(11): 4457-63.
- 69) Woltman A.M., De Fijter J.W., Kamerling S.W., Van der Kooij S.W., Paul L.C., Daha M.R. and Van Kooten C.. Rapamycin induces apoptosis in monocytes and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages. *Blood*. 2001 Jul 1; 98(1). 174-80.
- 70) Papa V, Tazzari PL, Chiarini F et al. Proapoptotic activity and chemosensitive effect of the novel Akt inhibitor perifosine in acute myelogenous leukemia cells. *Leukemia* 2008; 22: 147-60.
- 71) Fu L, Kim YA, Wang X et al. Perifosine inhibits Mammalian target of rapamycin signaling through facilitating degradation of major components in the mTOR axis and induces autophagy. *Cancer Res* 2009; 69: 8967-76.
- 72) Richardson PG, Eng C, Kolesar J, Hideshima T, Anderson KC. Perifosine , an oral, anti-cancer agent and inhibitor of the Akt pathway: mechanistic actions, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical activity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2012; 8(5):623-33.
- 73) Jakubowiak AJ, Richardson PG, Zimmerman T, Alsina M et al. Perifosine plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma: a Phase I Multiple Myeloma Research Consortium study. *Br J Haematol*. 2012; 158(4):472-80.
- 74) Dickensheets H.L., Venkataraman C., Shindler U., Donnelly R.P.. Interferons inhibits activation of STAT6 by interleukin 4 in human monocytes by inducing SOCS-1 gene expression. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1999 Sep 14; 96(19): 10800-

- 75) Mercalli A., Sordi V., Ponzoni M., Maffi P., De Taddeo F., Gatti G., Servida P., Bernardi M., Bellio L., Bertuzzi F., Secchi A., Bonifacio E. and Piemonti L.. Rapamycin induces caspase-independent cell death in human monocytes. *Am J Transplant.* 2006 Jun; 6(6):1331-41.
- 76) Haidinger M., Poglitsch M., Geyeregger R., Kasturi S., Zeyda M., Zlabinger G.J., Pulendran B., Horl W.H., Saemann M.D., Weichhart T.. A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation. *The Journal of immunology* 2010 Oct 1; 185(7): 3919-31.
- 77) Conti L., Gessani S.. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances. *Immunobiology* 2008; 213(9-10): 859-70.