

Dall'autoimmunità al cancro: una questione di doppia identità

E. Ranieri

Cattedra di Patologia Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Foggia, Ospedali Riuniti, Foggia

Role of immunity and tolerance in renal diseases

Dendritic cells (DC) have been recognized as the most efficient antigen presenting cells that have the capacity to initiate naive T-cell response in vitro and in vivo. During their differentiation and maturation pathways, DC can efficiently capture, process and present antigens for T-cell activation. These characteristics make DC an attractive choice as the cellular adjuvant for cancer vaccines. In humans, two DC subsets, myeloid DC (mDC) and plasmacytoid DC (pDC), have been characterized and have distinct origins and functions: mDC are involved in the induction of the Th1 response, while pDC regulate immunity and initiate adaptive antiviral immune responses. Advances in DC generation, loading and maturation methodologies have made it possible to generate clinical grade vaccines for various human trials. Several studies have shown that tumor antigen-loaded DC vaccination is safe and promising for the treatment of cancer. We are investigating the use of autologous tumor lysate-pulsed mature DC in renal cancer patients with metastasis. DC can play a central role in the development of T-cell tolerance, and its maintenance in the periphery is critical for the prevention of autoimmunity. DC are likely to have a role in the pathogenesis of autoimmunity and are, to date, the only APC capable of provoking autoimmune disease. Systemic lupus erythematosus (SLE), a systemic autoimmune disease with multi-organ involvement with autoreactive T and B cells, could be due to DC alterations, and pDC have a potential role in this disease. Given their pivotal role in controlling immunity, DC are logical targets for treating both cancer and autoimmune diseases. (G Ital Nefrol 2005; 22: 140-51)

KEY WORDS: Dendritic cells, Immunity, Tolerance, Renal cell carcinoma, Systemic lupus erythematosus, T lymphocytes

PAROLE CHIAVE: Cellule dendritiche, Immunità, Tolleranza, Carcinoma renale, LES, Linfociti T

Commento Editoriale

Negli ultimi anni le cellule dendritiche sono state oggetto di molti studi, che hanno aperto nuove vie di conoscenza dei meccanismi che regolano la risposta immune, in particolare la presentazione dell'antigene, e soprattutto presentando nuovi orizzonti a prospettive terapeutiche ad ampio raggio, dalla terapia delle malattie autoimmuni alla cura di alcuni tumori solidi, quali rene e prostata.

Questa rassegna permette di acquisire le conoscenze di base (dettagliate nella prima sezione) per poter comprendere i meccanismi biologici razionali agli approcci terapeutici già tentati o ipotizzabili per un prossimo futuro (presentati nella seconda parte).

Introduzione

Le cellule dendritiche (CD) sono le più potenti cellule presentanti l'antigene (APC) e sono in grado sia di indurre e modulare l'immunità cellulo-mediata contro patogeni, antigeni tumorali e proteine *non-self*, sia di mantenere la tolleranza immunologica (1-3). Quest'ultima funzione rappresenta un campo di indagine piuttosto recente e potrebbe spiegare alcuni meccanismi patogenetici alla base di patologie autoimmuni con eventuale coinvolgimento renale (lupus eritematoso sistemico, LES) e delle nefropatie da rigetto cronico del trapianto.

Dal doppio ruolo o dai diversi ruoli delle CD, per alcuni aspetti antitetici, nasce l'idea di considerare le CD ed i fenomeni biologici ad esse correlati in maniera dinamica,



Fig. 1 - Giuseppe Arcimboldo, 1590. *L'ortolano*, olio su legno, Cremona

come i noti dipinti olio su legno di Giuseppe Arcimboldo del tardo cinquecento. Lo stesso soggetto, “L’Ortolano” ad esempio, poteva essere ammirato in due modi diversi: il primo convenzionale che raffigura un contadino (lo si potrebbe paragonare al ruolo classico delle CD, pro-immunità), il secondo, ruotando il quadro di 180°C, che invece rappresenta una natura morta con vegetali (il ruolo delle CD nell’indurre la tolleranza) (Fig. 1).

Quindi, la visione non statica di queste APC, così versatili ed efficienti nell’induzione dell’immunità o della tolleranza, si allarga aprendo nuove prospettive per la comprensione dei processi patologici a base immunologica e per l’impiego di nuovi approcci terapeutici per il trattamento delle neoplasie e delle malattie autoimmuni.

Tolleranza immunologica, immunità, autoimmunità

La tolleranza immunologica normalmente previene reazioni contro antigeni *self*. La capacità del sistema immune di distinguere tra antigeni *self* e *non-self* e tra antigeni esogeni innocui o pericolosi per l’organismo è controllata dai meccanismi di tolleranza centrale e periferica. La tolleranza centrale è un processo biologico che prevede la delezione di cellule T reattive contro antigeni *self* dopo interazione con le CD nel timo (4) e la delezione di cellule B reattive presenti nel midollo osseo per limitare la diversità di sviluppo dei repertori recettoriali T e B (5). Data l’enorme varietà del repertorio T cellulare con un grado di cross-reattività e promiscuità molto elevato (6), il sistema immune ha messo in atto un meccanismo aggiuntivo, quale la tolleranza periferica, per prevenire fenomeni di autoimmunità. Il meccanismo di tolleranza periferica consiste in una azione diretta sulle cellule autoreattive (tolleranza passiva: ignoranza immunologica, anergia apoptosi delle cellule T) o in una azione indiretta mediata da una sottopopolazione di

cellule T [tolleranza attiva: cellule T tollerogeniche o T regolatorie (Treg)]. L’alterazione dei meccanismi di tolleranza può indurre patologie di tipo neoplastico (mancato riconoscimento di antigeni tumorali e quindi il verificarsi di una risposta immune inefficace) o patologie autoimmuni (attivazione di cellule autoreattive e cellule Treg) (7). Un ruolo importante nell’induzione dell’immunità e della tolleranza periferica è stato attribuito alle CD (8).

Le Cellule Dendritiche

Le CD originano dal midollo osseo ed i loro precursori raggiungono, attraverso il flusso sanguigno, quasi tutti gli organi. Esse sono definite anche “sentinelle” e rappresentano la prima linea di difesa per l’organismo e sono presenti nei tessuti al fine di mantenere l’omeostasi del sistema immune o di indurre l’orientamento della risposta immunologica nel senso dell’immunità o della tolleranza.

Le CD sono state evidenziate nella cute, nelle vie respiratorie e negli spazi interstiziali di molti altri organi (es. cuore, rene e fegato), nei tessuti linfoidi e nel sangue (9). La ridotta espressione di molecole di adesione quali la E-caderina e le integrine $\alpha 6$ e il contemporaneo aumento di recettori chemochinici tra cui il CCR7 (10) consentono alle CD di migrare ipoteticamente in ogni tessuto dell’organismo e di localizzarsi a livello dell’epitelio senza romperne la barriera (11). Questo tipo di distribuzione in tutti i tessuti periferici consente alle CD di essere perfettamente posizionate per la “cattura” di antigeni *self* ed antigeni *non-self* dannosi per l’organismo e di attivare i linfociti T specifici, le cellule effettrici della risposta immune.

Le Cellule Dendritiche e gli stadi di maturazione

Le CD comprendono diverse sottoclassi che corrispondono a stadi differenti di maturazione che a loro volta comportano funzioni biologiche diverse. Le CD immature, presenti nei tessuti periferici, in presenza di fenomeni infiammatori o per ingresso nell’organismo di antigeni patogeni, catturano gli antigeni presenti nel microambiente e migrano nell’area paracorticale ricca di cellule T delle stazioni linfonodale. Le CD, quindi, presentano i peptidi antigenici complessati con molecole di classe I e II del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC) alle cellule T naïve (12, 13).

Le CD immature sono funzionalmente caratterizzate da un fenotipo con capacità di macropinocitosi, endocitosi e fagocitosi, attività che viene costantemente effettuata a livello periferico in condizioni normali. A conferma della loro funzione di cattura ed endocitosi dei patogeni e dei loro prodotti [LPS, sequenze CpG, DNA, Heat Shock Proteins (HSP) ecc.], le CD immature sono caratterizzate,

dal punto di vista fenotipico, da una bassa espressione di MHC I e II e di molecole costimolatorie CD80, CD86, CD40. È anche ridotta l'espressione della subunità p55 del CD83 (14) e di altri recettori quali il CD54 (ICAM-1) ed il CD58. È invece rilevata una elevata presenza di recettori di superficie, quali le lectine di tipo C (DEC-205 e recettore del mannosio), della Langherina (DEC 207) necessari al processo di fagocitosi (15), del recettore CD36, delle integrine $\alpha\text{v}\beta 3$ o $\alpha\text{v}\beta 5$ (16, 17) e del recettore del complemento CR1 (18). Tali CD inducono uno stato di anergia delle cellule T e, di conseguenza, la tolleranza immunologica. Le CD immature ma con capacità migratorie verso le stazioni linfonodali, in assenza di stimoli microbici o infiammatori, presentano elevati livelli di MHC II, di molecole costimolatorie ma non sono in grado di rilasciare IL-12 o altre citochine proinfiammatorie (IL-6, $\text{TNF}\alpha$) ed il loro processo di maturazione sembra arrestarsi ad uno stato di *semi-maturazione* (19).

Questo parziale stato di maturazione delle CD comporta l'omeostasi del sistema immune e determina l'induzione di una permanente ed attiva tolleranza contro gli antigeni *self* che derivano dai tessuti periferici mediata dall'attivazione di cellule Treg $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ secernenti IL-10, trattasi quindi di un meccanismo fisiologico di protezione messo in atto dal sistema immune tramite le CD e le cellule Treg che può alterarsi in corso di processi patologici ed in particolare nelle malattie autoimmuni (20, 21).

La migrazione dai tessuti periferici verso le stazioni linfonodali è accompagnata dalla ridotta espressione di recettori chemochinici (CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1 e CXCR2) che legano chemochine infiammatorie e un aumento invece del recettore chemochinico CCR7 che lega il CCL21 (SLC/6Ckine) espresso dalle cellule endoteliali prossime ai vasi linfatici e il CCL19 (ELC/MIP-3 β) espresso nelle aree paracorticali ricche di linfociti T. Le CD che penetrano nei linfonodi sono quindi orientate dai gradienti delle chemochine ELC e SLC e, a loro volta, producono chemochine come la DC-CK1 e MDC, che esercitano una azione chemiotattica sui linfociti CD4^+ T naïve e memoria (22, 23). La funzionalità del recettore CCR7 è necessaria per il "trafficking" delle CD nel linfonodo dove avviene la presentazione degli antigeni ai linfociti T (24). La capacità delle CD di migrare in risposta ai ligandi del CCR7 è regolata da mediatori lipidici e da leucotrieni (25).

La maturazione delle CD è indotta da prodotti di origine batterica e virale, (es. LPS, dsDNA). Un ruolo critico nella trasmissione del segnale maturativo indotto da queste sostanze è rappresentato dalla famiglia dei Toll-like receptors (TLRs) (26) ed in particolare dal TLR4 che riconosce i derivati endotossinici, lega il fibrinogeno, l'eparansolfato e le HSP 60 e 70 mediando il processo maturativo delle CD (27). Un ulteriore segnale in grado di indurre la maturazione delle CD e di regolare lo switch tolleranza/immunità, è la coppia recettore-ligando CD40/CD154 che modula la funzione delle cellule CD4^+ T helper nella risposta immu-

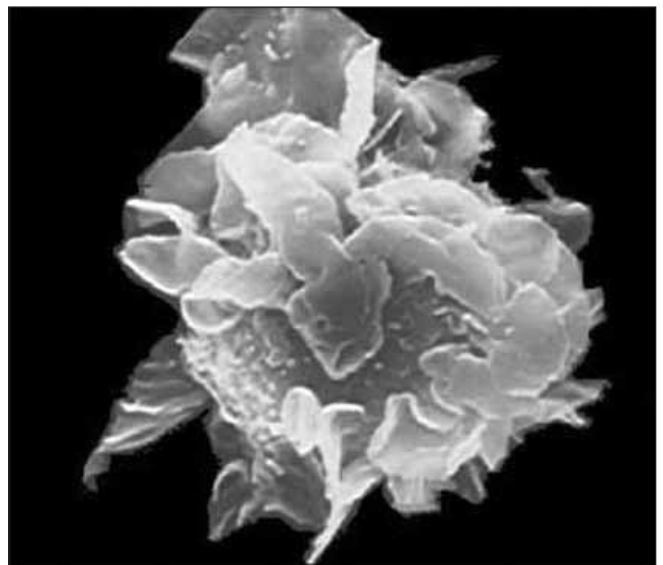


Fig. 2 - Cellula dendritica immatura.

ne anti-tumorale. Molti gruppi hanno dimostrato che anticorpi monoclonali anti CD40 e proteine solubili di fusione del CD154 (CD40L) sono in grado di attivare le CD sia *in vivo* che *in vitro* ed indurre una risposta citotossico-dipendente. La costimolazione delle CD è un momento essenziale e necessario per l'attivazione dei linfociti T. Infatti, il "cross-linking" del CD40 presente sulle CD con il CD40L, aumenta la sopravvivenza delle CD, determina variazioni fenotipiche dell'espressione di molecole di adesione e costimolatorie ed induce/aumenta la produzione di diverse citochine tra cui l'IL-12, in grado di indurre una risposta T cellulare di tipo Th1 (28-32).

Da studi effettuati *in vitro* su cellule murine è emerso che stimoli differenti inducono stadi diversi di maturazione delle CD e possono differenziare le CD semimature (quindi tolerogeniche) o mature (quindi immunogeniche) e la loro capacità di produrre citochine. Le CD completamente mature rilasciano elevati livelli di citochine proinfiammatorie (IL-12, $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 e NO) che polarizzano la risposta T-linfocitaria di tipo Th1 (33). La produzione di IL-2 da parte delle CD è necessaria per indurre il "priming" delle T cellule e potrebbe svolgere un ruolo cruciale nello "switch" dallo stato di tolleranza all'immunità. Appare quindi evidente, come la produzione di citochine accompagnata all'espressione di molecole MHC e costimolatorie sia fondamentale per l'induzione dell'immunità come le CD siano in grado di invertire questo fenomeno biologico.

Una volta giunte nel linfonodo le CD mature perdono la capacità di fagocitare gli antigeni ma allo stesso tempo diventano efficienti nell'indurre una risposta immune antigen-specifica mediata dai linfociti T. Questo diverso fenotipo di CD presenta livelli 50 volte maggiori di molecole dell'MHC rispetto ai macrofagi e forniscono un maggiore rapporto peptide/ligando. Inoltre, le CD mature sono caratte-

rizzate da elevata espressione di molecole costimolatorie (CD80, CD86, CD40, CD54, B7h, 4-1BB) e di altre molecole accessorie (DC-SIGN, LFA e TRANCE), che consentono l'attivazione dei linfociti T naïve e la loro differenziazione ed espansione in cellule T effettrici (34-36). Queste ultime, una volta lasciato il linfonodo, sono in grado di raggiungere attraverso le vie linfatiche i tessuti periferici sede dei processi infiammatori ed esplicare la risposta immunospecifica. Nel caso dei linfociti T citotossici (LTC), la funzione biologica prevede la lisi delle cellule bersaglio, ovvero la distruzione di cellule infettate da virus, di cellule neoplastiche, o persino, delle stesse CD infettate da parassiti (37).

Le Cellule Dendritiche e l'induzione della risposta T cellulare

Le CD inducono una risposta antigene-specifica mediante l'attivazione dei linfociti T naïve. I linfociti attivati vanno incontro a proliferazione e differenziamento in linfociti T effettrici. Tali processi biologici richiedono una serie di segnali:

1. Un segnale antigene-specifico fornito dal riconoscimento da parte del TCR/CD3 di un complesso peptide-MHC di classe I e II.
2. Un segnale costimolatorio fornito dall'interazione recettore/ligando CD28/B7, CD40L/CD40 ed ICOS/ICOSL, LFA-1/ICAM-1, VCAM/VLA-4 presenti rispettivamente sul linfocita T e sulla APC
3. Un segnale fornito dall'interazione fra l'IL-2 ed il suo recettore ad alta affinità che induce la proliferazione ed il differenziamento dei linfociti T naïve attivati dall'antigene in linfociti T effettrici (38, 39).

Il tipo di risposta linfocitaria al riconoscimento dell'antigene, espansione o anergia clonale, dipende dalla presenza o assenza dei sopracitati segnali. Importante è il segnale costimolatorio CD28-B7 che insieme al suo antagonista CTLA-4 regola l'omeostasi linfocitaria e agisce in sinergia con i segnali trasmessi dal TCR portando ad una aumentata produzione di IL-2 e quindi alla proliferazione dei linfociti T e differenziamento in LTC-P (precursori). Inoltre, il segnale di costimolazione nella CD determina l'incremento della produzione di citochine proinfiammatorie, nonché il completamento del processo maturativo. In assenza di segnali di costimolazione la semplice interazione TCR/antigene induce uno stato di anergia delle cellule T.

L'interazione tra le CD ed i linfociti, definita anche sinapsi immunologica, comporta non solo la proliferazione e la differenziazione delle cellule T ma anche il loro orientamento in base allo stato maturativo delle stesse CD che, come descritto in precedenza, risulta caratterizzato dal rilascio di citochine proinfiammatorie. In sintesi, le CD possono indurre tre sottoclassi linfocitarie: le cellule T di tipo Th1 caratterizzate dal rilascio di IFN γ , IL-2 ed IL-6, linfociti

di tipo Th2 con produzione di IL-4, IL-5 o cellule Treg con secrezione di IL-10 e TGF β (40).

A livello linfonodale, la sinapsi immunologica tra CD e cellule T naïve è caratterizzata *in vivo* da un dinamico succedersi di eventi: nella prima fase le cellule T che provengono dal flusso sanguigno vanno incontro a contatti brevi ma multipli con le CD riducendo progressivamente la loro motilità ed aumentando l'espressione di marker di attivazione (0-8 ore); nella seconda fase le cellule T formano dei legami stabili e durevoli con le CD e cominciano a secernere IL-2 ed IFN γ (successive 12 ore); nella terza fase che coincide con la proliferazione T cellulare, i linfociti riacquistano la loro motilità e ripetono i brevi contatti con le CD. Tali studi condotti nei topi hanno dimostrato per la prima volta la sincronia di tali interazioni che permette una attivazione appropriata dei linfociti T per l'induzione di una efficace risposta antigene-specifica (41).

Le sottoclassi di Cellule Dendritiche

Gli studi sulle CD sono stati fino ad ora ostacolati dalla rarità di tali cellule nei tessuti e nel sangue e dalla mancanza di specifici markers di lineage. Le ricerche condotte in questo ambito hanno portato alla conclusione che le CD sono una popolazione cellulare eterogenea che si può essenzialmente suddividere in due importanti sottopopolazioni: CD mieloidi (mCD) e CD plasmacitoidi (pCD) che presentano distinta origine, fenotipo e funzione (42).

Le mCD (CD1) originano da precursori mieloidi del midollo osseo e richiedono la presenza di GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) per la loro sopravvivenza (43). Nel sangue periferico umano, le mCD sono identificate come negative per i markers specifici delle cellule linfoidi (CD3, CD14, CD19, CD20, CD34 e CD56) ed invece positive per gli antigeni mieloidi CD1c (BDCA-1), CD13, CD33, HLA-DR e CD11c (44-45). Sebbene non ancora formalmente dimostrato, le mCD circolanti sono considerate la controparte *in vivo* delle mCD generate *in vitro*, sia esse derivate da monociti o cellule staminali. L'attivazione delle mCD è innescata da una varietà di fattori, (citochine proinfiammatorie come il TNF α o derivati di patogeni come LPS) e dall'interazione CD40/CD40L che porta al rilascio di elevati livelli di IL-12 e all'induzione del differenziamento dei linfociti T in cellule Th1 effettrici (46). In condizioni fisiologiche, le mCD risiedono nei tessuti periferici dove operano il controllo del microambiente per l'ingresso di antigeni dannosi e patogeni.

Le pCD (CD2) sono state identificate in sangue periferico umano ed in tessuti linfoidi come cellule plasmacitoidi HLA-DR⁺/lin⁻/CD11c⁻/CD4⁺/IL-3Ra⁺⁺ (CD123⁺⁺)/BDCA4⁺/(BDCA2⁺) e possono indurre il differenziamento delle cellule Th2 secernenti le citochine IL-4 ed IL-10. In natura le cellule Th2 sono coin-

TABELLA I - LE SOTTOCLASSI DI CELLULE DENDRITICHE

Tipologia DC	Recettori di superficie	Derivazione	Proprietà
Mieloide	HLA-DR, CD45RO, BDCA-1, BDCA-3, CD11c, CD33, CD13, ILT-3	Sangue tessuti (linfonodi, milza)	Produzione di IL-2 IL-6, TNF α
Plasmacitoide	HLA-DR, CD45RA, BDCA-2, BDCA-4, CD123	Sangue tessuti	Elevata produzione di IL-6, TNF α

volte nella risposta allergica dominata dalla produzione di IgE da parte delle cellule B e nel reclutamento di eosinofili e basofili (47). In contrasto, le cellule Th1 producendo IFN- γ promuovono la generazione di LTC e fagociti mononucleati che proteggono da virus ed altri microbi intracellulari. Studi *in vitro* hanno dimostrato che, mediatori solubili come l'IL-3, il TNF α o il CD40L aggiunti in coltura per 2-6 giorni, inducono significativi cambiamenti fenotipici e funzionali delle CD che consistono nell'attivazione/maturazione nelle pCD (48). Queste cellule coltivate *in vitro* esprimono alti livelli di molecole costimolatorie: CD40, CD80, CD86 e CD83. Inoltre, le pCD mature come le mCD sono in grado di stimolare una risposta in cellule naïve CD4⁺ di tipo alloantigenico specifica ma al contrario delle mCD, non producono IL-12 e inducono la produzione di IL-4 e IL-10 da parte di cellule T attivate, a conferma del fatto che le pCD attenuano la risposta di tipo Th1 dannosa per l'organismo (49-50).

Le CD assumono quindi un ruolo critico nell'induzione della tolleranza periferica regolando il tipo di risposta immune di tipo T (Tab. I).

Test di verifica

1) Le cellule dendritiche con capacità di endocitosi presentano un fenotipo caratterizzato da:

- a. Bassi livelli di molecole costimolatorie
- b. Elevati livelli di molecole costimolatorie e bassi livelli di MHC II
- c. Elevati livelli di molecole MHC I
- d. Capacità migratorie
- e. Rilascio di citochine proinfiammatorie.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

Ruolo delle Cellule Dendritiche nell'immunità

Le CD rappresentano, quindi, una popolazione cellulare eterogenea presente nel sangue e in tessuti periferici caratterizzata dalla capacità di fagocitare e presentare antigeni alle cellule immunocompetenti. L'efficienza nell'attivare la risposta immune è tale che anche un basso numero di CD è in grado di generare una potente risposta T cellulare specifica contro virus, patogeni e antigeni tumorali. Questa funzione risulta essere fondamentale nell'approccio alla terapia cellulare anti-cancro.

Diversi sono i meccanismi attraverso i quali il tumore può bloccare l'attività immunitaria antineoplastica. È stato dimostrato che esiste una immunosoppressione locale esercitata dal tumore che coinvolge, in primo luogo, le CD. Un ruolo rilevante è sostenuto dalla IL-10 prodotta dal tumore. Essa determina una inibizione della differenziazione delle CD, inibisce l'espressione di molecole costimolatorie e blocca la produzione di IL-12 (51-53). Sono inoltre stati individuati altri fattori inibenti la maturazione delle CD quali il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) prodotto dal tessuto tumorale (54, 55). Numerosi autori hanno dimostrato che le CD mature coltivate ed "istruite" opportunamente *in vitro*, possono ripristinare l'avvio del meccanismo immunitario. In particolare, CD caricate con peptidi tumorali o fuse con cellule neoplastiche inducono, nel topo, protezione contro successive inoculazioni di cellule tumorali o il rigetto tumorale (56).

Attualmente, lo sviluppo di vaccini per il trattamento del cancro è ostacolato da vari fattori: scarsa identificazione di antigeni in grado di focalizzare la specificità della risposta del sistema immune contro le cellule tumorali senza danneggiare le cellule normali; lo sviluppo di vaccini capaci di attivare una risposta immune che eradichi completamente il tumore, nonostante si sia instaurata la tolleranza immunologica verso differenti antigeni tumorali; la difficoltà di bloccare meccanismi attraverso i quali il tumore riesce ad evadere la risposta immune dell'ospite (57). In questo con-

testo così complesso, l'immunoterapia basata sull'uso di CD di derivazione periferica o staminale appare una alternativa valida per lo sviluppo di un vaccino anti-tumorale.

Per definizione un preparato vaccinale con CD prevede l'isolamento e il caricamento delle stesse con un antigene, per esempio un antigene tumore-associato, e l'opportuna attivazione delle CD (maturazione) affinché vengano espresse quelle molecole costimolatorie così rilevanti nell'induzione di una risposta T cellulare specifica contro il tumore. Le CD così attivate vengono iniettate, solitamente per via intradermica, nei pazienti con tumore al fine di ottenere una vaccinazione di tipo autologo. La prima somministrazione di un vaccino così disegnato è stata effettuata nel 1996 in pazienti con linfoma a cellule B (58). Ad oggi, numerosi vaccini con CD caricate con formati antigenici diversi sono stati utilizzati in trials clinici per valutare la risposta *in vitro* e *in vivo* in pazienti affetti da neoplasia. Numerosi autori hanno dimostrato che le CD mature coltivate e "programmate" opportunamente *in vitro*, possono ripristinare la risposta immune (59-62).

Un recente stato dell'arte sull'immunoterapia con CD per la cura del cancro ha messo in evidenza un crescente interesse per questo approccio terapeutico e soprattutto ha indicato quali sono le problematiche da risolvere per rendere sempre più efficiente il vaccino così strutturato. Figdor et al (63) hanno tracciato una serie di linee guida cui dovrebbero attenersi tutti i gruppi di ricerca clinica che sviluppano tali vaccini al fine di ottenere risultati più affidabili e confrontabili in questo ambito. I parametri presi in considerazione sono i seguenti:

- 1) L'isolamento delle CD
- 2) La sottoclasse di CD
- 3) Il caricamento delle CD con l'antigene in diversi formati: lisati di tessuti o linee cellule tumorali, peptidi di classe I e II derivati da antigeni tumore-associati, RNA derivato da tessuti o linee cellulari tumorali o CD che esprimono trasgeni
- 4) Il tipo di attivazione delle CD
- 5) La via di somministrazione di CD trattate *ex vivo*
- 6) Il targeting delle CD *in vivo*.

Un altro dato, allo stato attuale incontrovertibile è, nella maggioranza dei casi, la mancanza di trials clinici con un numero adeguato di pazienti aderenti allo studio e le cui conseguenze appaiono chiare di per sé. Ciò non toglie che risultati entusiasmanti siano stati ottenuti *in vivo* in alcune tipologie di cancro, quali il carcinoma prostatico con una percentuale di pazienti che ha risposto alla terapia con riduzione del 20% dei livelli di PSA e stabilizzazione della malattia (64). Tali risultati ottenuti *in vivo* hanno inoltre dimostrato l'assoluta tollerabilità del trattamento e l'ottenimento di risposte immunologiche, cliniche ed assenza di fenomeni di autoimmunità.

Il principale obiettivo sarà, nei prossimi anni, non solo la messa appunto di un vaccino efficace nelle varie forme di neoplasia, ma anche la possibilità di poter trat-

tare pazienti nello stato iniziale della malattia. Tale terapia infatti, viene attualmente somministrata ai pazienti metastatici, quando i trattamenti di prima linea di fatto si sono dimostrati inefficaci.

Immunoterapia per la cura del carcinoma renale

Il carcinoma renale (R) è un tumore solido non molto diffuso, infatti il R rappresenta circa il 3% delle neoplasie maligne dell'adulto e la sua incidenza risulta in continuo aumento (65). Il tipo istologico più comune di R è il carcinoma a cellule chiare (CC) che deriva dal tubulo renale prossimale. Trattasi della neoplasia più comune del rene (70-80% dei casi) che sembra rispondere ad approcci immunoterapici. Sebbene il trattamento di elezione per il RCC localizzato sia la nefrectomia radicale, tale approccio non è risolutivo nei casi di stato avanzato della malattia o di metastasi. Chemioterapici utilizzati singolarmente o in associazione, e terapie ormonali non sembrano mostrare efficacia con un il tasso di risposta che si aggira intorno al 10%. Data la limitata risposta a tali terapie, urge l'identificazione di nuovi agenti terapeutici per la cura del RCC.

Il RCC appartiene a quel gruppo di neoplasie maligne nelle quali è stata dimostrata una risposta immune antitumorale. Questa osservazione si basa sull'evidenza che:

1. Si verificano remissioni spontanee di lesioni metastatiche in casi istologicamente documentati con una frequenza variabile tra lo 0.1-0.5%.
2. Possono essere indotte remissioni parziali o complete di lesioni metastatiche in corso di terapia sistemica con IL-2 ricombinante o IFN- γ ricombinante (66)
3. Nella massa neoplastica è presente un infiltrato linfocitario (CD8⁺, CD4⁺) che, espanso *in vitro*, è dotato di attività citolitica.

Ne deriva che uno dei più promettenti approcci terapeutici è costituito dalla immunoterapia. In questi ultimi anni è stato evidenziato il ruolo delle CD nella modulazione della risposta immune antineoplastica dell'ospite. La possibilità di generare CD da monociti del sangue periferico, in presenza di GM-CSF ed IL-4, ha reso tali cellule candidate ideali per la terapia immunologica e genica contro il R (67-69). Sono attualmente in corso diversi trials in Europa e negli Stati Uniti che prevedono l'uso delle CD per il trattamento del RCC (70-73). Presso la nostra sezione di Nefrologia del Dipartimento Emergenza e Trapianti di Organi è in atto un protocollo clinico basato sull'infusione di CD autologhe del paziente neoplastico caricate con lisato di una linea cellulare tumorale renale allogeneica con caratteristiche di elevata immunogenicità, previamente testata *in vitro*. Il progetto prevede come primo obiettivo la messa a punto di metodi di coltura per l'ottenimento di CD *ex vivo* ad alto potere immunogeno per uso clinico, la valutazione dell'efficacia biologica del vaccino

e la standardizzazione della metodica di produzione del vaccino. L'obiettivo clinico include il reclutamento dei pazienti eleggibili, il monitoraggio clinico dei pazienti, la verifica della fattibilità, tollerabilità ed efficacia clinica del trattamento nonché il monitoraggio immunologico *in vivo* (determinazione della frequenza costitutiva e indotta dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ specifici per antigeni associati al RCC durante e al termine della somministrazione vaccinale, "trafficking" dopo somministrazione intradermica delle CD marcate con 111Indio, valutazione dell'ipersensibilità ritardata con test cutaneo, DTH).

È inoltre oggetto di studio la valutazione della presenza delle sottoclassi CD1 e CD2 nel sangue periferico di pazienti RCC (Fig. 3).

È stato riscontrato che, rispetto ai soggetti normali, i pazienti con RCC mostrano una riduzione numericamente significativa delle CD mieloidi e plasmacitoidi (74). Tali risultati hanno indirizzato la ricerca alla caratterizzazione delle CD nei tessuti tumorali renali dove ipoteticamente risultano localizzate le CD, grazie alla attuale disponibilità di marcatori specifici che riconoscono antigeni specifici dei due differenti sottogruppi di CD nel sangue periferico: BDCA-1 (CD1), BDCA-2 (CD2) e BDCA-3 (CD1).

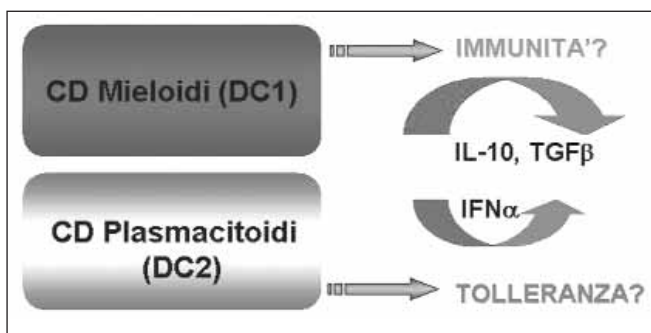


Fig. 3 - Ipotesi del ruolo delle sottoclassi di cellule dendritiche nell'indurre immunità o tolleranza nel carcinoma renale.

La possibilità di identificare le CD1 e le CD2 nel tessuto RCC consentirà di capire il ruolo di tali cellule nell'induzione della risposta immune, di studiare l'eventuale stato di attivazione e conseguentemente la loro funzione biologica *in situ* (Fig. 4). L'implicazione più importante di questi studi sarà l'ottimizzazione delle preparazioni vaccinali con CD in grado di indurre una più potente risposta immunologica tumore-specifica.

Test di verifica

1) Che tipo di terapia somatica è stata utilizzata per la cura del carcinoma renale?

- Immunoterapia con cellule T attivate
- Immunoterapia con cellule T attivate e CD attivate
- Immunoterapia con CD mature
- Immunoterapia con monociti attivati
- Immunoterapia con CD di derivazione plasmacitoide.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

Le Cellule Dendritiche sono coinvolte nella autoimmunità

Le CD non sono semplicemente gli iniziatori della risposta immune T-mediata infatti le CD catturano anche antigeni che non sono normalmente bersagli del sistema immune. Questi includono proteine normalmente presenti nel microambiente di tessuti del tratto respiratorio, digestivo (75) e nel rene, oppure antigeni self derivati da tessuti con un turnover cellulare costitutivamente elevato. L'endocitosi di antigeni *self* in uno stato stazionario, in assenza di stimoli che attivino il processo di maturazione, permette alle

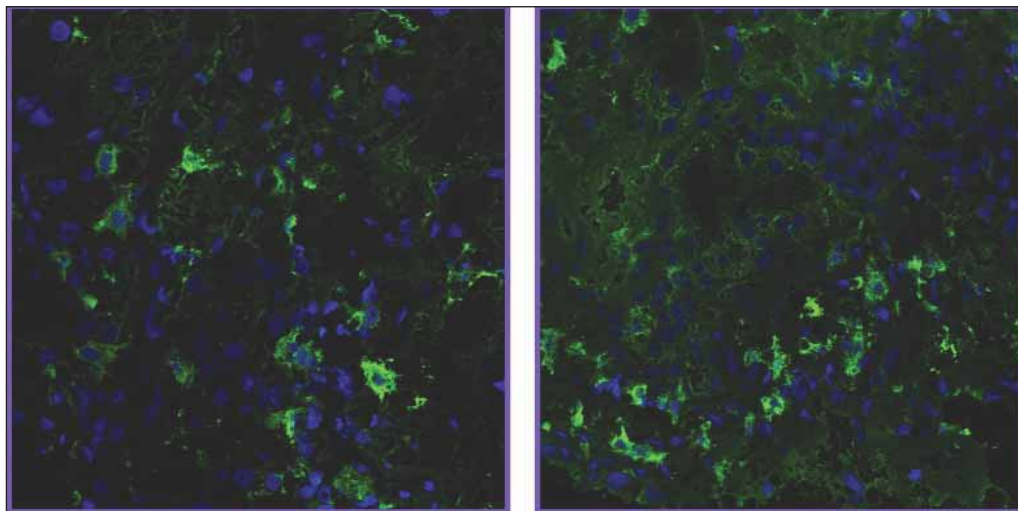


Fig. 4 - Analisi confocale di cellule dendritiche mieloidi in tessuto RCC (in verde il marker BDCA-1 ed in blu i nuclei marcati con TO-PRO).

CD immature di presentarli ai linfociti CD4⁺ e CD8⁺ attivando così una parziale o completa tolleranza attraverso la delezione o l'induzione di mancata risposta immune, consentendo così il controllo della tolleranza verso gli antigeni *self* ed i normali costituenti ambientali (76). Per cui la tolleranza immunologica previene le reazioni contro antigeni *self*, in tale meccanismo di controllo e mantenimento dell'omeostasi del sistema immune, sono coinvolte le CD. L'alterazione dei meccanismi di riconoscimento di antigeni *self* o il blocco di cloni autoreattivi porta all'autoimmunità (77). Le patologie autoimmuni che si sviluppano in individui con suscettibilità genetica sono caratterizzate da: modificazioni di macromolecole *self* o alterazioni nella loro presentazione ai linfociti; rilascio di antigeni *self* normalmente sequestrati in circolo; accesso di immunogeni in siti di norma immunologicamente privilegiati; alterazioni della maturazione dei linfociti o della risposta immune. Antigeni derivati da batteri e virus possono cross-reagire con antigeni *self* e quindi iniziare o amplificare i meccanismi descritti. Alle CD presenti nel timo è stata attribuita la capacità di eliminare cellule T autoreattive. Recenti pubblicazioni suggeriscono che le CD hanno un ruolo nella patogenesi dell'autoimmunità (78, 79), infatti ad oggi, le CD sono le uniche APC in grado di indurre patologie autoimmuni. Il cronico stato di attivazione e maturazione delle CD tessutali quando esposte a potenti stimoli maturativi ed elevati livelli di antigeni *self* nel loro microambiente nativo può scatenare gravi malattie autoimmuni organo-specifiche e autoimmunità sistemica. La comprensione del ruolo delle CD nelle patologie autoimmuni risiede, in parte, nello studio diretto di queste APC nei tessuti dei soggetti affetti da autoimmunità. Le CD sono presenti nel siero e nel fluido sinoviale di pazienti con artrite giovanile o cronica, psoriasi, diabete, tiroidite e sindrome di Sjögren (80). Tali CD presentano caratteristiche inusuali nei pazienti con malattie autoimmuni spesso associate a mutazioni di geni delle CD. Nella sindrome di Wiskott-Aldrich (WAS) mutazioni del gene ad essa associato presentano una marcata ridotta motilità ed una anomala organizzazione del citoscheletro (81) che portano ad una alterata migrazione, maturazione e "trafficking" delle CD *in vivo*.

Ruolo delle Cellule Dendritiche nel LES

Il LES è una malattia autoimmune sistemica che coinvolge diversi organi. Cute, articolazioni, cuore, cervello e reni possono diventare il target dei processi infiammatori in atto all'esordio e durante il decorso della malattia. Il LES è caratterizzato dall'alterazione della tolleranza immunologica verso componenti nucleari e da profonde alterazioni del sistema immune (82). I soggetti colpiti da LES mostrano una marcata leucopenia, con linfopenia che colpisce sia le cellule B (naïve e memoria), sia le cellule T (83) e una produzione di autoanticorpi diretti contro DNA, RNA e pro-

teine ad essi associate (84, 85). Elevati livelli di immunocomplessi derivanti da tale alterazione immunologica sono considerati una delle cause più probanti della nefrite lupica mediata anche dalla conseguente attivazione del complemento.

È stato dimostrato il coinvolgimento delle CD nella risposta ai processi infiammatori in modelli sperimentali di LES (83). Inoltre, livelli elevati di IFN α sono stati riscontrati nel siero di pazienti con LES. Tale dato è stato collegato con una caratteristica fondamentale delle pCD: esse producono IFN α non solo in risposta a stimoli microbici ma anche alla formazione di complessi di autoanticorpi/DNA presenti in circolo nei soggetti con LES (84). È stato quindi attribuito un ruolo importante alle CD nella patogenesi di questa malattia autoimmune. L'ipotesi prospettata da Banchereau et al (86) per spiegare il ruolo delle CD nel LES è la seguente: le pCD attivate dai virus rilasciano alti livelli di IFN α che inducono la differenziazione dei monociti in CD capaci di catturare, processare e presentare corpi apoptotici presenti in circolo. Tali CD maturate dall'IFN α non solo presentano antigeni *self* alle cellule CD4⁺ autoreattive ma sostengono direttamente la proliferazione e differenziazione delle cellule B (CD38⁺). Questo processo, che viene definito da Banchereau "menage à trois", genera un alto numero di plasmacellule secernenti autoanticorpi che legano, a loro volta, i nucleosomi circolanti, dando luogo alla formazione di immunocomplessi che non fanno altro che sostenere la produzione di IFN α da parte delle pCD, chiudendo così un circolo di attivazione immunologica che attiva complemento.

I macrofagi producono diversi componenti del complemento e sono considerati la fonte principale di C1q. La sintesi locale di C1q da parte dei macrofagi è considerata essenziale nel prevenire l'accumulo di materiale *self* di scarto dei processi biologici. Il C1q si lega alla superficie di cellule apoptotiche facilitandone così la cattura da parte dei macrofagi. Nei topi con deficit di C1q si verifica un accumulo di corpi apoptotici che porta a necrosi cellulare e successivo instaurarsi di processi infiammatori. Ciò è quanto si verifica nei soggetti con deficit di C1q e che sviluppano un fenotipo di LES molto severo (87).

Recenti studi hanno evidenziato la capacità delle CD immature di derivazione monocitaria o staminale di sintetizzare C1q funzionale, il cui deficit è appunto causa di autoimmunità. La produzione di C1q è fortemente ridotta in CD maturate *in vitro* e la differenziazione condotta in presenza di IFN α accelera la maturazione delle CD e ne riduce fortemente la produzione di C1q (88). In sintesi, questi risultati indicano che le CD immature C1q⁺ con caratteristiche tolerogeniche possono attivare localmente il complemento e che la riduzione di C1q può indurre una alterata clearance dei corpi apoptotici e degli immunocomplessi nonché una ridotta difesa nei confronti di agenti infettivi. Attualmente sono oggetto di studio i livelli circolanti di pCD e mCD e la loro localizzazione tessutale per

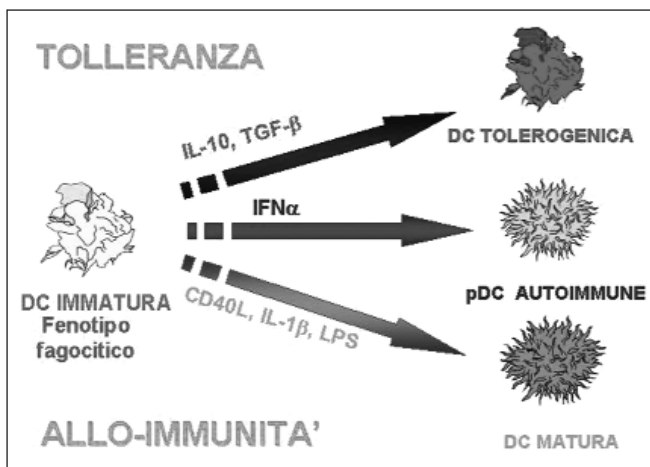


Fig. 5 - Schema rappresentante le sottoclassi di cellule dendritiche, gli stimoli di attivazione e le loro funzioni biologiche nel controllo del sistema immunitario.

meglio comprenderne la funzione biologica nei pazienti affetti da LES (89, 90).

Test di verifica

1) Quali sottoclassi di cellule dendritiche possono indurre l'autoimmunità?

- a. CD plasmacitoidi
- b. CD mieloidi e plasmacitoidi
- c. CD mieloidi
- d. CD di derivazione staminale
- e. Tutte le precedenti.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

Prospettive

La complessità e l'eterogeneità della popolazione delle CD lascia ancora insolte molte risposte sulle modalità funzionali così diverse e contraddittorie che esse svolgono nella risposta immune. Questo aspetto costituisce uno dei campi di ricerca più stimolanti e più suscettibili di applicazione clinica nello studio delle CD (Fig. 5).

L'immunoterapia basata sull'uso delle CD si è dimostrata una realtà con risultati positivi di fattibilità, non tossicità ed efficacia in alcuni pazienti trattati con CD opportunamente maturate ed attivate. Stanno emergendo nuove funzioni biologiche delle CD e risultati *in vivo* in modelli sperimentali e nell'uomo fanno sperare in continui miglioramenti nel potenziamento della risposta immune.

La maggior parte dei protocolli clinici di vaccinazione sono ovviamente orientati alla stimolazione della risposta immune antigene-specifica ma non è l'unico campo di applicazione di terapia somatica. Infatti, per il trattamento delle neoplasie, l'assunto che le CD immature silenzino la risposta immune ne suggerisce un ruolo potenzialmente cruciale per le applicazioni cliniche nell'autoimmunità e in campo trapiantologico.

Un sempre più alto numero di studi preclinici sono focalizzati sulla capacità delle CD immature di indurre una mancata risposta antigene-specifica o tolleranza immunologica, dopo cattura e processazione dell'antigene. Le CD immature trattate con agenti quali il desametasone (91, 92), la vitamina D3 (93) ed inibitori dei precursori del fattore di trascrizione NF-κB (94) potrebbero indurre la tolleranza periferica o potrebbero silenziare la risposta immune per delezione delle cellule T o attivazione delle Treg (95).

L'ottimizzazione delle preparazioni vaccinali e studi controllati che aderiscano a precise linee guida di preparazione dei vaccini porteranno a terapie di incontrovertibile efficacia per la cura delle neoplasie e delle malattie autoimmuni.

Riassunto

Le cellule dendritiche (CD) sono le più potenti cellule presentanti l'antigene e svolgono un ruolo centrale nella regolazione, modulazione e mantenimento della risposta immune cellulare contro patogeni e antigeni tumorali. Esse hanno la capacità di catturare antigeni nel microambiente tessutale, di migrare a livello delle stazioni linfonodali, di processare e presentare gli epitopi antigenici ai linfociti T. Le CD rappresentano una popolazione eterogenea in quanto sono stati individuati nell'uomo due tipi distinti di precursori mieloidi e linfoidi da cui originano rispettivamente CD funzionalmente diverse: CD1 e CD2. Queste due sottopopolazioni attivate inducono le T cellule naïve a produrre IFN-γ indicatore della risposta Th1 (CD1) oppure stimolano le T cellule naïve a produrre citochine tipiche della risposta Th2 (CD2).

In corso di neoplasia, le CD fagocitano le cellule tumorali apoptotiche o necrotiche e presentano ai linfociti T gli antigeni tumorali processati attivando una risposta antigene-specifica. Sottopopolazioni specifiche di CD opportunamente trattate *ex vivo* con antigeni tumorali (peptidi, lisati tumorali, proteine ricombinanti o RNA) ed attivate con molecole costimolatorie sono candidate ideali per lo sviluppo di protocolli di immunoterapia per il trattamento del carcinoma renale. Un ruolo cruciale è svolto dalle CD nel mantenimento della tolleranza periferica ed alterazioni delle CD possono indurre malattie autoimmuni, tra cui il Lupus Eritematoso Sistemico (LES), dove le CD2 secernenti IFNα potrebbero spiegare i disordini immunologici presenti in questa malattia.

L'ottimizzazione delle preparazioni vaccinali e studi con-

trollati che aderiscano a precise linee guida di preparazione porteranno a terapie efficaci per la cura delle neoplasie e delle malattie autoimmuni.

Ringraziamenti

Per la revisione critica del presente manoscritto si ringraziano i Proff. Loreto Gesualdo e Giuseppe Grandaliano le Dr.sse Antonella Blasi e Paola Pontrelli e il Dr. Giuseppe Castellano. Si ringraziano per la collaborazione scientifica e

tecnica le Dr.sse Virna Petruzzelli, Antonella Loverre e Lea Roca e il Dr. Giuseppe Stefano Netti.

Indirizzo degli Autori:
 Prof.ssa Elena Ranieri
 Cattedra di Patologia Clinica
 Dipartimento di Scienze Biomediche
 Università di Foggia
 Ospedali Riuniti
 Viale Pinto, 1
 71100 Foggia
 e-mail: e.ranieri@unifg.it

Bibliografia

- Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated Antigen Processing Machines. *Cell* 2001; 106: 255-8.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685-711.
- Shortman K, Heath WR. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol* 2001; 2: 988-9.
- Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193: F5-9.
- von Herrath M, Homann D. Introducing baselines for therapeutic use of regulatory T cells and cytokines in autoimmunity. *Trends Immunol* 2003; 24: 540-5.
- Walker LS, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 11-9.
- Silverstein A. A history of immunology. Academic Press 1989.
- Mapara MY, Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1136-51.
- Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 477-83.
- Randolph GJ. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin Immunol* 2001; 13: 267-74.
- Maric I, Holt PG, Perdue MH, Bienenstock J. Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine. *J Immunol* 1996; 156: 1408-14.
- Kamath AT, Pooley J, O'Keefe MA, et al. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol* 2000; 165: 6762-70.
- Henri S, Vremec D, Kamath A, et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 2001; 167: 741-8.
- Thurner B, Roder C, Dieckmann D, et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 1999; 223 (1): 1-15.
- Engering A, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Immune escape through C-type lectins on dendritic cells. *Trends Immunol* 2002; 23: 480-5.
- Verbovetski I, Bychkov H, Trahtemberg U, et al. Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J Exp Med* 2002; 196: 1553-61.
- Schulz O, Pennington DJ, Hodivala-Dilke K, Febbraio M, Reis e Sousa C. CD36 or alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins are not essential for MHC class I cross-presentation of cell-associated antigen by CD8 alpha+ murine dendritic cells. *J Immunol* 2002; 168: 6057-65.
- Nauta AJ, Castellano G, Xu W, et al. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J Immunol* 2004; 173: 3044-50.
- Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23: 445-9.
- Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001; 2: 725-31.
- Menges M, Rossner S, Voigtlander C, et al. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 2002; 195: 15-21.
- de Vries IJ, Eggert AA, Scharenborg NM, et al. Phenotypical and functional characterization of clinical grade dendritic cells. *J Immunother* 2002; 25: 429-38.
- Vissers JL, Hartgers FC, Lindhout E, Teunissen MB, Figdor CG, Adema GJ. Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets *in vitro* and *in vivo*. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 785-93.
- Cravens PD, Lipsky PE. Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 497-505.
- Robbani DF, Finch RA, Jager D, Muller WA, Sartorelli AC, Randolph GJ. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 2000; 103: 757-68.
- Rescigno M, Borrow P. The host-pathogen interaction: new themes from dendritic cell biology. *Cell* 2001; 106: 267-70.
- Kaisho T, Akira S. Dendritic cells function in toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol* 2002; 22: 78-83.
- Stout RD, Suttles J. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol Today* 1996; 17: 487-92.
- Mackey MF, Barth RJ, Noelle RJ. The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 418-28.
- van Kooten C. Immune regulation by CD40-CD40-I interactions. *Front Biosci* 2000; 5: D880-893.
- Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, et al. A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-

- gamma treatment. *Blood*. 2000; 96: 3499-504.
32. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998; 393: 478-80.
 33. Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, et al. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res* 2004; 64: 5934-7.
 34. Vegh Z, Mazumder A. Generation of tumor cell lysate-loaded dendritic cells preprogrammed for IL-12 production and augmented T cell response. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 67-79.
 35. Lee AW, Truong T, Bickham K, et al. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine*. 2002; 20 Suppl 4:A8-A22.
 36. Rouard H, Marquet J, Leon A, et al. IL-12 secreting dendritic cells are required for optimum activation of human secondary lymphoid tissue T cells. *J Immunother* 2002; 2: 324-33.
 37. Mackey MF, Barth RJ Jr, Noelle RJ. The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, an effector function of helper and cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 418-28.
 38. Kenneth A. Frauwrith and Craig B. Thompson Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest*. 2002; 109: 295-9.
 39. Coulis PG, Somville M, Lehmann F, et al. Precursor frequency analysis of human cytolytic T lymphocytes directed against autologous melanoma cells. *Int J Cancer* 1992; 50: 289-97.
 40. de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol*. 2004.
 41. Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 2004; 427: 154-9.
 42. Arpinati M, Chirumbolo G, Urbini B, Perrone G, Rondelli D, Anasetti C. Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 2003; 11: 345-56.
 43. Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 18: 83-93.
 44. Robinson SP, Patterson S, English N, Kampgen E, Lenz A, Schuler G. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2769-78.
 45. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; 82: 487-93.
 46. Cella M, Scheiddeger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184: 747-52.
 47. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787-93.
 48. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90: 3245-87.
 49. Kadawaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2000; 192: 219-26.
 50. Gilliet M, Liu YJ. Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum Immunol* 2002; 63: 1149-55.
 51. Gu L, Tseng SC, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol* 1999; 72: 7-29.
 52. Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 2000; 72:391-8.
 53. Gormand F, Briere F, Peyrol S, et al. CD40 expression by human bronchial epithelial cells. *Scand J Immunol* 1999; 49: 355-61.
 54. Takahashi A, Kono K, Ichihara F, Sugai H, Fujii H, Matsumoto Y. Vascular endothelial growth factor inhibits maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, but not by proinflammatory cytokines. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 543-50.
 55. Lissoni P, Malugani F, Bonfanti A, et al. Abnormally enhanced blood concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastatic cancer patients and their relation to circulating dendritic cells, IL-12 and endothelin-1. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; 15: 140-4.
 56. Fields RC, Shimizu K, Mule JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9482-7.
 57. Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, et al. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* 2004; 113: 1515-25.
 58. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1996; 2: 52-8.
 59. Herr W, Ranieri E, Olson W, Zarour H, Gesualdo L, Storkus WJ. Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysate define an effective *in vitro* vaccine designed to elicit EBV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte responses. *Blood* 2000; 96: 1857-64.
 60. Herr W, Ranieri E, Gambotto A, et al. Identification of naturally-processed HLA-presented Epstein-Barr virus peptides recognized by CD4⁺ or CD8⁺ T-lymphocytes from human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 12033-38.
 61. Ranieri E, Herr W, Gambotto A, et al. Dendritic cells transduced with adenoviral vector encoding the Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein 2B: a new modality for vaccination. *J Virol*. 1999; 73: 10416-25.
 62. Kierstead LS, Ranieri E, Olson W, et al. gp100/pmel17 and tyrosinase encode multiple epitopes recognized by Th1-type CD4⁺T cells. *Br J Cancer* 2001; 85: 1738-45.
 63. Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 2004; 10: 475-80.
 64. Ragde H, Cavanagh WA, Tjoa BA. Dendritic cell based vaccines: progress in immunotherapy studies for prostate cancer. *J Urol* 2004; 172: 2532-8.
 65. Finke J, Kierstead LS, Ranieri E, Storkus WJ. Immunologic Response to RCC. *Renal Cell Carcinoma, Molecular Biology, Immunology and Clinical Management*. Editors: R.M. Bukowski and A.C. Novick. Totowa, Nj, Humana Press, Inc. 39-62, 2000.
 66. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985; 313: 1485-92.
 67. Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E, et al. Disease-Associated Bias in Th1/Th2 CD4⁺ T Cell Responses Against MAGE-6 in HLA-DRB1*0401+ Patients With Renal Cell Carcinoma or Melanoma. *J Exp Med* 2002; 196: 619-28.
 68. Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E, et al. MAGE-6 encodes HLA-DR1*0401-presented epitopes recognized by CD4⁺ T cells from patients with melanoma or RCC. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 947-54.
 69. Tatsumi T, Herrem CJ, Olson WC, et al. Disease stage variation in CD4⁺ and CD8⁺ T cell-reactivity to the receptor tyrosine kinase EphA2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 4481-9.
 70. Holtl L, Rieser C, Papesh C, et al. Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells. *J Urol* 1999; 161: 777-82.
 71. Marten A, Flieger D, Renoth S, et al. Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 637-44.
 72. Oosterwijk-Wakka JC, Tiemessen DM, Bleumer I, et al. Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells pulsed with autologous tumor antigens in combination with interleukin-2: a phase I study. *J Immunother* 2002; 25: 500-8.
 73. Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, et al. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3369-76.
 74. A. Blasi, L. Roca, V. Petruzzelli, et al. Characterization of peripheral dendritic cell (DC) subsets and its implication in patients affected by IgA nephropathy (IgAN) and renal cell carcinoma

- (RCC): a possible bridge between tolerance and autoimmunity. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 336A.
75. Vermaelen KY, Carro-Muino I, Lambrecht BN, Pauwels RA. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med* 193: 51-60, 2001.
 76. Bayry J, Thirion M, Delignat S, et al. Dendritic cells and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2004; 3: 183-7.
 77. Ludewig B, Odermatt B, Landmann S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *J Exp Med* 1998; 188: 1493-501.
 78. Turley SJ. Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14: 765-70.
 79. Drakesmith H, Chain B, Beverley P. How can dendritic cells cause autoimmune disease? *Immunol Today* 2000; 21: 214-7.
 80. Quadbeck B, Eckstein AK, Tews S, et al. Maturation of thyroidal dendritic cells in Graves' disease. *Scand J Immunol* 2002; 55: 612-20.
 81. Binks M, Jones GE, Brickell PM, Kinnon C, Katz DR, Thrasher AJ. Intrinsic dendritic cell abnormalities in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3259-67.
 82. Palucka AK, Banchereau J, Blanco P, Pascual V. The interplay of dendritic cell subsets in systemic lupus erythematosus. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 484-8.
 83. Peterson KS, Huang JF, Zhu J, et al. Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *J Clin Invest* 2004; 113: 1722-33.
 84. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001; 294: 1540-3.
 85. Banchereau J, Fay J, Pascual V, Palucka AK. Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Novartis Found Symp* 2003; 252: 226-35; discussion 235-8, 257-67.
 86. Banchereau J, Pascual V, Palucka AK. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation. *Immunity* 2004; 20: 539-50.
 87. Castellano G, Woltman AM, Schena FP, Roos A, Daha MR, van Kooten C. Dendritic cells and complement: at the cross road of innate and adaptive immunity. *Mol Immunol* 2004; 41: 133-40.
 88. Castellano G, Woltman AM, Nauta AJ, et al. Maturation of dendritic cells abrogates C1q production *in vivo* and *in vitro*. *Blood* 2004; 103: 3813-20.
 89. Jahnsen FL, Farkas L, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P. Involvement of plasmacytoid dendritic cells in human diseases. *Hum Immunol* 2002; 63: 1201-5.
 90. Belz GT, Heath WR, Carbone FR. The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 463-8.
 91. Rea D, van Kooten C, van Meijgaarden KE, Ottenhoff TH, Melief CJ, Offringa R. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* 2000; 95: 3162-7.
 92. L. Roca, S. Di Paolo, V. Petruzzelli, et al. Dexamethasone and endogenous steroids modulate immune response through different mechanisms: from dendritic cells to effector T-cell. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 519A.
 93. Adorini L, Penna G, Giarratana N, Uskokovic M. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *J Cell Biochem* 2003; 88: 227-33.
 94. Martin E, O'Sullivan B, Low P, Thomas R. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* 2003; 8: 155-67.
 95. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002; 99: 351-8.