



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**Università degli Studi di Padova**

Dipartimento di Pediatria

Scuola di Dottorato di Ricerca in  
Medicina dello Sviluppo e Scienze Della Programmazione

Indirizzo di Ematonecologia ed Immunologia  
CICLO XXII

**Studio dei circuiti di controllo in  
sottopopolazioni di cellule mieloidi  
soppressive indotte dalla crescita tumorale**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

**Supervisore:** Dott. Vincenzo Bronte

**Dottorando:** Dott.ssa Elisa Peranzoni



# INDICE

<b>SUMMARY</b> .....	<b>1</b>
<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>3</b>
Cellule mieloidi soppressorie (MDSC) .....	5
Meccanismi pro-tumorali non immunologici delle MDSC .....	8
Immunosoppressione .....	9
ARG1 .....	11
iNOS/NOS2 .....	12
Cooperazione tra ARG1 e NOS2.....	13
Espansione e reclutamento delle MDSC.....	18
IL-3 .....	19
GM-CSF .....	19
VEGF .....	21
SCF .....	22
PGE2/COX2 .....	22
IL-1 $\beta$ /IL-6/M-CSF.....	23
S100A8/S100A9.....	23
CCL2 .....	24
Exosomi .....	24
Attivazione delle MDSC.....	25
Fenotipo e sottopopolazioni delle MDSC .....	26
MDSC umane .....	28
Targeting terapeutico delle MDSC.....	30
miRNA e mielopoiesi .....	31
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>33</b>
Linee cellulari .....	33
Topi.....	33
Sorting immunomagnetico .....	34
Saggio E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) .....	34
Citofluorimetria.....	35
Colture leucocitarie miste stimolate con peptide (MLPC) .....	35
Valutazione della citotossicità mediante saggio di rilascio di <sup>51</sup> Cromo .....	36
Saggio di proliferazione per diluizione di CFSE .....	37
Tolleranza in vivo.....	37
Saggio ELISPOT (Enzyme-Linked Immunoassorbent Spot Assay).....	38
Matrigel e immunoistochimica .....	38
Induzione di metastasi .....	38
Colorazione May-Grünwald-Giemsa.....	39
Colture di BM-MDSC da midollo osseo .....	39
Trasfezione di cellule di midollo osseo con miRNA maturi.....	39
Clonaggio in pMIR-REPORT .....	40
Test luciferasi .....	40
miRNA Chip.....	40
Analisi statistica .....	41
<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>43</b>
<b>RISULTATI</b> .....	<b>45</b>
Isolamento di sottopopolazioni di MDSC mediante sorting immunomagnetico .....	45
Il silenziamento del GM-CSF nel tumore 4T1 provoca una riduzione nell'accumulo di sottopopolazioni mieloidi soppressive .....	49
La popolazione CD11b <sup>+</sup> ha ridotta capacità immunosoppressiva in animali con tumore in cui il GM-CSF è silenziato.....	53
Il silenziamento del GM-CSF nelle cellule neoplastiche altera la crescita, l'angiogenesi e la capacità invasiva del tumore.....	56
MDSC originate <i>in vitro</i> da colture di midollo come modello per lo studio delle sottopopolazioni mieloidi ...	59
Studio di miRNA coinvolti nella generazione, maturazione e attivazione delle MDSC .....	62

Cellule CD11b <sup>+</sup> isolate da animali portatori di tumore hanno un profilo di espressione di miRNA alterato rispetto alla controparte mieloide non soppressiva .....	63
La modulazione di miRNA <i>in vitro</i> altera il differenziamento delle sottopopolazioni di BM-MDSC.....	66
L'espressione forzata dei miRNA nelle BM-MDSC ne riduce la capacità di inibire la proliferazione dei linfociti T attivati .....	67
Ricerca di potenziali bersagli molecolari regolati dai miRNA .....	71
<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>75</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>79</b>
<b>PUBBLICAZIONI .....</b>	<b>91</b>

## SUMMARY

Aim of this work was to phenotypically and functionally distinguish myeloid-derived suppressor cell (MDSC) subsets and study their cytokine- and microRNA-mediated regulation. In the first part of the work we silenced granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in 4T1 mammary carcinoma line by means of RNA interference (RNAi), highlighting the relevance of this factor in the preferential induction of suppressive myeloid subpopulations and in the control of their maturation and functional properties. By using this *in vivo* model, we were also able to show that GM-CSF released by cancer cells, in addition to promote myeloid recruitment to the tumor site, is critical for their invasive potential and the induction of neo-angiogenesis, factors that contribute to rapid tumor growth and that are indeed inhibited when the cytokine is silenced. We also developed an *in vitro* model, by culturing bone marrow (BM) cells with GM-CSF and other hematopoietic cytokines, that allowed us to easily examine the molecular mechanisms driving MDSC subset differentiation. In particular, we explored the role of some microRNA, found to be differentially expressed between non-suppressive myeloid cells and MDSCs, on phenotype and function of the different BM-MDSC subsets obtained *in vitro*. The microRNA we identified were able to limit the expansion of a monocyte/macrophage suppressive cell fraction and to inhibit the proliferation of BM cultures. From some recent evidences, these microRNA seems to regulate genes involved in myeloid differentiation and hematopoietic homeostasis maintenance.

## RIASSUNTO

Lo scopo di questa tesi è stato quello di distinguere sottopopolazioni di cellule mieloidi soppressorie (MDSC) con caratteristiche fenotipiche e funzionali differenti e studiarne la regolazione mediata da citochine o da microRNA (miRNA). Nella prima parte del lavoro è stato messo a punto il silenziamento genico, mediante RNA interference (RNAi), del gene per il granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) nella linea tumorale 4T1, che ci ha permesso di evidenziare l'importanza di questo mediatore nell'indurre l'accumulo preferenziale di sottopopolazioni mieloidi con attività soppressiva e nel modularne sia la maturazione che l'attività. L'impiego di questo modello *in vivo* ci ha inoltre permesso di osservare come il rilascio di GM-CSF da parte del tumore sia cruciale, oltre che per il reclutamento dell'infiltrato mieloide, anche per l'induzione di neo-angiogenesi e per il potenziale invasivo della neoplasia, fattori che concorrono alla rapida crescita tumorale e risultano inibiti dal silenziamento della citochina.

Grazie all'utilizzo di un sistema di coltura *in vitro* di cellule midollari con GM-CSF e altre citochine ematopoietiche, siamo poi stati in grado di studiare agevolmente alcuni aspetti molecolari alla base della maturazione delle diverse sottopopolazioni di MDSC. In particolare, abbiamo esaminato il ruolo di alcuni miRNA, differenzialmente espressi *in vivo* tra cellule mieloidi non soppressive e cellule MDSC di topi portatori di tumori istologicamente differenti, sul differenziamento e la funzione delle varie frazioni cellulari di MDSC inducibili *in vitro*. I miRNA in esame sono in grado di inibire la formazione della frazione monocito/macrofagica soppressiva e di alterare la proliferazione delle colture midollari. Da recenti evidenze ottenute, questi miRNA sembrano inoltre regolare alcuni geni coinvolti nel differenziamento mieloide e nel mantenimento dell'omeostasi ematopoietica.

## INTRODUZIONE

La teoria dell'immunosorveglianza, inizialmente proposta negli anni settanta del secolo scorso da Burnet e Thomas, ha gettato le basi per lo studio della relazione tra sistema immunitario e crescita neoplastica. Il sistema immunitario, infatti, sarebbe stato in grado di sorvegliare costantemente i tessuti dell'ospite dall'emergere di cellule trasformate (Burnet 1970). Secondo Burnet, i neo-antigeni specifici delle cellule tumorali avrebbero provocato una reazione immunologica capace di eliminare la neoplasia emergente (Burnet 1964; Burnet 1970); secondo Thomas, inoltre, gli organismi più evoluti avrebbero dovuto possedere dei meccanismi di protezione verso i tumori, simili a quelli che mediano il rigetto allogenico (Thomas 1959). Questa teoria, abbandonata precocemente a causa di risultati discordi dovuti all'utilizzo di modelli di immunodeficienza imperfetti, venne poi recuperata nella seconda metà degli anni novanta, in seguito ad esperimenti che dimostrarono l'importanza di diverse componenti del sistema immune, sia innato che adattativo, nel controllo della trasformazione neoplastica.

In origine l'immunosorveglianza era concepita come un processo binario, di completa o mancata protezione dell'ospite, agente solo nelle fasi precoci della comparsa del tumore. Il sistema immunitario sembra, invece, avere un ruolo più complesso, sia di contrasto dello sviluppo tumorale che di rimodellamento della neoplasia nel corso della sua progressione. Esperimenti con tumori trapiantabili in topi parentali ("wild type") o RAG-2<sup>-/-</sup> (che mancano di enzimi coinvolti nel riarrangiamento dei recettori linfocitari e nella riparazione di danni al DNA espressi esclusivamente nel comparto linfoide e sono, pertanto, privi di linfociti B e T), ad esempio, hanno mostrato che tumori sviluppatasi in assenza di un sistema immunitario intatto sono più immunogenici di tumori cresciuti in ospiti immunocompetenti (Shankaran, Ikeda et al. 2001). L'ambiente immunologico seleziona, quindi, varianti tumorali che hanno maggiori possibilità di sopravvivere in un ospite immunocompetente per la ridotta immunogenicità o perché hanno acquisito meccanismi di evasione o soppressione attiva del sistema immunitario. Questo processo è favorito dall'instabilità genetica intrinseca delle cellule tumorali e la

selezione interessa soprattutto i geni codificanti antigeni tumorali, componenti del complesso maggiore di istocompatibilità o componenti della via di segnalazione del recettore per l'IFN- $\gamma$ .

Il rimodellamento immunologico del tumore avviene continuamente, anche se gli effetti maggiori di quest'azione si hanno verosimilmente nelle fasi precoci di crescita, quando il tumore non è ancora rilevabile clinicamente. Per descrivere il comportamento del sistema immunitario è stato perciò proposta una nuova definizione, quella di "cancer immunoediting", comprendente tre fasi principali: *eliminazione*, che può dare completa distruzione del tumore e risoluzione del processo senza avanzamento verso le fasi successive; *equilibrio*, in cui cellule tumorali geneticamente instabili sopravvissute sono selezionate, da linfociti e molecole chiave dell'immunità innata ed adattativa come IFN- $\gamma$ , in base alla maggiore resistenza all'attacco immune; *"escape"*, in cui le varianti che hanno acquisito insensibilità all'eliminazione iniziano ad espandersi in modo incontrollato, originando tumori clinicamente osservabili. Il grado di rimodellamento del tumore probabilmente dipende dal tipo di cellule operative durante la fase di equilibrio, suggerendo che gli eventi possano essere differenti per ogni tessuto di origine (Dunn, Bruce et al. 2002; Dunn, Old et al. 2004; Smyth, Dunn et al. 2006; Reiman, Kmiecik et al. 2007). L'evasione è una diretta conseguenza delle alterazioni delle cellule tumorali, riguardanti soprattutto i meccanismi di processazione e presentazione antigenica o la via di segnalazione del recettore per IFN- $\gamma$ . Queste modifiche riducono, da una parte, il riconoscimento e l'eliminazione degli antigeni tumorali ("tumor ignorance") ed attivano, dall'altra, la capacità delle cellule neoplastiche di ostacolare le funzioni protettive del sistema immunitario. Quest'ultimo processo può derivare dalla sovrapproduzione da parte delle cellule trasformate di citochine inibitorie, quali TGF- $\beta$  o IL-10 (Khong and Restifo 2002), o altri inibitori della risposta dei linfociti T, come la galectina-1 (Rubinstein, Alvarez et al. 2004) e IDO (indoleamina 2,3-diossigenasi) (Uyttenhove, Pilotte et al. 2003), oppure da modificazioni nel reclutamento e nel differenziamento di diverse popolazioni cellulari.

Il tumore, infatti, può indurre tolleranza o soppressione dei linfociti T soprattutto attraverso il differenziamento alterato di cellule dendritiche (DC) in fenotipi più immaturi non funzionali (iDC), il reclutamento di cellule T soppressorie, quali le cellule

T natural killer (NKT) che producono IL-13 o cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg), o l'induzione e il reclutamento di cellule mieloidi soppressorie (MDSC) e macrofagi associati al tumore (TAM). Al momento attuale sappiamo ancora poco di come queste diverse popolazioni interagiscano tra di loro, ma dati iniziali indicano che il tumore possa attivare complesse reti di regolazione negativa della risposta immune durante la fase di "escape", che alterano la risposta anti-tumorale sia localmente, nel sito tumorale, che a livello sistemico, negli organi linfoidi primari e secondari.

## **Cellule mieloidi soppressorie (MDSC)**

Il termine cellule soppressorie di derivazione mieloide (abbreviato in MDSC) è stato recentemente adottato per descrivere, nel topo, una popolazione cellulare che si espande nel corso di alcune condizioni patologiche, quali infezioni, infiammazione cronica, malattie autoimmuni e crescita neoplastica, che esprime i marcatori CD11b e Gr-1, bassi livelli di marcatori di cellule mieloidi mature, up-regola geni legati al metabolismo di amminoacidi (come la L-arginina) o coinvolti nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) e, soprattutto, è in grado di inibire la risposta immunitaria mediata da linfociti T, sia *in vitro* che *in vivo* (Gabrilovich, Bronte et al. 2007; Dolcetti, Marigo et al. 2008; Marigo, Dolcetti et al. 2008; Gabrilovich and Nagaraj 2009; Ostrand-Rosenberg and Sinha 2009).

Nel topo, cellule con fenotipo CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> sono presenti nel midollo osseo in percentuali del 40%, mentre sono assenti nei linfonodi e presenti a bassi livelli nella milza (circa 5% degli splenociti) e nel sangue. In condizioni di normale mielopoiesi queste cellule derivano dalla maturazione, indotta da diverse citochine (quali GM-CSF, IL-3, M-CSF, SCF e Flt3) di cellule staminali ematopoietiche e progenitori mieloidi, e migrano agli organi linfoidi secondari dove maturano in macrofagi, granulociti e cellule dendritiche. In seguito ad una stimolazione acuta del sistema immunitario, ad esempio durante un'infezione, questa popolazione mieloide si espande transientemente a livello del midollo osseo e degli organi linfoidi secondari, dove si ipotizza possa regolare la fase di contrazione della risposta immune, per evitare danni ai tessuti o auto-reattività provocati da un'eccessiva attivazione dei linfociti T. Quando lo stimolo cessa, queste cellule differenziano rapidamente nei tessuti, ripristinando la normale funzionalità linfocitaria. In caso di infiammazione cronica o crescita tumorale, però, la stimolazione

antigenica prolungata ed il crescente rilascio di fattori mielopoietici provoca un accumulo massivo di cellule mieloidi che permangono negli organi linfoidei e nel sito tumorale, mantenendo caratteristiche di immaturità e alterando la risposta immune in modo diretto e indiretto, come riassunto in Tabella 1.

Durante la crescita neoplastica il continuo rilascio di citochine, fattori di crescita e chemochine stimola l'ematopoiesi midollare, generando un progressivo accumulo di MDSC nel sangue, nella milza e nel microambiente tumorale. Le MDSC così reclutate si inseriscono in una rete di popolazioni infiammatorie che supportano con modalità differenti lo sviluppo tumorale, sia a livello locale che sistemico (Coussens and Werb 2002; Balkwill and Coussens 2004).

Condizione	Fenotipo	Disfunzioni immunitarie	Bibliografia
<b>TUMORE</b>			
Tumori trapiantabili di colon carcinoma (CT26, C26), melanoma (B16), fibrosarcoma (C3, 15-12RM)	CD11b/Gr-1	si	(Kusmartsev, Li et al. 2000; Salvadori, Martinelli et al. 2000; Gabrilovich, Velders et al. 2001; Liu, Van Ginderachter et al. 2003; Kusmartsev, Nagaraj et al. 2005)
Tumore trapiantabile di carcinoma mammario (TS/A) e polmonare	CD11b/Gr-1/CD31	si	(Young, Wright et al. 1996; Bronte, Chappell et al. 1999; Bronte, Apolloni et al. 2000)
Tumore trapiantabile di colon carcinoma (C26-GM), carcinoma mammario (4T1), sarcoma (MCA203)	CD11b/Gr-1/F4/80/IL-4R $\alpha$	si	(Dolcetti, Peranzoni et al.; Gallina, Dolcetti et al. 2006)
Tumore trapiantabile di timoma (EL-4), linfoma (EG7, BW-Sp3) e colon carcinoma (MCA26)	CD11b/Gr-1/F4/80/CD115 <sup>int</sup>	si	(Kusmartsev and Gabrilovich 2005; Huang, Pan et al. 2006; Movahedi, Williams et al. 2008)
Tumore trapiantabile di carcinoma ovarico	CD11b/Gr-1/CD80	si	(Yang, Cai et al. 2006)
Tumore mammario spontaneo (BALB/neu T)	CD11b/Gr-1/CD31	si	(Melani, Chiodoni et al. 2003; Melani, Sangaletti et al. 2007)
<b>INFEZIONE</b>			
<i>Candida Albicans</i>	CD11b/Gr-1/CD80	si	(Mencacci, Montagnoli et al. 2002)
<i>Trypanosoma Cruzi, Porphyromonas gingivalis</i>	CD11b/Gr-1	si	(Giordanengo, Guinazu et al. 2002; Goni, Alcaide et al. 2002; Ezernitchi, Vaknin et al. 2006)
<i>Schistosoma mansoni</i>	CD11b/Gr-1/CD16	si	(Marshall, Jankovic et al. 2001)
<b>STRESS IMMUNITARIO</b>			
Superantigeni (Staphylococcal enterotoxin A)	CD11b/Gr-1/LFA-1	si	(Cauley, Miller et al. 2000)
Schistosome oligosaccharide (Lacto-N-neotetraose)	CD11b/Gr-1/F4/80	si	(Terrazas, Walsh et al. 2001)
Vaccinazione con virus ricombinate	CD11b/Gr-1/CD31	si	(Bronte, Wang et al. 1998; Bronte, Apolloni et al. 2000)
<b>INFIAMMAZIONE CRONICA/AUTOIMMUNITA'</b>			
Encefalomielite autoimmune sperimentale	CD11b/Ly6C <sup>high</sup> /F4/80/CD93	si	(Zhu, Bando et al. 2007)
Uveoretinite autoimmune sperimentale	CD11b/Gr-1	si	(Kerr, Raveney et al. 2008)
Eczema cronico	CD11b/Gr-1/CD31	si	(Marhaba, Vitacolonna et al. 2007)
Infiammazione cronica dell'intestino	CD11b/Gr-1	si	(Haile, von Wasielewski et al. 2008)
<b>ALTRI</b>			
Trattamento con ciclofosfamide (fase di recupero)	CD11b/Gr-1/CD31	si	(Angulo, de las Heras et al. 2000; Pelaez, Campillo et al. 2001)
Chimere midollari	CD11b/Gr-1/Ly6-C CD11b/Sca-1	si	(Johnson, Hanke et al. 1998; Billiau, Fevery et al. 2003)
Reazione graft-versus-host	CD11b	si	(Bobe, Benihoud et al. 1999)
Stress traumatico	CD11b/Gr-1/CD31 CD11b/Gr-1	si	(Munera, Popovic et al.; Makarenkova, Bansal et al. 2006)

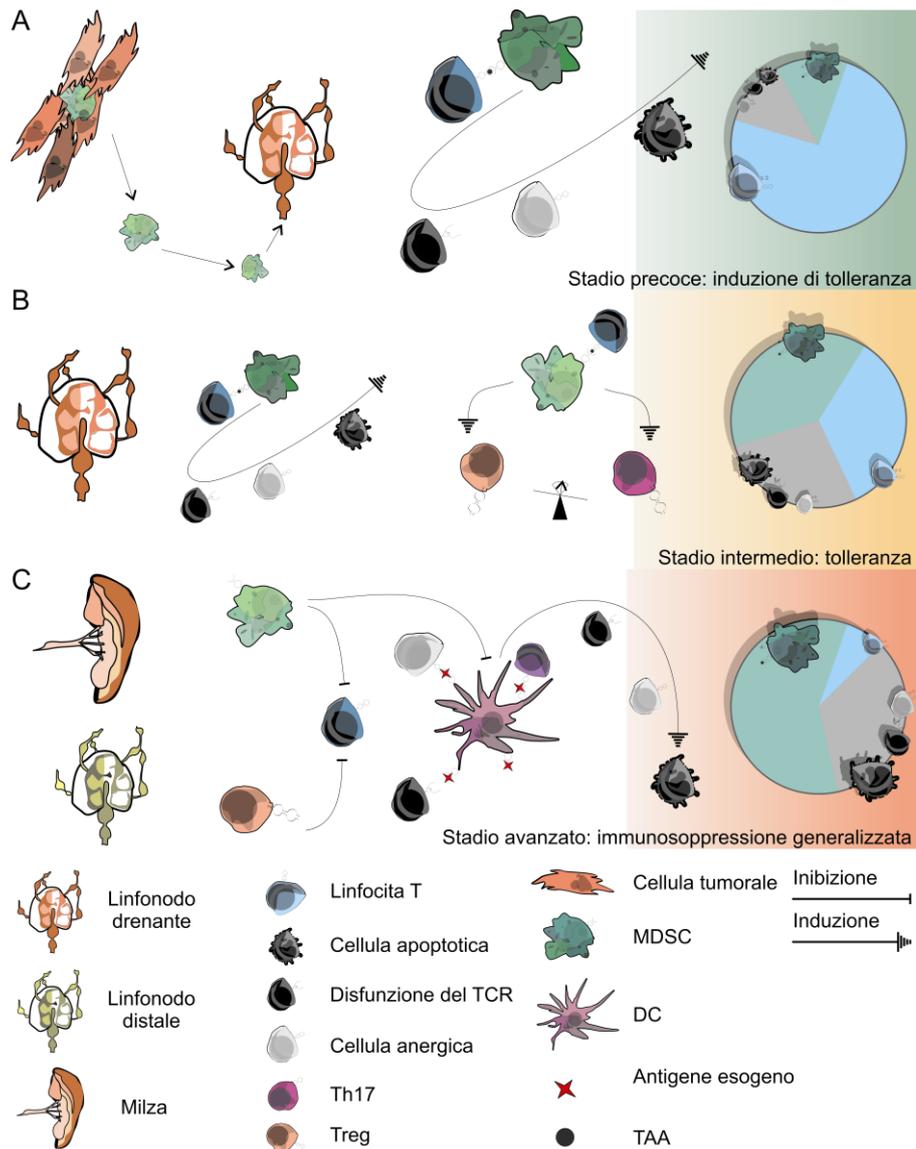
**Tabella 1. Esempi di accumulo di MDSC in diverse situazioni patologiche sperimentali.**

## **Meccanismi pro-tumorali non immunologici delle MDSC**

Le MDSC, oltre a ridurre la già scarsa risposta immune antitumorale, contribuiscono con diversi meccanismi alla crescita neoplastica. In primo luogo, l'attivazione dell'enzima arginasi 1 in queste cellule metabolizza L-arginina producendo poliammine, che possono contribuire direttamente alla proliferazione delle cellule tumorali (Chang, Liao et al. 2001; Belting, Borsig et al. 2002) e svolgere un ruolo anti-infiammatorio, riducendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte dei monociti (Zhang, Caragine et al. 1997; Zhang, Borovikova et al. 1999). Inoltre, le MDSC, mediante il rilascio di ossido nitrico, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), altamente reattive e potenzialmente mutagene, possono danneggiare direttamente il DNA delle cellule circostanti, contribuendo alla trasformazione neoplastica. Negli ultimi anni, poi, le MDSC sono risultate coinvolte nei processi di angiogenesi ed invasione metastatica insieme ad altre cellule mieloidi dell'infiltrato tumorale strettamente correlate, quali i TAM ed i monociti associati al tumore (TEM) (De Palma, Murdoch et al. 2007; Murdoch, Muthana et al. 2008). Una prima evidenza è venuta dall'osservazione che cellule CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> da topi con tumore producono alti livelli di metalloproteasi 9 (MMP-9), una metalloproteasi della matrice che, regolando la biodisponibilità di VEGF, promuove il processo angiogenetico. Inoltre, sotto l'influenza di fattori rilasciati dal tumore, le MDSC si incorporano direttamente nell'endotelio tumorale, differenziando in cellule simili a quelle endoteliali (Yang, DeBusk et al. 2004). Recentemente, poi, si è scoperto che il granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) induce nelle MDSC la proteina Bv8, che sostiene la progressione tumorale, sia mobilizzando altre MDSC dal midollo, sia stimolando direttamente l'angiogenesi (Shojaei, Wu et al. 2007). Cellule CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> sono state anche associate alla resistenza a trattamento con anti-VEGF, supportando ulteriormente il loro ruolo nel processo angiogenetico (Shojaei, Wu et al. 2007). Infine, in due modelli di adenocarcinoma mammario, le MDSC possono promuovere l'invasione tumorale locale e la metastatizzazione a distanza in un processo che coinvolge la citochina TGF- $\beta$  e l'attività di diverse metalloproteasi (Yang, Huang et al. 2008).

## **Immunosoppressione**

L'inibizione degli effettori anti-tumorali è la proprietà più rilevante e più studiata delle MDSC. E' stato recentemente ipotizzato dal nostro gruppo un modello cronologicamente e topologicamente strutturato, per ricapitolare le evidenze dell'ultimo decennio riguardanti il processo dell'immunosoppressione mediata da queste cellule nel corso della progressione neoplastica (Marigo, Dolcetti et al. 2008). Come si vede in figura 1, nelle fasi iniziali del reclutamento mieloide dal midollo osseo e dalla milza (che nel topo può fungere da organo ematopoietico indipendente), un ridotto numero di MDSC si trova a popolare il microambiente tumorale, dove viene a contatto con gli antigeni associati al tumore (TAA). Presentando tali antigeni, le MDSC interagiscono con i linfociti T CD8<sup>+</sup> nei linfonodi drenanti, causando un'iniziale stato di tolleranza verso i TAA. La crescita tumorale porta un progressivo aumento delle MDSC, che possono quindi inibire la risposta immune, sia verso TAA che antigeni esogeni presentati da cellule presentanti l'antigene (APC), in modo sia dipendente che indipendente dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). In questa fase, le MDSC possono attivare altre popolazioni cellulari regolatorie, come linfociti T regolatori (Treg) o T-helper-17 (Th17), che contribuiscono a mantenere uno stato di soppressione linfocitaria. Nelle fasi più avanzate, la presenza massiva di MDSC ed altre popolazioni cellulari induce uno stato di immunosoppressione generalizzata, nei confronti non solo di linfociti T CD8<sup>+</sup>, ma anche di linfociti T CD4<sup>+</sup>, cellule natural killer (NK) e T natural killer (NKT). Questo stato si può riscontrare sperimentalmente con alcuni modelli tumorali in cui gli animali con malattia molto evoluta possono sviluppare sepsi per infezioni opportunistiche.



**Figura 1. Modello di tolleranza e immunosoppressione indotte dallo sviluppo neoplastico.** (A) Le MDSC vengono mobilizzate dai siti ematopoietici e infiltrano la massa tumorale in risposta a vari fattori solubili rilasciati dal tumore (TDSF); qui vengono in contatto con antigeni tumorali (TAA) e le MDSC presentanti tali antigeni si direzionano al linfonodo drenante. In questa sede le MDSC possono indurre tolleranza nei linfociti T CD8<sup>+</sup>, provocando disfunzioni del TCR, anergia o apoptosi. In questa fase, dato l'esiguo numero di MDSC, l'impatto sul repertorio linfocitario è ancora limitato. (B) Nello stadio intermedio la crescita tumorale porta ad un progressivo aumento di MDSC, che in questa fase possono indurre soppressione anche con meccanismo MHC-indipendente, sia verso TAA che verso antigeni esogeni presentati dalle APC nei linfonodi drenanti. Altre popolazioni cellulari, quali linfociti Treg o Th17, attivati dalle MDSC, possono contribuire e/o regolare l'immunosoppressione. (C) Come indicato nel diagramma sulla destra, le MDSC diventano predominanti in stadi avanzati e possono indurre una soppressione generalizzata, non più ristretta ai linfonodi drenanti, sia su linfociti T CD8<sup>+</sup>, che su CD4<sup>+</sup>, cellule NK e NKT, verso TAA e antigeni esogeni.

Figura tratta e modificata da Marigo et al. (2008) "Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid suppressor cells". Immunological Reviews.

Parte sostanziale dell'azione immunosoppressiva esercitata dalle MDSC sui linfociti è associata all'attività di due enzimi, arginasi 1 (ARG1) e ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS o NOS2) (Bronte and Zanovello 2005). ARG1 e NOS2 condividono il substrato, l'amminoacido L-arginina, e danno origine rispettivamente a urea e L-ornitina o ossido nitrico (NO) e L-citrullina (Bogdan 2001). Questi enzimi rispondono a stimoli tradizionalmente descritti come antitettici e mutualmente esclusivi, ma ci sono evidenze che possano agire contemporaneamente ed in sinergia nella popolazione MDSC (Kusmartsev and Gabrilovich 2005; Gallina, Dolcetti et al. 2006), anche se ancora manca la dimostrazione formale che la stessa cellula possa attivare, nello stesso momento, entrambe le proteine.

## **ARG1**

ARG1 (nota anche come arginasi epatica) è un enzima citosolico, espresso soprattutto negli epatociti e coinvolto nel ciclo dell'urea, che viene essere indotta in cellule mieloidi murine da citochine di tipo Th2 (Munder, Eichmann et al. 1999), quali IL-4 e IL-13, da TGF- $\beta$  (Boutard, Havouis et al. 1995) e GM-CSF (Jost, Ninci et al. 2003), a differenza dell'altra isoforma, ARG2 (o di tipo renale) che è invece un enzima mitocondriale, costitutivamente espresso in cellule renali, neuroni, macrofagi ed enterociti. ARG1 viene espressa tramite vie di segnalazione dipendenti (Munera, Popovic et al.; Gray, Poljakovic et al. 2005) e indipendenti (Sinha, Clements et al. 2005; El Kasmi, Qualls et al. 2008) dal fattore di trascrizione STAT6.

Il coinvolgimento dell'enzima ARG1 nell'attività soppressiva delle MDSC è stato riscontrato in diversi modelli tumorali (Bronte, Serafini et al. 2003; Kusmartsev, Nefedova et al. 2004; Rodriguez, Quiceno et al. 2004; Kusmartsev and Gabrilovich 2005; Sinha, Clements et al. 2005; Gallina, Dolcetti et al. 2006). L'attivazione di ARG1 provoca una riduzione di L-arginina extracellulare associata alla down-regolazione della catena CD3 $\zeta$  del recettore dei linfociti T (T cell receptor, TCR) con conseguente alterazione della segnalazione a valle, come dimostrato, sia *in vitro* che *in vivo*, in modelli murini ed in pazienti con carcinoma renale (Rodriguez, Zea et al. 2003; Baniyash 2004; Rodriguez, Quiceno et al. 2004; Zea, Rodriguez et al. 2004). Inoltre, la riduzione di L-arginina può alterare la traduzione e causare arresto dei linfociti T in fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> del ciclo cellulare (Rodriguez, Quiceno et al. 2007). La deprivazione di

amminoacidi è un meccanismo importante di regolazione della risposta linfocitaria, come dimostrano dati recenti che correlano la soppressione dell'attivazione dei CTL con la deplezione di un altro aminoacido, la cisteina, da parte delle MDSC (Srivastava, Sinha et al.) o con la riduzione di fenilalanina, indotta da IL-4-induced gene 1 (IL4I1) (Boulland, Marquet et al. 2007), e del triptofano, causata da indoleamina-2,3-ossigenasi (IDO) (Munn and Mellor 2007), ad opera di altre cellule mieloidi regolatorie.

## **iNOS/NOS2**

NOS2/iNOS è una delle tre isoforme (le altre sono NOS1, neuronale, e NOS3, endoteliale) dell'enzima, è espresso in macrofagi, neutrofili, eosinofili, cellule dendritiche e cellule NK murine. NOS2 viene indotto soprattutto dalla citochina Th1 IFN- $\gamma$ , in particolare in combinazione con LPS, ma anche dalle citochine infiammatorie IL-1, TNF, IFN- $\alpha$  o IFN- $\beta$ , che regolano diversi fattori di trascrizione, quali NF-kB, IFN-regulatory factor 1 e STAT1 (Bogdan 2001; Ganster, Taylor et al. 2001). Il ruolo immunoregolatorio dell'ossido nitrico (NO) rilasciato dalle MDSC è stato stabilito dalla riduzione dell'immunosoppressione, sia *in vitro* che *in vivo*, mediante inibitori di NOS e dall'osservazione che le MDSC di topi knock out per NOS2 mancano di capacità immunosoppressiva (Mazzoni, Bronte et al. 2002). La soppressione dell'attivazione dei linfociti T mediata da NO non è associata ad eventi precoci innescati dal riconoscimento antigenico da parte del TCR, ma piuttosto alla cascata di segnalazione successiva al legame dell'IL-2 al proprio recettore. NO può regolare negativamente le proteine coinvolte nella segnalazione intracellulare sia direttamente, tramite S-nitrosilazione di residui cisteinici cruciali, sia indirettamente, attivando la guanilato ciclasi solubile e la protein chinasi dipendente da cGMP (Bingisser, Tilbrook et al. 1998; Fischer, Palmetshofer et al. 2001). Nei linfociti T, NO agisce bloccando la fosforilazione, e quindi l'attivazione, di proteine coinvolte nelle tre principali vie di segnalazione del recettore per l'IL-2 (JAK/STAT, Ras/MAPK, fosfoinositolo 3-chinasi/Akt), quali JAK1, JAK3, STAT5, ERK e AKT (Pericle, Kirken et al. 1997; Mazzoni, Bronte et al. 2002). Studi su cellule T umane hanno anche evidenziato come il NO influenzi la stabilità dell'mRNA codificante per l'IL-2 e il rilascio di IL-2 da linfociti T attivati (Macphail, Gibney et al. 2003). Infine, su cellule T esposte ad alte concentrazioni di NO è stato osservato un effetto pro-apoptotico diretto, che potrebbe

essere causato dall'accumulo di p53, dall'interazione mediata da Fas o da membri della famiglia del recettore per TNF, o da segnalazione attraverso vie indipendenti dalle caspasi (Mannick, Hausladen et al. 1999).

## **Cooperazione tra ARG1 e NOS2**

Il metabolismo dell'arginina nei macrofagi è stato tradizionalmente utilizzato come importante parametro per discriminare tra attivazione classica o alternativa di queste cellule. Le citochine di tipo Th1, come IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , o i lipopolisaccaridi batterici come LPS, determinando l'attivazione *classica* (M1) dei macrofagi, caratterizzata da produzione di citochine ad azione pro-infiammatoria, stimolo dell'attività microbica ed attivazione di cellule T citotossiche, aumentato rilascio di NO mediante l'attività di NOS2 ed inibizione dell'attività di ARG1. Al contrario, citochine di tipo Th2 quali IL-4, IL-10, IL-13, e TGF- $\beta$  o glucocorticoidi, che inducono l'attivazione *alternativa* dei macrofagi (M2) essenziale per l'immunità umorale, le risposte allergiche ed antiparassitarie, la riparazione dei tessuti e la fibrosi, inibiscono l'attività di NOS2 e inducono la sintesi di ARG1. Tuttavia, questa dicotomia maturativa basata sulla regolazione reciproca tra NOS e ARG, che di solito viene estesa a diverse cellule accessorie di origine mieloide (macrofagi, DC e polimorfonucleati), potrebbe costituire una visione eccessivamente semplificata, non applicabile alle MDSC, che oltre ad utilizzare entrambi gli enzimi sopracitati, co-esprimono marcatori macrofagici di attivazione classica e alternativa (Gallina, Dolcetti et al. 2006). A seconda degli stimoli presenti nel microambiente tumorale e della co-esistenza di diverse sottopopolazioni di MDSC, l'immunosoppressione può essere infatti il risultato dell'attivazione sia separata che combinata di ARG1 e NOS2 (Bronte and Zanovello 2005). Esistono basi biochimiche che possono spiegare la cooperazione tra i due enzimi. Infatti, in condizioni di deplezione di arginina intracitoplasmatica a causa dell'attività sovra-fisiologica di ARG1 presente nelle MDSC, l'attività di NOS2 viene modificata inducendo la produzione di anione superossido ( $O_2^-$ ) dal suo dominio reduttasico (Xia and Zweier 1997; Xia, Roman et al. 1998; Bronte, Serafini et al. 2003). L' $O_2^-$  reagisce poi con NO generando intermedi reattivi dell'azoto, noti anche come RNOS (reactive nitrogen-oxide species), tra cui i perossinitriti  $ONOO^-$ , e con altre molecole, come  $H_2O$ ,

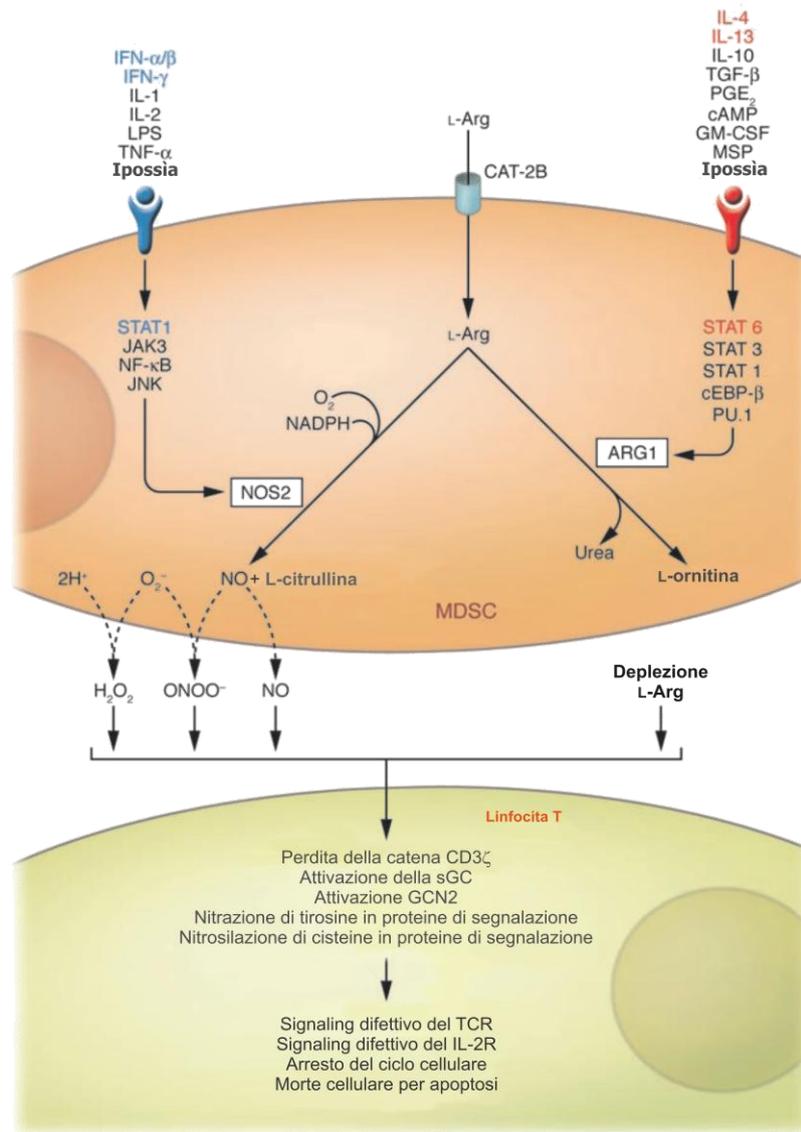
generando specie reattive dell'ossigeno, i ROS (reactive oxygen species), tra cui il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ).

I perossinitriti prodotti dalla reazione tra  $O_2^-$  e NO sono agenti ossidanti altamente reattivi che possono attraversare le membrane e danneggiare diversi bersagli biologici. I perossinitriti possono agire perciò da messaggeri intra- e inter-cellulari ed indurre modifiche post-traduzionali, mediante la nitratura di residui di tirosina, cisteina, metionina e triptofano delle proteine. Queste modifiche influenzano diverse attività biologiche, come l'attivazione/inattivazione enzimatica, il differenziamento e la proliferazione cellulare (Schopfer, Baker et al. 2003; Radi 2004). Il coinvolgimento dei perossinitriti nei meccanismi di inibizione dei linfociti T da parte delle MDSC indotte da tumore è stato inizialmente dimostrato da Kusmartsev e colleghi (Kusmartsev, Li et al. 2000). I perossinitriti, agendo extracellularmente, possono indurre apoptosi in linfociti T umani, ed i linfociti T attivati sono più suscettibili di quelli "resting" a questo effetto, che dipende dalla nitratura di residui tirosinici con inibizione della fosforilazione di importanti proteine di segnalazione intracellulare (Brito, Naviliat et al. 1999). Recentemente, è stato dimostrato che i perossinitriti possono alterare il riconoscimento del complesso MHC I-peptide da parte del TCR, mediante nitratura di tirosine nel TCR e nella molecola corecettoriale CD8 (Nagaraj, Gupta et al. 2007). Uno studio su linfociti T infiltranti il tumore (TIL) di adenocarcinoma prostatico umano ha inoltre dimostrato che queste cellule, che non rispondono a molti stimoli, hanno alti livelli di residui tirosinici nitrati. L'epitelio prostatico neoplastico, ma non quello normale, sovraesprime ARG2 e NOS2 ed il contenuto di nitrotirosine dei TIL viene diminuito dall'impiego di inibitori dei due enzimi in combinazione, consentendo anche un recupero funzionale di questi linfociti (Bronte, Kasic et al. 2005). Queste evidenze indicano che ARG e NOS potrebbero rappresentare un importante meccanismo mediante cui il tumore induce immunosoppressione *in situ* e che la ricostituzione della responsività dei TIL potrebbe essere raggiunta mediante la simultanea inibizione dei due enzimi.

In seguito alla rapida interazione di  $O_2^-$  con altre molecole reattive, le MDSC producono anche elevate quantità di ROS, come il perossido di idrogeno (Bronte, Serafini et al. 2003; Kusmartsev and Gabrilovich 2003; Kusmartsev, Nefedova et al. 2004), che agisce da messaggero cellulare grazie alla sua capacità di diffondere attraverso le membrane. In animali portatori di tumore i ROS agiscono sia inibendo la maturazione

di cellule dendritiche a favore dell'accumulo di MDSC (Kusmartsev and Gabrilovich 2003), che sopprimendo l'azione di linfociti T in modo arginasi-dipendente. L'interazione linfocita-MDSC in presenza dell'antigene aumenta la produzione di ROS da parte delle cellule mieloidi, con meccanismo indipendente da IFN- $\gamma$  e probabilmente mediato da integrine (CD11b, CD18 e CD29), dato che il blocco con anticorpi specifici di queste molecole elimina la produzione di ROS e la soppressione dei linfociti T (Kusmartsev, Nefedova et al. 2004).

Probabile bersaglio dei ROS è, ancora una volta, la catena CD3 $\zeta$  dei linfociti T. È stato già dimostrato come lo stress ossidativo provocato dalle MDSC possa ridurre l'espressione di CD3 $\zeta$  in topi portatori di tumore (Otsuji, Kimura et al. 1996). Inoltre, in pazienti con stadi avanzati di cancro di diverso tipo, si nota in circolo una popolazione di granulociti a bassa densità che producono H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, causando diminuzione di CD3 $\zeta$ , minor produzione di citochine e soppressione dei linfociti T (Schmielau and Finn 2001). I ROS, inoltre, in maniera simile ai perossinitriti, hanno probabilmente anche un ruolo diretto nell'induzione dell'apoptosi in linfociti T attivati dall'antigene, mediante la deregolazione dei livelli intracellulari della proteina anti-apoptotica Bcl2 e l'aumento dei livelli di FasL mediato da NF-kB (Hildeman, Mitchell et al. 2003).



**Figura 2. Effetti inibitori del metabolismo della L-arginina nelle MDSC su linfociti T attivati.**

L-arginina (L-Arg) entra nelle MDSC attraverso il trasportatore degli amminoacidi cationici (CAT-2B) ed è prevalentemente metabolizzata dagli enzimi NOS2 e ARG1, anche se non può essere escluso il contributo di altre isoforme. A seconda dell'equilibrio tra i due enzimi, possono seguire deplezione di L-Arg extracellulare, rilascio di NO e produzione di ROS e RNOs ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$ ). I linfociti T che vengono attivati in un microambiente condizionato dalle MDSC smettono di proliferare e possono morire per apoptosi mediante vie che coinvolgono attivazione di GCN2 e sGC, nitrazione di tirosine o nitrosilazione di cisteine in proteine essenziali, perdita di  $CD3\zeta$  e interferenza con il signaling del IL-2R.

Figura tratta e modificata da Sica A, Bronte V. (2007) "Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development". Journal of Clinical Investigation.

E' generalmente condivisa l'idea che le MDSC agiscano solo se esiste un contatto diretto con i linfociti T che vengono inibiti. Questo potrebbe rendere conto, da una parte, dell'impiego di meccanismi a breve raggio d'azione, quali la diffusione di ROS e RNOS attraverso le membrane cellulari, dall'altra, delle evidenze del coinvolgimento nei meccanismi di soppressione di proteine di membrana, quali ad esempio CD80 (Yang, Cai et al. 2006) o CD40 (Pan, Ma et al.).

Alcune osservazioni riportano poi il rilascio di citochine come uno dei possibili meccanismi di azione di queste cellule soppressorie. Le MDSC possono perturbare la risposta immune indirizzandola verso un fenotipo pro-tumorale di tipo Th2, ad esempio mediante la produzione di IL-10, che induce una riduzione della secrezione di IL-12 da parte dei TAM (Sinha, Clements et al. 2007). In un diverso modello tumorale, invece, le MDSC vengono indotte da IL-13 a rilasciare TGF- $\beta$ , con soppressione dell'attività dei linfociti CTL (Terabe, Matsui et al. 2003; Fichtner-Feigl, Terabe et al. 2008).

Nonostante la maggior parte degli studi sulle MDSC sia relativa allo studio della risposta linfocitaria T CD8<sup>+</sup>, queste cellule agiscono anche inibendo l'attività di altri effettori immuni, quali linfociti T CD4<sup>+</sup> (Sinha, Clements et al. 2005; Bunt, Sinha et al. 2006), cellule natural killer (NK) (Suzuki, Kapoor et al. 2005; Liu, Yu et al. 2007; Hoechst, Voigtlaender et al. 2009; Li, Han et al. 2009) e cellule T natural killer (NKT) (Yanagisawa, Exley et al. 2006).

Infine, un meccanismo indiretto tramite cui le MDSC promuovono la crescita tumorale è l'interazione con altre cellule regolatorie del microambiente tumorale, quali linfociti T regolatori (Treg) o TAM. In un modello murino di colon carcinoma, le MDSC inibiscono i linfociti T effettori e, al contrario, mediano l'espansione di Treg con un meccanismo dipendente da IFN- $\gamma$  che coinvolge il rilascio di TGF- $\beta$  ed IL-10 da parte delle MDSC (Huang, Pan et al. 2006). Lo stesso gruppo ha poi dimostrato che l'attivazione da parte di IFN- $\gamma$  comporta anche un aumento della molecola CD40 sulle MDSC, cruciale per l'induzione di immunosoppressione e per l'attivazione di Treg (Pan, Ma et al.). In un modello di carcinoma ovarico, invece, le MDSC cooperano con cellule Treg mediante interazione tra i recettori CD80 e CD152 per inibire l'attivazione dei linfociti T effettori (Yang, Cai et al. 2006). Recentemente è stato anche proposto un meccanismo di

stimolazione antigene-specifico dei Treg naturali mediato dalle MDSC e dipendente da arginasi (Serafini, Mgebhoff et al. 2008). L'induzione di Treg da parte di MDSC è stata anche verificata nell'uomo, in pazienti con epatocarcinoma (Hoechst, Ormandy et al. 2008).

Le MDSC, come già citato, possono anche interagire con i TAM, riducendone le proprietà citotossiche anti-tumorali, quali il rilascio di IL-12 (Sinha, Clements et al. 2007). Questi due tipi cellulari condividono molte caratteristiche, dai fattori che ne inducono il reclutamento, al profilo di espressione genica prevalentemente M2 ma con alcuni geni peculiari indotti da IFN- $\gamma$  (tipicamente M1), alle citochine prodotte, alle funzioni pro-tumorali di immunoregolazione, induzione di angiogenesi e promozione di metastasi. Alcune evidenze suggeriscono che le MDSC possano differenziare in macrofagi soppressivi (Kusmartsev and Gabrilovich 2005; Van Ginderachter, Meerschaut et al. 2006) e che possano costituire un continuum di uno stesso programma differenziativo mieloidi indotto da fattori rilasciati dal tumore (Sica and Bronte 2007).

## **Espansione e reclutamento delle MDSC**

Il reclutamento di MDSC al sito tumorale può essere indotto da fattori solubili derivati dal tumore (tumor-derived soluble factors, TDSF) che alterano profondamente la mielopoiesi, inducendo la mobilizzazione e l'attivazione di cellule mieloidi. Quest'idea deriva dall'osservazione che la resezione chirurgica del tumore primario è in grado di ristabilire una mielopoiesi normale e che l'accumulo di MDSC normalmente correla con il tempo e le dimensioni del tumore (Salvadori, Martinelli et al. 2000; Melani, Chiodoni et al. 2003; Sinha, Clements et al. 2005). I fattori, che possono essere rilasciati oltre che dalle cellule tumorali anche da altre popolazioni cellulari del microambiente neoplastico, comprendono diverse molecole biologicamente attive, tra cui fattori di crescita, citochine e chemochine, alcune comuni a diversi tumori, altre caratteristiche di determinate neoplasie; al momento nessuno di questi mediatori si è rivelato sufficiente, da solo, ad indurre completamente il fenotipo e la funzione di cellule MDSC.

### **IL-3**

Una delle prime citochine che sono state associate ad un'aumentata mielopoiesi in animali portatori di tumore ed all'induzione di una popolazione mieloide con attività soppressiva è l'interleuchina 3 (IL-3). Studi iniziali condotti sul modello del tumore polmonare di Lewis (Lewis lung carcinoma, LLC), infatti, hanno evidenziato come IL-3 e GM-CSF rilasciati dal tumore siano in grado di indurre MDSC sia *in vivo* che *in vitro* da colture di midollo (Young, Young et al. 1990; Young, Wright et al. 1991).

### **GM-CSF**

Altre evidenze hanno poi confermato un importante ruolo del GM-CSF nell'accumulo di MDSC (Young, Young et al. 1990; Young, Wright et al. 1991). Studi sul ruolo della produzione tumorale di GM-CSF, rilasciato spontaneamente dal 31% dei tumori umani e da diverse linee murine, sul reclutamento e la maturazione delle APC, hanno permesso di osservare che questa citochina è in grado di indurre la popolazione soppressoria CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>, a differenza di quanto avviene con tumori non secernenti GM-CSF. Quest'azione di reclutamento delle MDSC e l'immunosoppressione ad esse associata si ottengono anche con la semplice somministrazione di GM-CSF ricombinante in topo (Bronte, Chappell et al. 1999). Nell'uomo, studi su pazienti con carcinoma squamoso della testa e del collo hanno individuato quali fattori prognostici negativi la quantità di GM-CSF rilasciato dal tumore ed il numero di cellule CD34<sup>+</sup> infiltranti la massa tumorale primaria. I pazienti con tumori che producevano alte quantità di GM-CSF o avevano alto contenuto di CD34<sup>+</sup> mostravano un'incidenza estremamente elevata di recidiva e metastasi, mentre la maggioranza dei pazienti con basso rilascio di GM-CSF o basso numero di CD34<sup>+</sup> rimaneva più a lungo libera da malattia (Young, Wright et al. 1997).

Queste scoperte sono in apparente contrasto con la moltitudine di dati sperimentali che provano che cellule tumorali modificate geneticamente per produrre GM-CSF sono potenti vaccini antitumorali in modelli pre-clinici. Infatti, tumori  $\gamma$ -irradiati ed ingegnerizzati per rilasciare questa citochina sono impiegati per reclutare ed espandere APC professionali, che presentano gli antigeni rilasciati dalle cellule tumorali in via di degenerazione ai linfociti infiltranti il tumore, con lo scopo di attivare la risposta

immune antitumorale (Dranoff 2002; Dranoff 2003; Jinushi, Hodi et al. 2008). Il GM-CSF è stato impiegato anche in clinica, oltre che come adiuvante di vaccini antitumorali, per accelerare la ricostituzione mieloide dopo trapianto di midollo osseo insieme al G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) e mobilitare cellule progenitrici dal midollo osseo al sangue periferico (Peters, Rosner et al. 1993; Gazitt 2002; Sohn, Kim et al. 2002) e, in associazione con farmaci chemioterapici, per aumentare la citotossicità verso leucemie (Bettelheim, Valent et al. 1991; Archimbaud, Fenaux et al. 1993; Hiddemann, Wormann et al. 1994).

Da questi dati sembra emergere una complessa relazione dose-risposta tra le varie funzioni e la quantità di GM-CSF somministrata. Alte dosi potrebbero attivare i monociti/macrofagi e, possibilmente, altre cellule mieloidi a rilasciare fattori immunosoppressivi, mentre questi effetti potrebbero non essere così evidenti alle basse dosi. In alternativa, solamente alte dosi potrebbero mobilitare abbastanza precursori mieloidi immaturi con azione immunosoppressiva. Studi recenti su vaccini antitumorali con GM-CSF, in cui si è mantenuta costante la dose di antigene variando quella di GM-CSF, hanno dimostrato l'esistenza di un livello-soglia per questa citochina, oltre il quale si perde l'efficacia del vaccino e si determina immunosoppressione *in vivo*, mediante il reclutamento di MDSC (Serafini, Carbley et al. 2004). Un'osservazione simile è stata recentemente proposta per vaccini antitumorali umani in cui il GM-CSF è stato utilizzato come adiuvante, sia come proteina ricombinante in associazione a vaccino intradermico o sottocutaneo, sia come prodotto di cellule tumorali autologhe o allogene ingegnerizzate a rilasciare la citochina (Parmiani, Castelli et al. 2007). In questa metanalisi, infatti, è stato notato come il GM-CSF sia utile in alcuni pazienti per aumentare la risposta immune se somministrato a bassi dosaggi (40-80 µg per 1-5 giorni), mentre diventi ininfluente o addirittura sfavorevole a dosi superiori e prolungate, che possono indurre una mobilitazione di MDSC dal midollo che causano l'inibizione della risposta antitumorale. In particolare, nel lavoro di Filipazzi e colleghi, è riportata l'espansione di MDSC umane con fenotipo monocitario CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-/lo</sup>, in grado di inibire la proliferazione linfocitaria tramite rilascio di TGF-β, anche in pazienti con melanoma sottoposti a vaccinazione antitumorale con GM-CSF a bassa dose, che correla con una scarsa risposta immunologica al vaccino (Filipazzi, Valenti et al. 2007). L'utilizzo di cellule tumorali irradiate come vaccini può perciò favorire la risposta

immunitaria mediante, da un lato, il rilascio locale, e probabilmente di breve durata, del GM-CSF, e dall'altro, la maturazione e l'attivazione di APC grazie alla morte apoptotica delle cellule. Se però lo stimolo della risposta antitumorale è scarso e la concentrazione di GM-CSF diventa consistente a livello sistemico (il livello soglia può variare tra neoplasie diverse a causa di fattori rilasciati dal tumore già presenti in circolo), si può avere mobilitazione di precursori mieloidi dal midollo osseo che causano un accumulo di MDSC nel sangue e negli organi linfoidi, con conseguente inibizione della citotossicità antitumorale.

Ad ulteriore prova dell'importanza del GM-CSF nella generazione delle MDSC, negli ultimi anni sono stati messi a punto, da parte del nostro laboratorio e di altri gruppi, modelli di maturazione *in vitro* di queste cellule, a partire da midollo osseo trattato con citochine. Alte dosi di GM-CSF sono infatti in grado di far maturare, già dopo quattro giorni, una popolazione mieloidi con azione immunosoppressiva e fenotipo simile a quello di MDSC isolate dalla milza di topi portatori di tumore (Lutz, Kukutsch et al. 2000; Rossner, Voigtlander et al. 2005; Morales, Kmiecik et al. 2009).

## **VEGF**

Il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) è secreto dalla maggior parte dei tumori ed alti livelli sono associati ad una prognosi negativa. Questo fattore di crescita, somministrato *in vivo*, agisce inibendo il differenziamento delle cellule dendritiche e provocando un parallelo accumulo di cellule mieloidi immature Gr-1<sup>+</sup> (Gabilovich, Chen et al. 1996; Gabilovich, Ishida et al. 1998)Gabilovich et al. 1996 e 1998). In un modello di carcinoma mammario indotto dall'espressione condizionata dell'oncogene Her2/neu, la progressione neoplastica correla con il livello ematico di VEGF, responsabile dell'accumulo di MDSC nel sangue e nella milza (Melani, Chiodoni et al. 2003). L'utilizzo di amino-bifosfonati come inibitori della metalloproteasi 9 (MMP-9), che regola la biodisponibilità di VEGF, permette di ridurre l'accumulo di MDSC e di ripristinare la risposta immune antitumorale indotta da immunizzazione nello stesso modello tumorale (Melani, Sangaletti et al. 2007). Un altro studio ha dimostrato come l'attivazione del recettore VEGFR2 sia in grado di indurre l'espansione di cellule mieloidi nel midollo osseo, tramite aumento diretto o indiretto dei livelli di GM-CSF (Larrivee, Pollet et al. 2005). Recentemente, l'impatto di un trattamento clinico anti-VEGF (VEGF-

Trap) è stato valutato su diverse popolazioni cellulari del sangue in pazienti con tumori solidi in stadio avanzato; nonostante sia in grado di aumentare la proporzione di cellule dendritiche mature, il trattamento non è però in grado di alterare significativamente altre popolazioni mieloidi, tra cui le MDSC, impedendo quindi un recupero della risposta immune (Fricke, Mirza et al. 2007). Questi dati suggeriscono un ruolo secondario o indiretto di VEGF nel reclutamento di MDSC nel topo e nell'uomo.

## **SCF**

Un altro fattore che si è rivelato importante nel reclutamento di MDSC è lo stem cell factor (SCF, ligando di c-kit): il silenziamento di questa proteina in cellule tumorali o la sua neutralizzazione con anticorpi specifici *in vivo* è in grado, oltre che di ridurre il numero di cellule CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> nel midollo osseo degli animali portatori di tumore, di rallentare la crescita tumorale e l'angiogenesi, ristabilire la proliferazione di linfociti T *in vitro* ed aumentare l'efficacia di un trattamento immunoterapeutico *in vivo* (Pan, Wang et al. 2007). L'importanza di questo fattore è confermata dall'osservazione che l'assenza di MMP-9, che ne regola il rilascio in forma solubile, è associata ad una marcata riduzione nel reclutamento di MDSC (Yang, DeBusk et al. 2004).

## **PGE2/COX2**

Uno dei fattori che negli ultimi anni è stato studiato come responsabile dell'accumulo e dell'attivazione di MDSC è la prostaglandina E2 (PGE2), prodotta dall'enzima cicloossigenasi 2 (COX2) a partire dall'acido arachidonico. In topo, questo mediatore infiammatorio sembra cruciale, almeno in alcuni modelli tumorali, per l'accumulo di MDSC. *In vitro*, il signalling dei recettori per PGE2, EP1, EP2 e EP4, è coinvolto nell'espansione di MDSC dai precursori midollari a scapito di cellule dendritiche. Animali knock-out per il recettore EP2 dimostrano una crescita tumorale rallentata, un minor accumulo di MDSC a parità di dimensioni tumorali e una ridotta capacità soppressiva di queste cellule. Lo stesso effetto viene inoltre riprodotto *in vivo*, in animali wild type, dalla somministrazione di un inibitore di COX2 (Sinha, Clements et al. 2007). In un altro modello tumorale murino, Rodriguez e colleghi hanno verificato come PGE2 prodotta dalle cellule tumorali sia in grado, principalmente attraverso il recettore EP4,

di indurre l'enzima ARG1 nelle MDSC infiltranti il tumore (Rodriguez, Hernandez et al. 2005). L'inibitore di COX2, Celecoxib, oltre a ridurre l'accumulo di MDSC in un tumore indotto da carcinogenesi chimica, è in grado di normalizzare i livelli di espressione degli enzimi Arg1 e Nos2 nella milza degli animali trattati (Talmadge, Hood et al. 2007). Recentemente, la produzione di PGE2 da parte di cellule tumorali, con conseguente accumulo di MDSC, è stata correlata al signalling innescato dall'interazione tra la molecola Fas e il suo ligando FasL (Zhang, Liu et al. 2009).

### **IL-1 $\beta$ /IL-6/M-CSF**

Un altro mediatore infiammatorio che si è dimostrato in grado di modulare l'espansione di MDSC in diversi modelli tumorali è l'interleuchina-1 (IL-1) (Song, Krelin et al. 2005; Bunt, Sinha et al. 2006; Bunt, Yang et al. 2007). L'azione di questa citochina, che sembra agire sull'induzione ma non sull'attivazione delle MDSC, è indiretta e mediata da IL-6 e, probabilmente, da PGE2, GM-CSF e M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) (Dinarello 1996). IL-6 e M-CSF potrebbero influenzare il differenziamento delle MDSC dato che è nota la loro capacità di inibire la maturazione di cellule dendritiche (Menetrier-Caux, Montmain et al. 1998), mediata, almeno parzialmente, da STAT3 (Park, Nakagawa et al. 2004). L'attivazione di questo fattore di trascrizione sembra, infatti, essere cruciale per la regolazione dell'espansione di MDSC sia *in vitro* che *in vivo* (Nefedova, Huang et al. 2004; Kortylewski, Kujawski et al. 2005; Nefedova, Nagaraj et al. 2005); inoltre, recenti evidenze sottolineano l'importanza dell'attivazione di STAT3 nelle MDSC nell'induzione di angiogenesi (Kujawski, Kortylewski et al. 2008).

### **S100A8/S100A9**

Le proteine pro-infiammatorie S100A8/S100A9 sono sovra-esprese in cellule che infiltrano molti tumori epiteliali e contribuiscono ad amplificare l'infiammazione nel sito tumorale, grazie alle loro proprietà chemo-attraenti nei confronti dei leucociti (Ryckman, Vandal et al. 2003; Gebhardt, Nemeth et al. 2006). Recentemente è stato dimostrato come in animali portatori di tumore questi mediatori siano coinvolti in un circuito di autoregolazione delle MDSC, da cui vengono prodotti e utilizzati come fattore autocrino di reclutamento nel tumore stesso, garantendo perciò il

mantenimento di un microambiente immunosoppressivo (Sinha, Okoro et al. 2008). STAT3 sembra responsabile dell'aumento di S100A8/S100A9, che agiscono anche aumentando la generazione intracellulare di ROS che blocca il differenziamento delle MDSC verso cellule più mature (Cheng, Corzo et al. 2008).

## **CCL2**

CCL2, una delle principali chemochine presenti nel microambiente tumorale è nota per il suo ruolo chemotattico nei confronti di macrofagi, che possono favorire l'angiogenesi e la metastasi (Ben-Baruch 2006; Soria and Ben-Baruch 2008). La sua capacità pro-tumorale sembra dovuta anche al reclutamento di MDSC, che in sinergia con l'azione dei macrofagi, favoriscono la diffusione neoplastica con meccanismi immunologici e non (Huang, Lei et al. 2007). Questa chemochina, inoltre, sembra far parte di un circuito di reciproca attivazione con IL-6 in cellule CD11b<sup>+</sup> isolate dal sangue periferico di pazienti con carcinoma metastatico della prostata: le due molecole proteggono queste cellule dall'apoptosi inducendo proteine anti-apoptotiche ed inducono un fenotipo simile a quello di macrofagi M2 alternativamente attivati (Roca, Varsos et al. 2009).

## **Exosomi**

Un interessante meccanismo di comunicazione tra tumore e cellule mieloidi ultimamente studiato è il rilascio in circolo, da parte della massa neoplastica, di microvescicole, dette exosomi, in grado di trasportare una serie di mediatori proteici. Una prima evidenza dell'influenza degli exosomi tumorali sulla maturazione mielode è riportata nel lavoro di Valenti e colleghi (Valenti, Huber et al. 2006), in cui microvescicole tumorali, derivate sia da linee di melanoma e carcinoma coloretale che dal sangue di pazienti con melanoma, sono in grado di bloccare il differenziamento di monociti CD14<sup>+</sup> in cellule dendritiche. Anche in modelli murini, exosomi tumorali derivati dall'adenocarcinoma mammario TS/A sono in grado di indurre l'accumulo di precursori mieloidi a livello della milza e di inibire il differenziamento di cellule dendritiche *in vitro*; lo stesso blocco maturativo si ha con exosomi derivati da una linea umana di carcinoma mammario. Almeno in topo, l'alterazione del differenziamento

mieloide è mediato da IL-6, sia *in vitro* che *in vivo* (Yu, Liu et al. 2007). Inoltre, quando vengono co-inoculati *in vivo* con cellule tumorali, esosomi derivati dagli adenocarcinomi mammari TS/A e 4T1 provocano un accumulo consistente di cellule CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> anche a livello dell'infiltrato tumorale, accelerando la crescita neoplastica. Queste microvescicole tumorali inducono *in vitro* la sovra-espressione di COX2 e ARG1 in cellule di midollo osseo e aumentano il rilascio di VEGF e IL-6 dalle stesse cellule. L'induzione di MDSC, mediata in questi modelli da PGE2 e TGF- $\beta$  contenuti negli esosomi, sembra correlare direttamente con lo stadio del tumore da cui le microvescicole derivano (Xiang, Poliakov et al. 2009).

## **Attivazione delle MDSC**

Ci sono opinioni discordanti sulla capacità soppressiva di cellule CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> isolate da animali sani; a meno di non arricchire sottotipi cellulari normalmente presenti in percentuali ridotte, se si considerano le macropopolazioni CD11b<sup>+</sup> o Gr-1<sup>+</sup> non si osserva generalmente inibizione della risposta immune *in vitro*, se non quando si usano quantità molto elevate delle stesse cellule nei saggi *in vitro* (Dolcetti, Peranzoni et al.; Kusmartsev, Nefedova et al. 2004; Sinha, Clements et al. 2005; Yang, Cai et al. 2006). Questo induce a pensare che fattori rilasciati dal tumore o da altre cellule del microambiente siano necessari, oltre che per il reclutamento di MDSC, anche per attivare in queste cellule un programma soppressivo. Nonostante si sappia ancora poco a riguardo, la maggior parte dei fattori finora identificati sono secreti da linfociti T attivati e cellule stromali in risposta a stimoli infiammatori, quali infezioni o morte di cellule tumorali, e attivano nelle MDSC una serie di vie di segnalazione che coinvolgono STAT6, STAT1 e NF- $\kappa$ B. Il principale mediatore conosciuto è l'IFN- $\gamma$ , che attivando principalmente la via di STAT1, è responsabile dell'induzione di NOS2 (Kusmartsev and Gabrilovich 2005; Gallina, Dolcetti et al. 2006; Movahedi, Guillemins et al. 2008). In un modello infiammatorio non tumorale, la combinazione di LPS e IFN- $\gamma$  aumenta la capacità soppressiva delle MDSC *in vitro* e genera tolleranza antigene-specifica *in vivo* (Greifengberg, Ribechini et al. 2009). Un'altra importante via molecolare coinvolta nell'attivazione delle MDSC è quella di STAT6, attivata da IL-4 e IL-13 tramite la catena del recettore comune alle due citochine IL-4R $\alpha$ . L'IL-13 prodotta dalle stesse cellule soppressorie o da cellule NKT è importante, in alcuni modelli tumorali, per la

polarizzazione delle MDSC verso un fenotipo M2, con induzione di ARG1 tramite STAT6 (Sinha, Clements et al. 2005; Gallina, Dolcetti et al. 2006), mentre in altri modelli sembrerebbe agire mediante induzione del rilascio della citochina immunosoppressiva TGF- $\beta$  da parte delle MDSC (Terabe, Matsui et al. 2003).

## **Fenotipo e sottopopolazioni delle MDSC**

La popolazione MDSC, come precedentemente affermato, è eterogenea e comprende cellule mieloidi diverse a stadi maturativi differenti. Oltre ai marcatori CD11b e Gr-1, nel topo le MDSC hanno inoltre un fenotipo, generalmente condiviso (F4/80<sup>int</sup>CD11c<sup>low</sup>MHC II<sup>low</sup>). Molti studi negli ultimi anni hanno tentato di chiarire quale porzione delle MDSC sia effettivamente responsabile dell'azione inibitoria nei confronti dei linfociti T. La composizione di queste cellule mieloidi varia da tumore a tumore, ed è fortemente dipendente dall'insieme di fattori rilasciati dalle cellule cancerose, fattori che a loro volta dipendono dall'istotipo tumorale, dalla localizzazione anatomica e dalle dimensioni della massa neoplastica. Alcuni marcatori sono stati proposti per l'identificazione di una frazione soppressiva all'interno della macropopolazione MDSC, come la catena  $\alpha$  del recettore per IL-4 e IL-13 (IL-4R $\alpha$ ) (Gallina, Dolcetti et al. 2006), il recettore per l'M-CSF (Huang, Pan et al. 2006), o la molecola costimolatoria CD80 (Yang, Cai et al. 2006); queste molecole, però, sono risultate strettamente correlate al modello tumorale analizzato, rendendole poco adatte ad essere utilizzate come marker generali delle MDSC. Questi studi hanno fatto strada ad altri, più recenti, che hanno individuato due principali sottopopolazioni di MDSC, una granulocitaria ed una monocitaria, con diverse proprietà immunoregatorie. È stato infatti osservato come l'anticorpo anti-Gr-1, comunemente usato per studiare queste cellule, permetta di distinguere almeno due frazioni cellulari in base alla sua intensità di espressione, una che esprime il marcatore ad alta intensità (Gr-1<sup>high</sup>), prevalentemente costituita da granulociti maturi e immaturi, ed una a minor espressione (Gr-1<sup>int/low</sup>), composta da monociti e altre cellule mieloidi immature (Terabe, Matsui et al. 2003; Gallina, Dolcetti et al. 2006; Van Ginderachter, Meerschaut et al. 2006; Fichtner-Feigl, Terabe et al. 2008). L'anticorpo anti-Gr-1 riconosce, con diversa specificità, due molecole della famiglia genica Ly6, Ly6G e Ly6C, che marcano preferenzialmente cellule granulocitarie e monocitarie, rispettivamente (Fleming, Fleming et al. 1993; Nagendra and Schlueter

2004; Sunderkotter, Nikolic et al. 2004). Negli ultimi due anni diversi gruppi hanno fisicamente isolato MDSC dalla milza di topi portatori di tumore sulla base dell'espressione di queste due molecole, ottenendo due frazioni denominate PMN-MDSC (MDSC polimorfonucleate) e MO-MDSC (MDSC mononucleate) (Movahedi, Guilliams et al. 2008; Youn, Nagaraj et al. 2008). Le PMN-MDSC sono descritte come cellule  $CD11b^{+}Gr-1^{high}Ly6G^{+}Ly6C^{low/int}$  e sono in grado di sopprimere la risposta linfocitaria. A seconda dei modelli tumorali impiegati, la soppressione è attribuita in un caso principalmente alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (Youn, Nagaraj et al. 2008), nell'altro ad un meccanismo  $IFN-\gamma$ -dipendente, ma STAT1-indipendente, che non è mediato da ARG, NOS o ROS (Movahedi, Guilliams et al. 2008). Le MO-MDSC, invece, sono indicate come  $CD11b^{+}Gr-1^{int}Ly6G-Ly6C^{high}$  e, almeno in alcuni modelli, esprimono marcatori monocitari, quali F4/80, CD115, 7/4 e CCR2, a livelli superiori rispetto alla controparte polimorfonucleata. Il meccanismo di soppressione di questa sottopopolazione è mediato da NOS e, almeno parzialmente,  $IFN-\gamma$ -dipendente (Movahedi, Guilliams et al. 2008; Youn, Nagaraj et al. 2008).

Nuovi studi hanno però riesaminato il ruolo relativo di queste frazioni cellulari, utilizzando un criterio di separazione basato sull'intensità di espressione dell'anticorpo anti-Gr-1. In due diversi modelli, uno infiammatorio e uno tumorale, e con metodi di isolamento distinti, uno citofluorimetrico (Greifenberg, Ribechini et al. 2009) e uno immunomagnetico, in parte presentato in questa tesi (Dolcetti, Peranzoni et al.), è possibile suddividere la popolazione MDSC in almeno tre frazioni,  $Gr-1^{high}$ ,  $Gr-1^{int}$  e  $Gr-1^{low}$  con caratteristiche fenotipiche e funzionali peculiari. Nonostante le diverse condizioni sperimentali dei due lavori, la popolazione  $Gr-1^{high}$ , costituita prevalentemente da granulociti  $Ly6G^{high}$ , ha un debole effetto soppressivo sulla risposta T antigene-specifica o allogenica. Al contrario, le frazioni  $Gr-1^{int}$  e  $Gr-1^{low}$ , composte per la gran parte da cellule mieloidi immature con nucleo ad anello e monociti, rispettivamente, sono responsabili dell'inibizione linfocitaria in entrambi i modelli (Dolcetti, Peranzoni et al.; Greifenberg, Ribechini et al. 2009). Un contributo indiretto alla soppressione da parte della sottopopolazione  $Gr-1^{high}$  non può essere escluso, dal momento che queste cellule rilasciano  $IFN-\gamma$  e sono in grado di sopprimere la risposta CTL quando sono presenti *in vitro* in percentuali elevate, superiori al 30%

della coltura linfocitaria, mediante un meccanismo ROS- e NO-mediato (Dolcetti, Peranzoni et al.).

Una simile distinzione tra frazioni mononucleate e polimorfonucleate è descritta anche per MDSC infiltranti il tumore. In due diversi modelli tumorali, le MDSC sono risultate al 90% costituite da monociti  $CD11b^+Gr-1^{low}F4/80^+IL-4Ra^+CCR2^+CX_3CR1^+$  con marker sia di macrofagi M1 che M2, e per il resto da cellule  $Gr-1^{high}F4/80^{low}$  (Umemura, Saio et al. 2008). In un altro lavoro, la componente polimorfonucleata viene reclutata al sito tumorale dal frammento C5a del complemento, mentre quella mononucleata non risente di questo effetto ma è indotta dalla stessa molecola a produrre ROS e RNS (Markiewski, DeAngelis et al. 2008).

## **MDSC umane**

La presenza di MDSC è documentata nell'uomo a livello del sangue periferico e dell'infiltrato neoplastico. Nonostante manchi un analogo del marcatore Gr-1 murino ed il fenotipo delle MDSC sia meno definito che nel topo, anche in questo caso ci sono evidenze dell'esistenza di frazioni granulocitarie e monocitarie. Inizialmente, MDSC provenienti dal sangue di pazienti con carcinoma della testa e del collo, carcinoma polmonare non a piccole cellule e carcinoma del seno sono state descritte come monociti e cellule dendritiche immaturi, cellule mieloidi a stadi differenziativi più precoci, e una bassa percentuale di progenitori ematopoietici (Almand, Clark et al. 2001). Queste cellule inibiscono risposte T allojeniche e antigene-specifiche e, in maniera simile a quanto avviene per le MDSC murine, possono differenziare in cellule dendritiche mature in presenza della combinazione di GM-CSF e IL-4 o di acido *trans*-retinoico (Almand, Clark et al. 2001; Kusmartsev, Cheng et al. 2003). Più recentemente, una popolazione altamente soppressiva è stata riscontrata in pazienti con melanoma metastatico. Queste cellule, con fenotipo  $CD14^+HLA-DR^{/low}$ , non rilevabili in soggetti sani, utilizzano un meccanismo di soppressione mediato da TGF- $\beta$ , indipendente da ARG e NOS, e vengono ulteriormente espanse dalla somministrazione di vaccini con GM-CSF (Filipazzi, Valenti et al. 2007). Inoltre, MDSC con simile fenotipo monocitario sono state identificate in pazienti con carcinoma prostatico (Vuk-Pavlovic, Bulur et al. 2009), con mieloma multiplo e carcinoma della testa e del collo (Serafini, Meckel et al. 2006). L'espansione di una popolazione  $CD14^+HLA-DR^{/low}$  è stata

riscontrata anche nel sangue periferico di pazienti con epatocarcinoma, dove sono in grado di sopprimere la proliferazione linfocitaria mediante ARG e di stimolare cellule Treg (Hoechst, Ormandy et al. 2008).

Una delle prime evidenze di una popolazione MDSC con fenotipo granulocitario CD11b<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>, esprimenti ARG1, deriva dallo studio di pazienti con carcinoma renale (Zea, Rodriguez et al. 2005). Lo stesso gruppo ha successivamente descritto queste cellule come granulociti attivati CD66b<sup>+</sup>VEGFR1<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD16<sup>low</sup> che rilasciano ARG1 in circolo in seguito a degranulazione (Rodriguez, Ernstoff et al. 2009). Una popolazione CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup>IFN- $\gamma$ R<sup>+</sup>, esprime ARG1 e NOS2, viene espansa in pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule e correla con la riduzione della catena CD3 $\zeta$  in linfociti T ed una minore risposta alla chemioterapia (Liu, Wang et al. 2009). In pazienti con melanoma o carcinoma del colon, il marcatore IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup>, che caratterizza le MDSC in alcuni modelli tumorali murini, è espresso da due popolazioni MDSC umane, una monocitaria e una granulocitaria, ma la sua espressione correla con l'attività soppressoria solo nella frazione CD14<sup>+</sup> (Mandrizzato, Solito et al. 2009).

Come inizialmente riportato nei primi studi sulle MDSC umane, queste cellule comprendono spesso elementi cellulari immaturi (Almand, Clark et al. 2001). In pazienti con carcinoma renale, per esempio, le MDSC possono essere isolate dal sangue periferico nella frazione Lin<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>; queste cellule mostrano fenotipo sia monocitario che granulocitario, agiscono con meccanismo regolato da ROS e NO e possono essere differenziate *in vitro*, perdendo la loro attività soppressiva, tramite acido *trans*-retinoico (ATRA) (Kusmartsev, Su et al. 2008). In un altro studio su pazienti con carcinoma mammario, il numero di cellule Lin<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> correla con lo stadio della neoplasia e l'estensione delle metastasi (Diaz-Montero, Salem et al. 2009).

## Targeting terapeutico delle MDSC

Dato che le MDSC prendono parte ad uno dei principali circuiti immunosoppressivi durante lo sviluppo tumorale, sono studiati diversi approcci farmacologici che mirano ad eliminare queste cellule o a modularne la funzione. Queste terapie, che si propongono come supporto all'immunoterapia anti-tumorale, possono agire interferendo con diversi aspetti della biologia delle MDSC: reclutamento e accumulo agli organi linfoidi secondari, maturazione e attivazione. Alcune strategie che mirano ad eliminare in modo non selettivo la popolazione CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>, quali l'utilizzo di anticorpi depletanti anti-Gr-1 o l'impiego di chemioterapici come la gemcitabina, hanno dato risultati incoraggianti in termini di recupero della risposta T anti-tumorale (Bronte, Chappell et al. 1999; Terabe, Matsui et al. 2003; Suzuki, Kapoor et al. 2005); questi trattamenti, però, eliminando oltre alle MDSC, anche altre cellule mieloidi, tra cui i granulociti maturi, vanno valutati con cautela perchè possono rendere l'ospite suscettibile ad infezioni opportunistiche. Il reclutamento di MDSC può essere ostacolato anche interferendo con STAT3, come accade con l'inibitore dell'attività tirosin chinasi Sunitinib, che riduce le MDSC in pazienti con carcinoma renale, o l'inibitore di COX2, con riduzione sia del numero di MDSC che della loro attività (Talmadge, Hood et al. 2007; Ko, Zea et al. 2009). Un altro approccio interessante, utile soprattutto nelle fasi iniziali dello sviluppo tumorale, quando l'accumulo di MDSC è ancora limitato, è la conversione di queste cellule in cellule dendritiche mature che funzionino da APC. La 1- $\alpha$ 25-diidrossivitamina D<sub>3</sub>, un metabolita della vitamina D<sub>3</sub>, è in grado di ridurre l'induzione di MDSC a favore di cellule dendritiche mature, principalmente bloccando il rilascio di GM-CSF (Young, Halpin et al. 1993; Lathers, Clark et al. 2004). Un simile effetto di maturazione di MDSC verso DC mature, con miglioramento della risposta immune anti-tumorale, si ha con l'utilizzo di acido *trans*-retinoico (ATRA) (Kusmartsev, Cheng et al. 2003).

Infine, un altro possibile intervento terapeutico riguarda il blocco dell'attività delle MDSC, prevalentemente tramite l'inibizione degli enzimi ARG1 e NOS2. Inibitori specifici dei due enzimi, purtroppo, non sono utilizzabili in clinica, a causa dei severi effetti collaterali che possono causare. Recentemente, però, alcuni farmaci, utilizzati in clinica per altre patologie, si sono dimostrati efficaci nell'alterare l'azione di questi due enzimi, migliorando la risposta anti-tumorale. Le nitro-aspirine, da un lato,

interferiscono con la via di NOS2 grazie al loro gruppo NO-donatore, e probabilmente con quella di ARG1 mediante la porzione salicilica, che può anche inibire COX2 (De Santo, Serafini et al. 2005); dall'altro, inibitori della fosfodiesterasi 5 (PDE5) migliorano il reclutamento di linfociti T al tumore e riducono l'espressione di NOS2 e ARG1 (Serafini, Meckel et al. 2006). Con i recenti studi sulle sottopopolazioni di MDSC e i loro meccanismi si potranno disegnare strategie terapeutiche sempre più mirate all'inibizione, fisica o funzionale, solo della frazione cellulare realmente soppressiva, riducendo così al minimo le conseguenze di una mielo-ablazione marcata.

## **miRNA e mielopoiesi**

Nell'ultimo decennio un ulteriore livello di complessità è stato aggiunto allo studio della regolazione del sistema immunitario con la scoperta dei microRNA (miRNA). Queste molecole, piccoli RNA a singolo filamento di circa 21 nucleotidi, molto conservati tra le diverse specie, regolano l'espressione genica mediante appaiamento perfetto o quasi perfetto ad una sequenza di 7-8 nucleotidi (nota come "seed sequence") nella porzione 3' UTR (untranslated region) del miRNA con conseguente degradazione dello stesso o blocco della sintesi proteica. I miRNA sono coinvolti in molti processi biologici fondamentali, quali la proliferazione cellulare, l'apoptosi, il differenziamento, lo sviluppo embrionale e la tumorigenesi (Bartel and Chen 2004; He and Hannon 2004; Calin and Croce 2006; Shivdasani 2006). Inoltre, queste molecole sono cruciali per lo sviluppo del sistema immunitario e l'ematopoiesi, processi che vengono notevolmente alterati da delezioni di specifici step della biogenesi dei miR (Muljo, Ansel et al. 2005; O'Carroll, Mecklenbrauker et al. 2007; Baltimore, Boldin et al. 2008; Lodish, Zhou et al. 2008). Da studi di sequenziamento e microarray, nelle cellule del sistema immunitario alcuni miRNA risultano variamente espressi a seconda dello stadio differenziativo, del lineage e dello stato di attivazione cellulare (Chen, Li et al. 2004; Monticelli, Ansel et al. 2005; Ramkisson, Mainwaring et al. 2006; Georgantas, Hildreth et al. 2007; Neilson, Zheng et al. 2007; Wu, Neilson et al. 2007). In letteratura sono, inoltre, stati già descritti alcuni miRNA coinvolti nel differenziamento o nella regolazione dell'attività di cellule mieloidi. Il miR-223, ad esempio, sembra regolare negativamente il differenziamento granulocitario e l'attivazione dei neutrofili; studi di delezione di questo miRNA in modelli murini hanno evidenziato negli animali mutanti un'iperplasia

granulocitaria midollare e un aumentato numero di neutrofili circolanti, caratterizzati da fenotipo ipermaturo e ipersensibilità a stimoli di attivazione, e in cellule umane questo miRNA è parte di un circuito di regolazione che coinvolge in fattori di trascrizione NFI-A e C/EBP $\alpha$ , cruciale per la granulopoiesi (Johnnidis, Harris et al. 2008). Un altro recente lavoro suggerisce che i miR-17-5p, miR-20a e miR-106a, appartenenti ad un unico cluster genico, siano invece coinvolti nella maturazione monocitaria, durante la quale l'espressione di queste molecole declina, in parallelo con la sovraespressione del loro target AML1, fattore di trascrizione che attiva il recettore per il macrophage-colony stimulating factor (M-CSFR) e necessario alla maturazione monocito-macrofagica (Fontana, Pelosi et al. 2007). Per quanto concerne l'attivazione di cellule mieloidi, è noto che i miR-155, miR-9 e miR-146a vengono up-regolati in seguito a stimoli pro-infiammatori, quali ad esempio LPS e TNF (Taganov, Boldin et al. 2006; O'Connell, Taganov et al. 2007). Il miR-155 sembra coinvolto nella presentazione antigenica mediata da cellule dendritiche mieloidi (Rodriguez, Vigorito et al. 2007) e nella proliferazione/differenziamento di cellule appartenenti a questo lineage, mentre risulta overespresso sia in leucemie mieloidi acute umane (Garzon, Garofalo et al. 2008) che in una sindrome mieloproliferativa murina (O'Connell, Rao et al. 2008). I miR-9 e miR-146a, che vengono indotti in cellule monocitarie umane da LPS in modo dipendente da NF-kB, agiscono probabilmente da regolatori negativi dell'infiammazione, avendo come bersaglio alcune proteine coinvolte nel signaling di NF-kB stesso (Bazzoni, Rossato et al. 2009), di recettori Toll-like o recettori citochinici (Taganov, Boldin et al. 2006; Hou, Wang et al. 2009).

Date queste premesse, abbiamo perciò deciso di studiare quale fosse il profilo di espressione dei miRNA nelle MDSC indotte dalla crescita di diversi modelli tumorali murini, rispetto a quello di cellule mieloidi prive di attività immunosoppressiva, per capire se e come questi mediatori siano coinvolti nel differenziamento e nell'attività immunosoppressiva di queste cellule.

# MATERIALI E METODI

## Linee cellulari

Sono state utilizzate le seguenti linee tumorali: carcinomi mammari 4T1 e TS/A, e colon carcinoma CT26, derivate da topi BALB/c (aplotipo H-2<sup>d</sup>); linfoma MBL-2, timoma EL-4 e fibrosarcoma indotto da 3-metilcolantrene MCA203, derivate da topi C57BL/6 (aplotipo H-2<sup>b</sup>). La linea C26-GM (aplotipo H-2<sup>d</sup>) è stata derivata da cellule di colon carcinoma C26 geneticamente modificate per rilasciare GM-CSF (Bronte, Serafini et al. 2003) e mantenuta in coltura con terreno addizionato con antibiotico geneticina (G418, Gibco) alla concentrazione di 0.8 mg/ml. La linea CT26HA (aplotipo H-2<sup>d</sup>), derivante dalla linea CT26 stabilmente trasfettata per esprimere l'antigene dell'emagglutinina HA. Il clone 4V è stato ottenuto trasfettando stabilmente la linea 4T1, mediante elettroporazione, con un plasmide shRNA (Mission shRNA di Sigma Aldrich) diretto contro il gene del GM-CSF ed è stato mantenuto in coltura con l'antibiotico puromicina (Sigma Aldrich) alla concentrazione di 3 µg/ml. La linea umana di carcinoma renale embrionale HEK293T (293T). Tutte le linee cellulari sono state coltivate in terreno DMEM (Invitrogen), addizionato con 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES, 20 µM 2-β-mercaptoetanolo, 150 U/ml streptomicina, 200 U/ml penicillina, ed il 10% di siero fetale bovino inattivato al calore (FBS, Gibco), tranne la linea HEK293T, coltivata in terreno analogo ma privo di 2-β-mercaptoetanolo.

Le linee tumorali sono state tutte inoculate sottocute, sul fianco dell'animale, alla dose di  $1 \times 10^6$  cellule/topo. Per gli esperimenti con le linee 4T1 e 4V, i tumori sono stati inoculati sottocute alla dose di  $5 \times 10^5$  cellule/topo.

## Topi

Sono stati utilizzati topi femmina C57BL/6 (aplotipo H-2<sup>b</sup>) e BALB/c (aplotipo H-2<sup>d</sup>) di età compresa tra le otto e le dodici settimane d'età, della ditta Harlan (San Pietro al Natisone, Italy). Topi transgenici CL4 di background BALB/c con linfociti T CD8<sup>+</sup> esprimenti un TCR<sub>α/β</sub> ristretto per K<sup>d</sup> per il peptide HA<sub>512-520</sub>, derivano da animali ottenuti dalla Dott.ssa L. Sherman (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA). I topi

transgenici pmel-1 di background C57BL/6 con linfociti T CD8<sup>+</sup> che esprimono il TCR V<sub>α</sub>1V<sub>β</sub>13 ristretto per H-2D<sup>b</sup> per il peptide murino ed umano gp100<sub>25-33</sub> (Overwijk, Theoret et al. 2003), sono stati forniti dal Dott. N. Restifo (Surgery Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

### **Sorting immunomagnetico**

Cellule CD11b<sup>+</sup> totali sono state isolate dalla milza o dall'infiltrato tumorale, a partire da 1x10<sup>8</sup> cellule, mediante un anticorpo anti-CD11b coniugato a microbiglie magnetiche ed eluizione con colonne LS, secondo le indicazioni della ditta produttrice (Miltenyi Biotec).

Il sorting delle frazioni Gr-1<sup>high</sup>, Gr-1<sup>int</sup> e Gr-1<sup>low</sup> è stato eseguito a partire da 1x10<sup>8</sup> di cellule di milza o di colture di midollo con GM-CSF e IL-6. Le cellule sono state marcate con 100 µl di anti-FcγR in PEB (PBS, 2 mM EDTA, 0.5% BSA) per 10 minuti a 4 °C; marcate poi con 31 µl di anti-Ly6G-biotinilato in PEB per 10 minuti a 4 °C; lavate, centrifugate e marcate con 200 µl microbiglie anti-biotina in PEB per 15 minuti a 4 °C; lavate, centrifugate e risospese in 1 ml di PEB; la frazione Gr-1<sup>high</sup> è stata sortata mediante una colonna LS. La popolazione cellulare negativa, derivante dal passaggio precedente, è stata centrifugata e marcata con 114 µl di anti-Gr-1-biotinilato in PEB, per 10 minuti a 4 °C; le cellule sono state lavate e centrifugate; marcate con 50 µl di microbiglie-streptavidina in PEB per 15 minuti a 4 °C; lavate, centrifugate e risospese in 1 ml di PEB; la frazione Gr-1<sup>int</sup> è stata quindi sortata con una colonna LS. La popolazione cellulare negativa, derivante dal passaggio precedente, è stata centrifugata e marcata con 50 µl di microbiglie-anti-CD11b in PEB per 15 minuti a 4 °C; le cellule sono state lavate, centrifugate e risospese in 1 ml di PEB; la frazione Gr-1<sup>low</sup> è stata sortata con una colonna LS. Tutti gli anticorpi, le colonne e i magneti utilizzati sono della ditta Miltenyi Biotec. PBS, BSA e EDTA sono di Sigma Aldrich.

### **Saggio E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

1x10<sup>6</sup> di cellule tumorali sono state piastrate in 300 µl di DMEM 10%, preparato come precedentemente indicato, in piastre da 24 pozzetti (BD Falcon); il surnatante è stato prelevato dopo 48 ore, centrifugato per eliminare eventuali cellule in sospensione, e

utilizzato in test E.L.I.S.A. per il rilascio di GM-CSF (Endogen), G-CSF (Biosource) o IL-6 (eBioscience), seguendo i protocolli delle ditte produttrici.

## **Citofluorimetria**

Le cellule ( $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$ ), dopo lisi ipotonica dei globuli rossi, sono state lavate in PBS ed incubate con anticorpo anti-Fc- $\gamma$  receptor 2.4G2 per 10 minuti a 4 °C per ridurre il legame aspecifico. I campioni sono stati quindi marcati con gli anticorpi di interesse (o i relativi isotipi di controllo) per 20 minuti a 4 °C, lavati in PBS e risospesi in 300  $\mu$ l di PBS per l'analisi al citofluorimetro. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-CD11b-PerCPCy5.5, anti-Gr-1-APC, anti-CD8a-PE/Cy5, anti-CD8a-PE, anti-CD117(c-kit)-PE, anti-CD11c-PE della ditta Biolegend; gli anticorpi anti-CD124-PE, anti-CD62L-FITC, anti-CD11c-FITC, anti-Ly6G-PE, anti-Ly6C-FITC, anti-Sca-1(Ly6A/E)-FITC della ditta BD Pharmingen; F4/80-FITC della ditta AbD Serotec; anti-CD90.1(Thy1.1)-PE della eBioscience. Per rilevare l'apoptosi, le cellule sono state incubate con Annexin V-FITC (Biolegend) in AnnexinV buffer per 15 minuti a temperatura ambiente, risospese in 300  $\mu$ l di buffer ed analizzate al citofluorimetro entro 30 minuti. Per analizzare la vitalità cellulare è stato utilizzato il colorante 7-AAD, con incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente e risospensione, senza lavaggio, in 300  $\mu$ l di PBS.

Per l'analisi della produzione intracellulare della citochina IFN- $\gamma$ , le cellule sono state incubate per 10 ore con GolgiStop (BD Pharmingen), lavate e marcate con gli anticorpi di superficie anti-CD90.1(Thy-1.1)-PE e anti-CD8a-PE/Cy5 per 20 minuti a 4 °C. Dopo lavaggio, le cellule sono state fissate e permeabilizzate per 20 min a 4 °C (Cytofix/Cytoperm Kit, BD Pharmingen). Le cellule sono quindi state lavate con Perm/Wash (BD Pharmingen) e poi marcate in Perm/Wash con l'anticorpo anti-mouse IFN- $\gamma$  (o relativo controllo isotipico) per 20 minuti a 4 °C. Le cellule sono state lavate in Perm/Wash e risospese in 200  $\mu$ l di PBS per l'analisi al citofluorimetro. I campioni sono stati acquisiti con il citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences) ed analizzati impiegando il programma FlowJo (Tree Star, Inc.).

## **Culture leucocitarie miste stimolate con peptide (MLPC)**

Le colture MLPC in ceppo BALB/c sono state allestite mescolando splenociti BALB/c  $\gamma$ -irradiati e splenociti di topi CL4, aventi linfociti T CD8<sup>+</sup> HA-specifici, in rapporto tale da

ottenere l'1% di CTL HA-specifici nella coltura finale.  $6 \times 10^5$  cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti con fondo piatto (BD Falcon) e stimolate per 5 giorni con 1  $\mu\text{g/ml}$  del peptide HA<sub>512-520</sub> per cinque giorni. In ceppo C57BL/6, gli splenociti sono stati mescolati con cellule provenienti dalla milza di topi pmel-1, aventi linfociti T CD8<sup>+</sup> gp100-specifici, in rapporto tale da ottenere il 2% di CTL gp100-specifici nella coltura finale.  $6 \times 10^5$  cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti con fondo piatto (BD Falcon) e stimolate per 5 giorni con 1  $\mu\text{g/ml}$  del peptide hgp100<sub>25-33</sub> per cinque giorni. Dove previsto, cellule MDSC (derivate da sorting immunomagnetico o da colture di midollo osseo con citochine) sono state aggiunte come terza parte alle colture, in percentuali scalari dal 24% al 3% della coltura MLPC.

Negli studi di proliferazione dei linfociti T CD8<sup>+</sup>, gli splenociti dei topi CL4 sono stati marcati in PBS con 1  $\mu\text{M}$  di carbossi-fluorescein-diacetato succinimidil estere (CFSE) per 5 minuti a 37 °C (Invitrogen Molecular Probe). La marcatura è stata bloccata con 1/5 di volume di siero e le cellule lavate due volte con PBS 2% FBS. Dopo risospensione in terreno di coltura, gli splenociti marcati sono stati mescolati a splenociti BALB/c  $\gamma$ -irradiati come sopra indicato e coltivati in modo analogo col peptide HA<sub>512-520</sub> per tre giorni.

Le colture sono state mantenute in incubatore a 37 °C al 5% CO<sub>2</sub>, in terreno RPMI con 10% FBS (Biochrom) inattivato al calore, 2 mM di L-glutamina, 1 mM di sodio piruvato, 150 U/ml di streptomicina, 200 U/ml di penicillina, 20  $\mu\text{M}$  di 2 $\beta$ -mercaptoetanololo.

## **Valutazione della citotossicità mediante saggio di rilascio di <sup>51</sup>Cromo**

L'attività litica delle colture MLPC è stata valutata mediante un saggio citotossicità a breve termine di incubazione, utilizzando come target cellulari, per colture BALB/c, la linea CT26, pulsata o meno con il peptide HA<sub>512-520</sub>, o, per colture C57BL/6, la linea MBL-2, pulsata o meno con il peptide hgp100<sub>25-33</sub> ( $1 \times 10^6$  di cellule con 1  $\mu\text{g}$  di peptide in entrambi i casi). Le cellule target sono state incubate per un'ora a 37 °C con 100  $\mu\text{Ci}$  di Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (PerkinElmer). Al termine della marcatura, le cellule sono state opportunamente lavate e risospese in terreno RPMI 5% FBS, alla concentrazione di  $2 \times 10^4/\text{ml}$ ; 100  $\mu\text{l}$  di tale sospensione cellulare sono stati seminati in triplicato in una

micropiastra da 96 pozzetti con fondo a U in presenza di diluizioni scalari di cellule effettrici derivate dalle MLPC, distribuite anch'esse in 100µl ed in triplicato. Le micropiastre sono state centrifugate per 1 minuto ed incubate a 37 °C per 5 ore. Dopo l'incubazione, 30 µl di surnatante sono stati prelevati da ogni pozzetto e trasferiti in micropiastre con scintillante solido (PerkinElmer). Dopo aver lasciato asciugare le piastre, la radioattività emessa è stata misurata con un contatore di scintillazione  $\gamma$  per piastre (Top Count, PerkinElmer). La percentuale di lisi specifica è stata calcolata da ciascun pozzetto utilizzando la seguente formula:

$$\% \text{ lisi} = 100 \cdot \frac{(R_{\text{sper}} - R_{\text{min}})}{(R_{\text{max}} - R_{\text{min}})}$$

dove  $R_{\text{sper}}$  è il rilascio sperimentale di ciascun pozzetto di co-coltura effettori/target,  $R_{\text{min}}$  è il rilascio spontaneo di cellule target in assenza di effettori e  $R_{\text{max}}$  è il rilascio massimo ottenuto dopo lisi forzata delle cellule, ottenuta incubando i target in terreno con SDS 0.5%. Le unità litiche al 30% (L.U.<sub>30</sub>) sono state calcolate come il numero di cellule effettrici in grado di indurre il 30% di lisi in 2000 cellule target. La percentuale di L.U.<sub>30</sub> è stata calcolata come il rapporto tra L.U.<sub>30</sub> del gruppo sperimentale e L.U.<sub>30</sub> del gruppo di controllo (coltura MLPC senza MDSC).

### **Saggio di proliferazione per diluizione di CFSE**

Dopo tre giorni dall'allestimento delle colture MLPC, aventi CTL HA-specifici marcati con CFSE, sopra descritte, le cellule sono state raccolte e marcate con anticorpi anti-CD8 ed anti-Thy1.1 e la percentuale di cellule proliferanti è stata determinata valutando la diluizione del CFSE all'interno della popolazione CD8<sup>+</sup> Thy1.1<sup>+</sup> impiegando il programma FlowJo (Tree Star, Inc.).

### **Tolleranza in vivo**

Negli esperimenti di tolleranza *in vivo* indotta dalle MDSC in animali con tumori 4T1 e 4V (schema in figura 4B), i topi sono stati inoculati sottocute sul fianco con 5x10<sup>5</sup> cellule tumorali. Dopo sette giorni, agli animali sono stati trasferiti 20x10<sup>6</sup> splenociti di topi CL4 (corrispondenti a circa 5x10<sup>6</sup> linfociti T CD8<sup>+</sup> HA-specifici secondo analisi citofluorimetrica). Due giorni dopo il trasferimento i topi sono stati vaccinati sottocute con 100 µg/topo di peptide HA<sub>512-520</sub> in emulsione con adiuvante di Freund incompleto

(IFA). Sei giorni dopo la vaccinazione gli animali sono stati sacrificati e  $5 \times 10^5$  cellule prelevate da milza e linfonodi sono state coltivate per 22 ore in presenza di 20 U/ml di rIL-2 (Chiron) e 1  $\mu\text{g/ml}$  di peptide HA<sub>512-520</sub>. Le colture sono state analizzate per il rilascio di IFN- $\gamma$  sia mediante marcatura intracitoplasmatica valutata in citofluorimetria, sia mediante test ELISpot.

### **Saggio ELISPOT (Enzyme-Linked Immunoassorbent Spot Assay)**

Il saggio è stato eseguito usando il kit per la rilevazione di IFN- $\gamma$  murino BD Pharmingen, seguendo le istruzioni allegate, e le piastre MULTIscreen HTS (Millipore). Il numero di spot è stato valutato in triplicato mediante il lettore automatico di piastre KS e il relativo software.

### **Matrigel e immunoistochimica**

Per valutare la dinamica di crescita precoce e l'infiltrato tumorale delle linee 4T1 e 4V,  $7.5 \times 10^4$  cellule sono state risospese in 500  $\mu\text{l}$  di Matrigel ad alta densità, privo di fattori di crescita, e inoculate *in vivo* sul fianco dell'animale. Dopo 6 giorni, le matrici sono state prelevate, incluse in OCT (Killik) e congelate. Le crio-sezioni sono state fissate in acetone freddo, marcate con gli anticorpi anti-CD31, anti-NG2 o anti-CD11b, seguiti dai rispettivi anticorpi secondari, da marcatura con neutravidina coniugata a fosfatasi alcalina e reazione col cromogeno Vulcan Fast Red (Biocare Medical). Le sezioni sono state poi contro-marcate con ematossilina ed esaminate in doppio cieco.

### **Induzione di metastasi**

Per indurre metastasi polmonari, topi Balb/c sono stati inoculati endovena (i.v.) con  $10^5$  cellule tumorali 4T1 (n=10) o 4V (n=10). Dopo 17 giorni dall'inoculo gli animali sono stati sacrificati ed i polmoni, una volta asportati, sono stati fissati in soluzione di Bouin (soluzione satura di acido picrico, formalina e acido acetico glaciale). Il numero di metastasi polmonari è stato valutato tramite conta in doppio cieco.

## **Colorazione May-Grünwald-Giemsa**

Per le colorazioni citologiche, le cellule sono state risospese a  $1 \times 10^5$  /ml in PBS e  $5 \times 10^5$  cellule sono state centrifugate tramite Cytospin 3 (Shandon) su vetrini da microscopia, a 800 rcf per 3 minuti. I preparati sono stati lasciati seccare all'aria per 20 minuti e successivamente fissati in metanolo a  $-20^\circ\text{C}$  per 5 minuti. La colorazione è stata eseguita con May-Grünwald (diluito 1:1 in buffer fosfato pH 6.8) per 1 minuto, e, dopo eliminazione del colorante in eccesso, con Giemsa (diluito 1:17 in buffer fosfato pH 6.8) per 20 minuti, e seguita da lavaggio in buffer fosfato pH 6.8 per 2 minuti.

## **Colture di BM-MDSC da midollo osseo**

Le tibie ed i femori di topi BALB/c o C57BL/6 sono state rimosse utilizzando tecniche sterili ed il midollo osseo è stato isolato mediante lavaggi con terreno eseguiti con una siringa. I globuli rossi sono stati lisati con una soluzione di cloruro di ammonio.  $1.2 \times 10^6$  cellule di midollo sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti in 3 ml di terreno RPMI 10% FBS (Biochrom), 2 mM di L-glutamina, 1 mM di sodio piruvato, 150 U/ml di streptomycina, 200 U/ml di penicillina, 20  $\mu\text{M}$  di 2 $\beta$ -mercaptoetanololo, addizionato con le citochine GM-CSF (40 ng/ml, Peprotech) e IL-6 (40 ng/ml, Peprotech). Le colture così allestite sono state incubate per 4 giorni a  $37^\circ\text{C}$  in atmosfera satura di vapore acqueo al 5% di  $\text{CO}_2$ . Le cellule sono state raccolte, rimuovendo la frazione aderente con PBS EDTA 2 mM, e lavate in terreno o PBS. Per le colture con i surnatanti delle linee 4T1 e 4V, le cellule tumorali sono state piastrate in fiasca T75 e, una volta raggiunta la sub-confluenza, sono state tenute per 48 ore in terreno completo di additivi al 3% di FBS. Il surnatante è stato quindi prelevato, centrifugato per eliminare eventuali cellule in sospensione e utilizzato o congelato a  $-80^\circ\text{C}$ .  $1 \times 10^6$  cellule di di midollo sono state piastrate in pozzetti da 24 in 1 ml finale di terreno con il 20% di surnatante derivato dalle linee tumorali. Le cellule così trattate sono state utilizzate dopo quattro giorni di coltura.

## **Trasfezione di cellule di midollo osseo con miRNA maturi**

Cellule di midollo sono state prelevate sterilmente come sopra indicato da tibia e femore di topi BALB/c o C57BL/6, e dopo lisi ipotonica dei globuli rossi, sono state piastrate a  $1.2 \times 10^6$  cellule a pozzetto, in piastre da 6 pozzetti, in 1 ml di terreno RPMI

10% FBS completo di additivi. I miRNA maturi (B-Bridge) sono stati trasfettati alla concentrazione finale di 20 nM con il reagente GeneSilencer (Genlantis), secondo le istruzioni fornite dal produttore. Dopo 4 ore dalla trasfezione, le citochine GM-CSF e IL-6 sono state aggiunte alle colture, alla concentrazione di 40 ng/ml ciascuna, in 3 ml finali di coltura. Le colture sono state incubate a 37 °C per quattro giorni, per poi essere analizzate fenotipicamente o aggiunte come terza parte a colture MLPC.

## **Clonaggio in pMIR-REPORT**

Le sequenze del 3' UTR dei geni target candidati per i miRNA in esame sono state amplificate mediante PCR con PfuTurbo (Stratagene) e clonate nel plasmide shuttle pCR-Blunt (Invitrogen). Dopo screening delle colonie positive tramite PCR, le sequenze sono state clonate nel sito di policlonaggio del plasmide pMIR-REPORT (Ambion), esprimente la proteina *Firefly luciferase*, con restrizione SpeI/SacI (NEB). La correttezza delle porzioni 3' UTR inserite è stata poi verificata mediante sequenziamento.

## **Test luciferasi**

Per testare l'azione dei miRNA sulle regioni 3' UTR clonate,  $1 \times 10^5$  cellule HEK293T sono state piastrate in piastre da 24 pozzetti, in 500  $\mu$ l di DMEM 10% FBS completo di additivi ma privo di antibiotico, e trasfettate mediante Lipofectamine2000 (Invitrogen) e Optimem (Gibco) con 400 ng di plasmide pMIR-REPORT, 200 ng di plasmide pRL-TK, esprimente *Renilla luciferase*, e 20 nM di miRNA maturi. Dopo 40 ore le cellule sono state raccolte in PBS e analizzate per l'emissione di luminescenza con il kit Dual-Glo (Promega) e piastre nere Optiplate (PerkinElmer) utilizzando il lettore di piastre VictorX4 (PerkinElmer).

## **miRNA Chip**

Per i chip di espressione dei miRNA è stato ibridizzato l'RNA totale, estratto mediante Trizol Reagent (Invitrogen), da almeno  $10 \times 10^6$  cellule CD11b<sup>+</sup> isolate da milza di topi sani, CD11b<sup>+</sup> isolate dalla milza di topi portatori di tumore e CD11b<sup>+</sup> isolate dall'infiltrato tumorale. Ciascun campione era costituito da cellule isolate immunomagneticamente da pool di 3 milze o 3 tumori, nel caso di animali portatori di

tumore, o 6 milze nel caso di animali sani. Ogni gruppo sperimentale è stato analizzato in triplicato (per un totale di 9 animali per le MDSC spleniche o intratumorali, o 18 animali per le CD11b<sup>+</sup> di animali sani). Le MDSC sono state isolate da topi con i tumori 4T1, TS/A e C26-GM, in ceppo BALB/c, e tumori MCA203 e EL-4, in ceppo C57BL/6. L'ibridizzazione dei chip è stata eseguita dal gruppo del Prof. Marincola presso l'NIH di Bethesda con una piattaforma non commerciale, costituita da sonde complementari a quelle depositate nel database Sanger mirBASE versione 9.1. L'analisi dei miRNA differenzialmente espressi è stata realizzata mediante tecnica SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher, Tibshirani et al. 2001).

### **Analisi statistica**

La significatività statistica dei confronti eseguiti tra i gruppi sperimentali è stata valutata tramite test t di Student. Nelle figure, gli asterischi sono stati utilizzati come segue: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .



## SCOPO DELLA TESI

Le cellule soppressorie di derivazione mieloide (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) sono state intensamente studiate nell'ultimo decennio per la loro rilevanza nell'ostacolare la risposta immunitaria anti-tumorale.

Questa popolazione cellulare è estremamente eterogenea in termini di fenotipo, comprendendo cellule a diversi stati differenziativi e appartenenti a vari lineage maturativi. Nel topo le MDSC sono genericamente definite dai marcatori CD11b e Gr-1, ma recenti evidenze hanno messo in luce la presenza di sottopopolazioni cellulari distinte per fenotipo e proprietà immunosoppressive. Nello studio delle MDSC in diversi modelli tumorali murini, il nostro gruppo, in parallelo ad altri, ha da tempo descritto la presenza di cellule CD11b<sup>+</sup> con diversa intensità di espressione del marcatore Gr-1. Negli ultimi anni, grazie ad una collaborazione con la ditta Miltenyi Biotec, siamo stati in grado di mettere a punto un protocollo di separazione immuno-magnetica che arricchisce almeno tre sottopopolazioni di MDSC, distinte per l'espressione differenziale di Gr-1. Questo nuovo protocollo ci ha permesso di studiare le proprietà fenotipiche e funzionali, sia *in vitro* che *in vivo*, delle diverse frazioni cellulari.

Scopo della presente tesi è stato lo studio, da un lato, dell'influenza della citochina GM-CSF, fondamentale per il reclutamento delle MDSC, sull'espansione e l'attivazione delle diverse sottopopolazioni e, dall'altro, la ricerca di microRNA implicati nel differenziamento e nella funzione di queste cellule. Capire quale sia, all'interno della macropopolazione eterogenea di MDSC, la frazione realmente responsabile dei fenomeni immunosoppressivi e come questa venga regolata, in termini differenziativi e funzionali, da citochine e altri regolatori molecolari quali i miRNA, è di cruciale importanza al fine di sviluppare approcci terapeutici mirati all'eliminazione e/o alla modulazione di queste cellule, in modo da favorire la risposta antitumorale innata o indotta da immunoterapia.



# RISULTATI

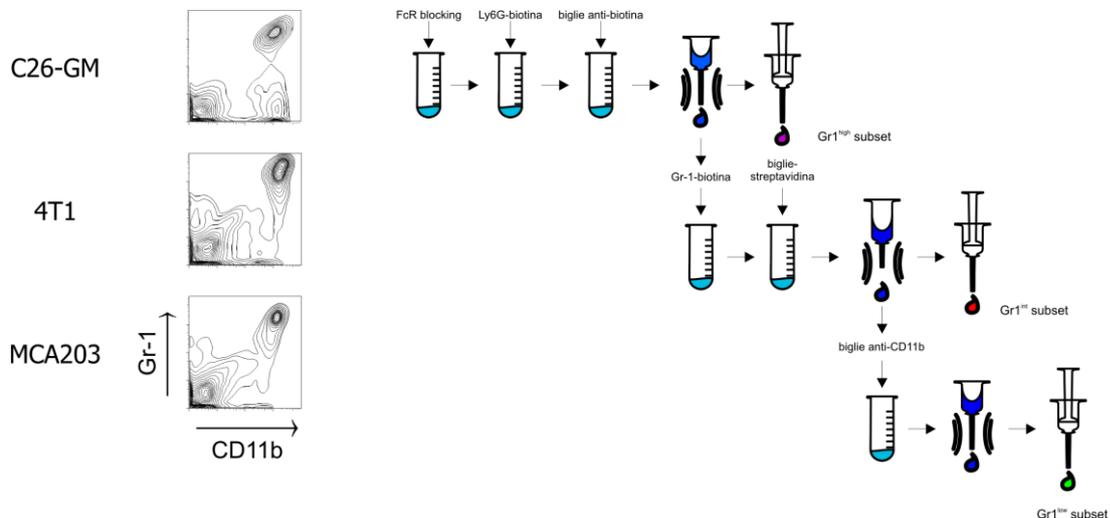
## **Isolamento di sottopopolazioni di MDSC mediante sorting immunomagnetico**

Tre sottopopolazioni, denominate Gr-1<sup>high</sup>, Gr-1<sup>int</sup> e Gr-1<sup>low</sup>, sono state arricchite a partire da splenociti di topi inoculati sottocute con i tumori trapiantabili C26-GM (carcinoma del colon geneticamente modificato per rilasciare elevate quantità di GM-CSF), 4T1 (adenocarcinoma mammario) e MCA203 (sarcoma indotto chimicamente da metilcolantrene). Per assicurare un'analisi più estesa, sono stati scelti tumori differenti per istologia, background genetico, accumulo di MDSC e distribuzione del marcatore Gr-1.

L'anticorpo anti-Gr-1 murino comunemente usato in citofluorimetria (clone RB6-8C5) riconosce in realtà due molecole, Ly6G e Ly6C, con diversa affinità e non è perciò utile da solo alla distinzione di sottopopolazioni con differente intensità di espressione. Nella procedura di separazione immunomagnetica da noi sfruttata, abbiamo, quindi, optato per una combinazione di anticorpi che permettesse di ottenere in modo ripetibile dei subset cellulari il più possibile puri. Brevemente, nel protocollo scelto, illustrato in figura 1, la frazione Gr-1<sup>high</sup> viene arricchita mediante l'anticorpo anti-Ly6G; la popolazione Ly6G<sup>-</sup> viene, quindi, sottoposta a successivo sorting con anticorpo anti-Gr-1, permettendo di ottenere la frazione Gr-1<sup>int</sup>. La popolazione Gr-1<sup>-</sup> del secondo sorting, che contiene ancora cellule a bassa intensità di Gr-1, viene poi separata con anticorpo anti-CD11b, a dare la frazione Gr-1<sup>low</sup>.

Come riassunto in figura 2A, dopo il sorting le cellule ottenute sono state caratterizzate fenotipicamente, mediante analisi citofluorimetrica e morfologica con colorazione May-Grünwald-Giemsa, e funzionalmente, saggiandone le proprietà soppressive in colture linfocitarie antigene-specifiche. Come descritto nella sezione Materiali e Metodi, le cellule isolate immunomagneticamente sono state aggiunte, in proporzioni variabili, a colture di splenociti murini transgenici, aventi linfociti T CD8<sup>+</sup> specifici per l'antigene

HA (emoagglutinina), stimulate con il peptide specifico. Dopo cinque giorni, l'attività citotossica dei linfociti in coltura è stata testata, mediante test di rilascio di cromo, per verificare se venisse alterata dall'aggiunta delle frazioni di MDSC.

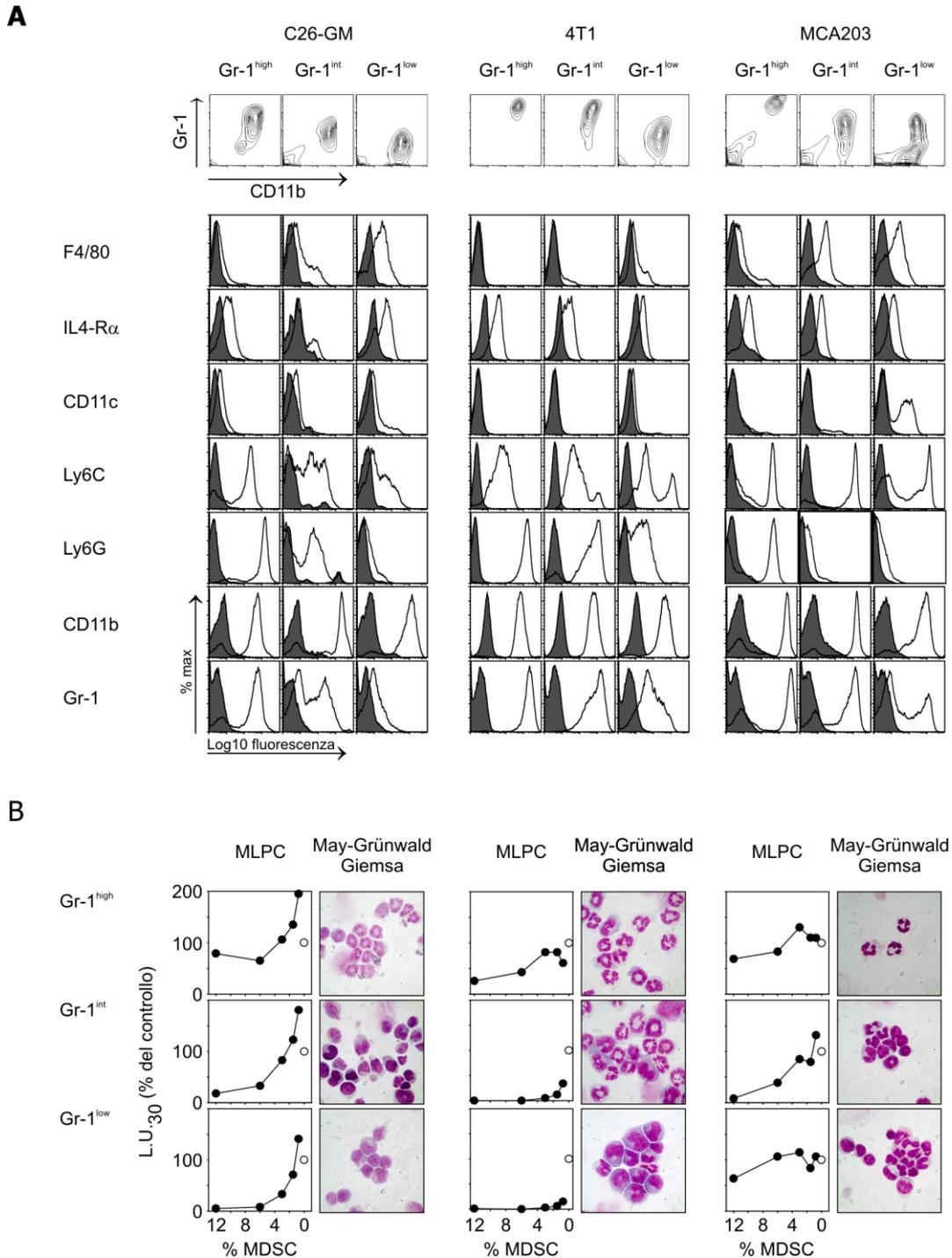


**Figura 1. Isolamento di tre sottopopolazioni di cellule CD11b<sup>+</sup> mediante sorting immunomagnetico.**

Sulla sinistra, contour plot degli splenociti di topi inoculati con i tumori C26-GM, 4T1 e MCA203, in cui si può notare come la marcatura con l'anticorpo anti-Gr-1 permetta di distinguere più popolazioni cellulari CD11b<sup>+</sup>. Come descritto nella sezione Materiali e Metodi, questi splenociti sono stati sottoposti a tre passaggi di sorting immunomagnetico, rivolti il primo ad isolare le cellule Gr-1<sup>high</sup> (Ly6G<sup>+</sup>), il secondo le Gr-1<sup>int</sup> ed il terzo le residue cellule Gr-1<sup>low</sup>.

Le sottopopolazioni isolate con questa procedura, pur avendo gradi di purezza diversi nei modelli tumorali analizzati, condividono alcune caratteristiche. La frazione Gr-1<sup>high</sup> dimostra, infatti, scarsa o nulla capacità inibitoria nei confronti dell'attività citolitica dei linfociti T CD8<sup>+</sup> antigene-specifici in tutti i tumori analizzati; al contrario, in alcuni saggi queste cellule hanno un effetto stimolatorio, soprattutto quando sono presenti a basse concentrazioni. Questa popolazione, a giudicare dal fenotipo Ly6G<sup>high</sup>Ly6C<sup>int</sup>F4/80<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup> e dalla morfologia polimorfonucleata, è per lo più costituita da granulociti maturi. La popolazione Gr-1<sup>int</sup>, morfologicamente più eterogenea delle altre, è costituita da cellule con nucleo ad anello ("ring-shaped nuclei"), identificate da altri come granulociti e monociti a diversi stadi maturativi comprendenti mielociti, promielociti, promonociti e cellule staminali ematopoietiche (Biermann, Pietz et al. 1999; Ueda, Kondo et al. 2005). I tumori C26GM e MCA203 sembrano contenere una maggiore porzione di cellule di origine monocitaria, a giudicare dalla morfologia e dall'espressione del marcatore F4/80, a differenza di quanto avviene con il carcinoma

4T1. Nonostante questa disparità nel fenotipo, questa frazione si dimostra sempre soppressiva in modo dose-dipendente. Osservando i modelli tumorali C26-GM e 4T1, infine, si nota come la soppressione generata dalle sottopopolazioni MDSC sia inversamente correlata all'intensità di espressione di Gr-1. La frazione Gr-1<sup>low</sup>, che dalla morfologia e dall'intensità del marcatore F4/80 sembra includere prevalentemente monociti, in questi due tumori mostra infatti una maggiore capacità inibitoria nei confronti dei linfociti T citotossici (CTL) CD8<sup>+</sup>; la frazione isolata dalla milza di topi con tumore MCA203 ha, invece, una scarsa azione soppressiva, probabilmente a causa dell'elevata contaminante di cellule dendritiche CD11c<sup>+</sup>. Grazie a questa procedura di isolamento cellulare, abbiamo constatato come all'interno della macropopolazione di MDSC sia possibile individuare almeno tre frazioni cellulari con distinte proprietà funzionali e fenotipiche, e come la soppressione dei linfociti T CD8<sup>+</sup> antigene-specifici sia mediata prevalentemente da popolazioni Gr-1<sup>int/low</sup> che contengono elementi monocito\macrofagici.



**Figura 2. Caratterizzazione fenotipica e funzionale delle sottopopolazioni isolate mediante sorting. (A)**

Le tre frazioni sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica per alcuni marcatori di superficie rilevanti (istogrammi rappresentativi, isotipo di controllo in grigio, anticorpo specifico in bianco). **(B)** Capacità citotossica di colture leucocitarie miste stimulate con peptide (MLPC) a cui sono state aggiunte come terza parte le sottopopolazioni isolate, in percentuali scalari dal 12 all'1.5% della coltura. Valori espressi come unità litiche al 30% (L.U.<sub>30</sub>) normalizzate rispetto alla coltura di controllo senza MDSC (media di tre esperimenti). A lato, la morfologia delle frazioni è stata valutata in seguito a colorazione May-Grünwald-Giemsa.

## **Il silenziamento del GM-CSF nel tumore 4T1 provoca una riduzione nell'accumulo di sottopopolazioni mieloidi soppressive**

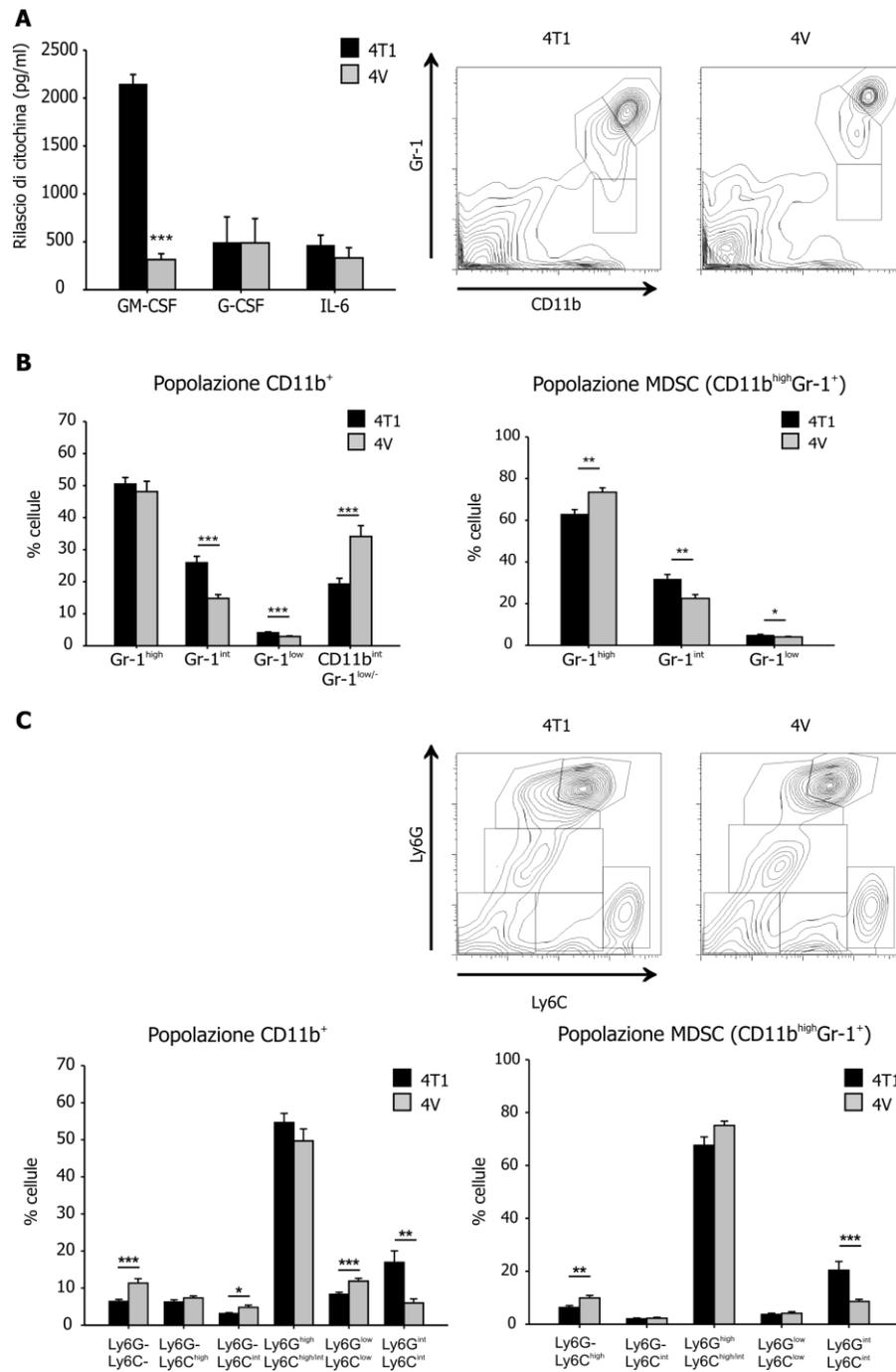
E' noto come il GM-CSF sia una citochina fondamentale per l'espansione del comparto mieloido e per il reclutamento di MDSC in animali portatori di tumore. Abbiamo perciò deciso di studiarne l'influenza sul reclutamento, il differenziamento e la funzione delle sottopopolazioni di MDSC sopra descritte, mediante silenziamento del gene codificante per la citochina in una linea tumorale. Dopo uno screening del rilascio di GM-CSF in diverse linee tumorali a nostra disposizione mediante test E.L.I.S.A., abbiamo scelto l'adenocarcinoma mammario 4T1, essendo uno dei tumori non ingegnerizzati che secernono maggiori quantità della citochina. Il silenziamento è stato effettuato trasfettando per elettroporazione le cellule tumorali con un plasmide commerciale codificante uno "short-hairpin RNA", disegnato in modo da appaiarsi con l'mRNA del GM-CSF, impedendone la traduzione. Sono stati inizialmente testati 5 diversi plasmidi con sequenze complementari a porzioni differenti del trascritto per il GM-CSF. Due di questi costrutti sono stati poi utilizzati per isolare, mediante diluizione seriale e selezione con antibiotico puromicina, dei cloni di cellule 4T1 trasfettate. La produzione di GM-CSF è stata valutata nei cloni generati sia mediante real-time PCR che test E.L.I.S.A., al fine di scegliere quelli con il miglior silenziamento genico.

Abbiamo inizialmente provato ad inoculare *in vivo* cinque cloni, due con rilascio di GM-CSF paragonabile alla linea parentale e tre con rilascio ridotto di citochina (riduzione del 60-80% in test E.L.I.S.A.). Abbiamo notato come vi fosse una correlazione inversa tra la crescita tumorale e la produzione di GM-CSF del tumore per tutti i cloni analizzati, suffragando l'ipotesi che la differenza nel rilascio di questa citochina, e non la semplice procedura di clonaggio e selezione, fosse alla base del diverso comportamento osservato. Abbiamo quindi scelto per ulteriori analisi un clone, denominato 4V, che mostra un rilascio di GM-CSF pari a circa un quarto della linea 4T1 "wild type" e mantiene una produzione pressoché inalterata di altre citochine importanti per la mielopoiesi, quali G-CSF e IL-6 (Figura 3A).

Per confrontare il comportamento dei due tumori, 4T1 e clone 4V, abbiamo deciso di condurre gli esperimenti inoculando sottocute  $5 \times 10^5$  cellule tumorali per topo. In queste condizioni, il clone 4V ha una crescita *in vivo* più lenta rispetto alla linea

parentale, ma nei primi dieci giorni dall'inoculo la dimensione delle masse tumorali rimane simile tra i due gruppi sperimentali. Nonostante ciò, il reclutamento di MDSC a livello della milza è molto diverso. Per studiare le alterazioni nelle sottopopolazioni di MDSC, nell'analisi citofluorimetrica abbiamo utilizzato delle regioni che identificassero le tre frazioni sulla base della marcatura con anti-CD11b e anti-Gr-1 e fossero il più possibile sovrapponibili a quelle ottenute in seguito a sorting immunomagnetico (Figura 3A, diagramma rappresentativo). Una suddivisione molto simile è stata operata prima di noi da altri gruppi, sia su splenociti (Greifenberg, Ribechini et al. 2009), che su cellule di midollo osseo (Ueda, Kondo et al. 2005), di topi sani. Con questa analisi abbiamo potuto osservare, oltre ad una generale riduzione nella percentuale di splenociti CD11b<sup>+</sup> (4T1: 35,7%±4,05, 4V: 20%±1,65, media±SE, p=0.005), un minor accumulo delle tre frazioni Gr-1<sup>high</sup>, Gr-1<sup>int</sup> e Gr-1<sup>low</sup>, significativo solo per le ultime due sottopopolazioni, nelle milze dei topi inoculati con il clone 4V (somma delle tre frazioni, 4T1: 30%±4,32 e 4V: 13%±2,07, media ± errore standard, p=0.002).

Analizzando tutta la popolazione CD11b<sup>+</sup>, che è stata poi utilizzata nei successivi esperimenti funzionali *in vitro*, negli animali con tumore 4V si nota una riduzione significativa delle popolazioni Gr-1<sup>int</sup> (p<0.001) e Gr-1<sup>low</sup> (p<0.001), compensata da un aumento delle popolazioni CD11b<sup>int</sup>Gr-1<sup>low</sup> e CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup> (p=0.001) (Figura 3B, a sinistra). Quando si osserva la distribuzione di queste cellule rispetto ai due epitopi riconosciuti dall'anticorpo anti-Gr-1, Ly6G e Ly6C, si può osservare come il silenziamento del GM-CSF nel tumore causi un decremento di cellule Ly6G<sup>high</sup>Ly6C<sup>high/int</sup> e, soprattutto, Ly6G<sup>int</sup>Ly6C<sup>int</sup> (p=0.004), con conseguente aumento delle altre frazioni, significativo per i confronti tra cellule Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>-</sup> (p<0.001), Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>int</sup> (p=0.013) e Ly6G<sup>low</sup>Ly6C<sup>low</sup> (p=0.001) rispetto alla linea 4T1 (Figura 3C, a sinistra). Non ci sono invece differenze significative in altri marcatori indagati, come CD62L e IL-4R $\alpha$  (dati non mostrati).

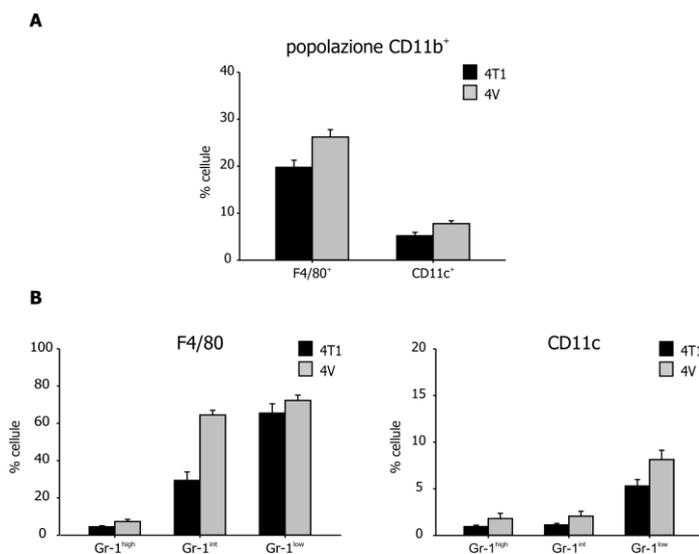


**Figura 3. Alterazioni nelle sottopopolazioni CD11b<sup>+</sup> in animali con tumore che rilascia basse dosi di GM-CSF.**

**(A)** Sulla sinistra, analisi del rilascio di citochine mediante test E.L.I.S.A nella linea tumorale 4T1 e nel clone 4V dopo silenziamento del GM-CSF. Sulla destra, contour plot rappresentativo di splenociti marcati con anti-CD11b e anti-Gr-1 in topi inoculati coi due tumori. **(B)** Analisi delle sottopopolazioni, individuabili mediante marcatura con anti-CD11b e anti-Gr-1 dai gate sopra indicati, nella popolazione di cellule CD11b<sup>+</sup> (a sinistra) o CD11b<sup>high</sup>Gr-1<sup>+</sup>, "bone fide" MDSC (a destra). **(C)** Analisi di sottopopolazioni individuabili con gli anticorpi anti-Ly6C e Ly6G dai gate indicati, nella popolazione di cellule CD11b<sup>+</sup> (a sinistra) o CD11b<sup>high</sup>Gr-1<sup>+</sup>, "bone fide" MDSC (a destra). I dati sono presentati come media  $\pm$  errore standard di tre animali ciascuno. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

La stessa marcata contrazione delle cellule Gr-1<sup>int</sup> (p=0.004) e Gr-1<sup>low</sup> (p=0.04), con conseguente aumento della frazione Gr-1<sup>high</sup> (p=0.003), si osserva nel gruppo con tumore silenziato anche considerando l'unione delle tre regioni aventi elevata espressione del marcatore CD11b (Figura 3B, a destra). Se si valuta la distribuzione dei marcatori Ly6G e Ly6C in questo comparto di "bona fide MDSC", si nota come vi sia una significativa diminuzione della popolazione Ly6G<sup>int</sup>Ly6C<sup>int</sup> (p=0.001), mentre a differenza di quanto avviene nella popolazione CD11b<sup>+</sup> complessiva, la frazione Ly6G<sup>high</sup>Ly6C<sup>int</sup> aumenta, similmente a quanto accade per le Gr-1<sup>high</sup>. Questo ci porta a pensare che le frazioni Gr-1<sup>int</sup> e Gr-1<sup>low</sup> possano essere rappresentate essenzialmente dalla frazione Ly6G<sup>int</sup>Ly6C<sup>int</sup>, mentre la sottopopolazione Gr-1<sup>high</sup> sia costituita prevalentemente da cellule Ly6G<sup>high</sup>Ly6C<sup>high/int</sup> ed, in parte, Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>high</sup> (Figura 3C, a destra). Purtroppo la marcatura contemporanea di Gr-1, Ly6C e Ly6G non è realizzabile per la parziale sovrapposizione degli epitopi riconosciuti dai rispettivi anticorpi monoclonali.

Per quanto riguarda il fenotipo, la popolazione CD11b<sup>+</sup> proveniente dalla milza degli animali con tumore 4V comprende una percentuale superiore di cellule positive per F4/80 e CD11c e un'intensità di fluorescenza di F4/80 maggiore rispetto a quella proveniente da animali con 4T1, ad indicare probabilmente una maturazione più spinta verso macrofagi o cellule dendritiche (Figura 4A). In modo simile, osservando solo le frazioni cellulari MDSC (CD11b<sup>high</sup> Gr-1<sup>+</sup>), si osserva un aumento di cellule F4/80<sup>+</sup>, significativo per le popolazioni Gr-1<sup>high</sup> (p=0.046) e Gr-1<sup>int</sup> (p<0.001), e di cellule CD11c<sup>+</sup>, significativo per la frazione Gr-1<sup>low</sup> (p=0.028) (Figura 4B). In sintesi, la riduzione di GM-CSF prodotta dal tumore sembra, da un lato, inibire l'accumulo di cellule CD11b<sup>+</sup>, in particolare delle frazioni CD11b<sup>high</sup>Gr-1<sup>int</sup> e CD11b<sup>high</sup>Gr-1<sup>low</sup>, confermando l'importanza di questa citochina nel reclutamento di cellule mieloidi soppressorie e, dall'altro, favorirne il differenziamento verso forme cellulari più mature.



**Figura 4. Fenotipo delle cellule mieloidi isolate dalla milza di animali con tumori 4T1 e 4V. (A)** Espressione dei marcatori F4/80 e CD11c nella popolazione CD11b<sup>+</sup>. Valori espressi come media ± SE di tre esperimenti indipendenti. **(B)** Espressione dei marcatori F4/80 (a sinistra) e CD11c (a destra) nelle frazioni Gr-1<sup>high</sup>, Gr-1<sup>int</sup> e Gr-1<sup>low</sup>.

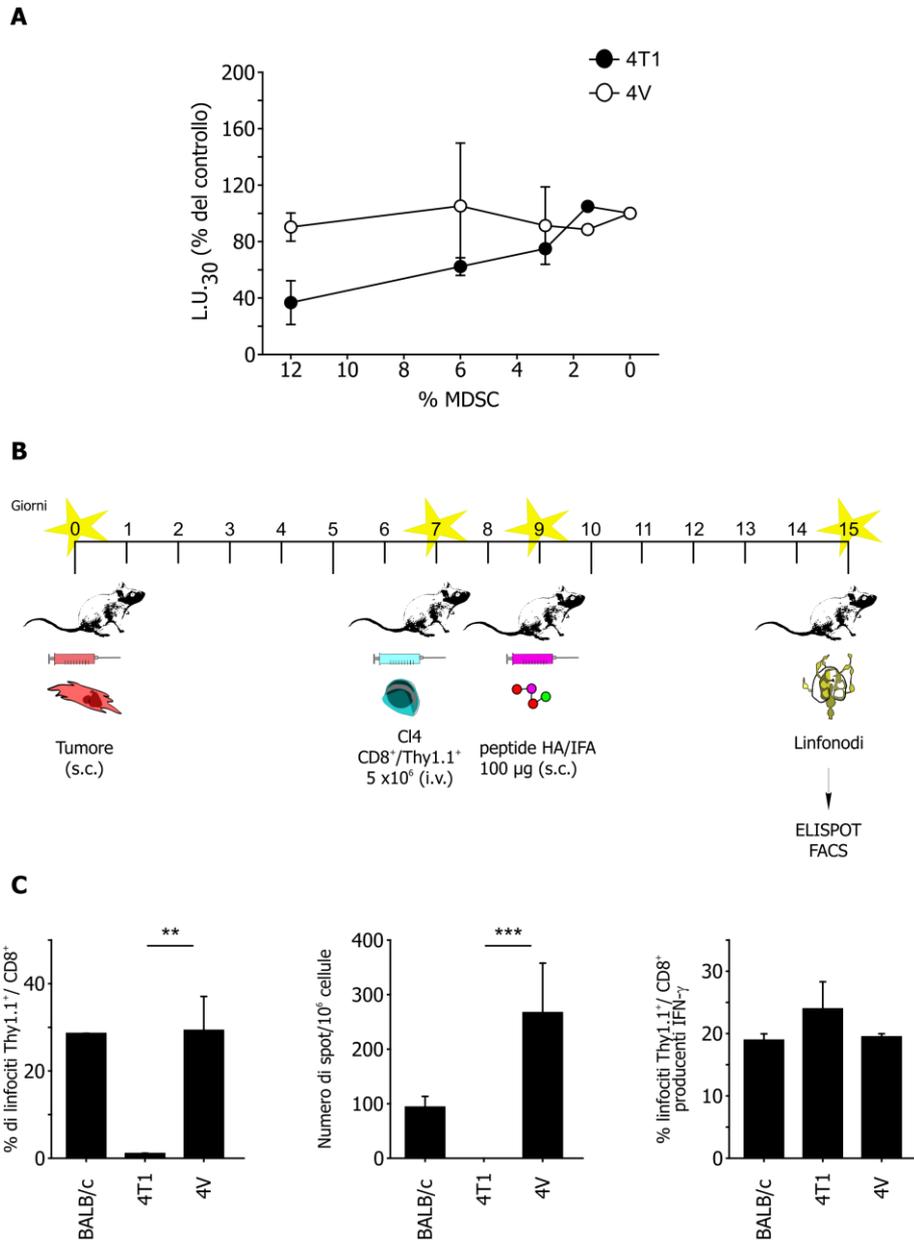
## La popolazione CD11b<sup>+</sup> ha ridotta capacità immunosoppressiva in animali con tumore in cui il GM-CSF è silenziato

Avendo osservato queste differenze nella milza degli animali portatori del tumore 4V, ci siamo chiesti se le alterazioni nelle popolazioni soppressive CD11b<sup>high</sup>Gr-1<sup>int</sup> e CD11b<sup>high</sup>Gr-1<sup>low</sup> fossero sufficienti a modificare la reattività immune in questo organo linfoide. Abbiamo perciò valutato inizialmente l'attivazione di linfociti T antigene-specifici nel contesto della milza di animali inoculati con tumore 4T1 o 4V. Linfociti T CD8<sup>+</sup> specifici per l'antigene HA sono stati diluiti con splenociti provenienti dagli animali portatori di tumore (comprendenti MDSC), in modo da costituire l'1% delle cellule della coltura finale, e sono stati attivati con il peptide specifico. In questi esperimenti, quando la coltura era costituita da splenociti provenienti da animali portatori del tumore 4T1, la funzione dei CTL era fortemente compromessa, mentre i CTL coltivati in presenza splenociti di topi portatori di tumore 4V erano in grado di lisare cellule bersaglio in modo efficiente (dati non mostrati). Questo effetto era in parte atteso, perchè le milze di animali portatori di tumore 4V hanno meno MDSC e,

quindi, le MLPC nei due gruppi sperimentali confrontati avevano un diverso rapporto tra cellule soppressorie e linfociti in coltura. Abbiamo, quindi, deciso di isolare le cellule CD11b<sup>+</sup> dalle milze degli animali con i due tumori, al fine di aggiungerle in percentuali definite e confrontabili alle colture MLPC. In questo modello sperimentale (10 giorni dall'inoculo del tumore sottocute), non siamo in grado di separare efficacemente le tre frazioni Gr-1<sup>high</sup>, Gr-1<sup>int</sup> e Gr-1<sup>low</sup> mediante sorting immunomagnetico, a causa dell'esiguo numero di cellule ricavabili dalle milze.

Quando a colture MLPC allestite con linfociti T CD8<sup>+</sup> HA-specifici vengono aggiunte cellule CD11b<sup>+</sup> in percentuali scalari, abbiamo notato che, a parità di numero di MDSC in coltura, le cellule provenienti dalla milza di topi 4V hanno un potere soppressivo ridotto rispetto a quelle inoculate col tumore parentale (Figura 5A).

Per studiare l'impatto della riduzione di GM-CSF rilasciato dal tumore sulla tolleranza immunologica che questo normalmente esercita *in vivo* sui linfociti T CD8<sup>+</sup> attivati, abbiamo allestito un esperimento di trasferimento adottivo di CTL in animali portatori di tumore. Come illustrato in figura 5B, dopo sette giorni dall'inoculo del tumore agli animali sono stati trasferiti splenociti di topi transgenici CL4, aventi i linfociti T CD8<sup>+</sup> con TCR specifico per l'antigene HA. Due giorni dopo il trasferimento, i topi sono stati vaccinati col peptide HA, per stimolare l'espansione dei linfociti HA-specifici, e sei giorni dopo sono stati sacrificati. Linfonodi e milza sono stati prelevati e le cellule ulteriormente stimulate in coltura con il peptide HA per poter valutare il rilascio di IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti T CD8<sup>+</sup> transgenici trasferiti, mediante test ELISpot o citofluorimetria dopo marcatura intracellulare. In figura 5C (valori riferiti ai linfonodi) si può osservare come il tumore 4T1 wild type sia in grado di indurre una quasi completa scomparsa dei CTL trasferiti, senza alterare il rilascio IFN- $\gamma$ , indotto dall'antigene, dei pochi linfociti rimanenti. Nei topi portatori del clone 4V, al contrario, lo stato immunologico è comparabile a quello di un animale senza tumore, sia in termini di numero di CTL trasferiti espansi, sia in termini di attività funzionale (rilascio di IFN- $\gamma$ ). Questi risultati ci hanno fatto ipotizzare che il GM-CSF sia necessario non solo all'accumulo di MDSC, ma anche all'acquisizione di un fenotipo soppressorio.



**Figura 5. Il silenziamento del GM-CSF riduce la capacità soppressiva di cellule CD11b<sup>+</sup> *in vitro* e la tolleranza verso antigeni specifici *in vivo*.** (A) Le proprietà immunosoppressive delle cellule CD11b<sup>+</sup> isolate dalla milza di topi inoculati con tumore 4T1 (cerchi neri) o 4V (cerchi bianchi) sono state valutate tramite test di rilascio di <sup>51</sup>Cromo dopo co-cultura di cinque giorni con linfociti T stimolati in MLPC. Dati espressi come media delle L.U.<sub>30</sub> ± errore standard di tre esperimenti. (B) Schema dell'esperimento di induzione di tolleranza *in vivo* con inoculo del tumore al giorno 0, trasferimento adottivo di linfociti T CD8<sup>+</sup> HA-specifici al giorno 7, vaccinazione con peptide HA+IFA al giorno 9 e sacrificio dell'animale, con successivo prelievo di linfonodi e milza, al giorno 15. (C) I linfonodi degli animali trattati sono stati coltivati *ex vivo* con il peptide HA e sottoposti a marcatura intracitoplasmatica per IFN- $\gamma$  o saggio Elispot. A sinistra, percentuale di linfociti CD8<sup>+</sup>Thy1.1<sup>+</sup> nei linfonodi degli animali trattati. In centro, numero di conte Elispot, indicative di cellule rilascianti IFN- $\gamma$  (dopo sottrazione dei valori di colture prive di peptide). A destra, percentuale di linfociti CD8<sup>+</sup>Thy1.1<sup>+</sup> produttori IFN- $\gamma$ . Valori espressi come media ± errore standard di un esperimento rappresentativo, su due, con tre topi per gruppo. \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

## **Il silenziamento del GM-CSF nelle cellule neoplastiche altera la crescita, l'angiogenesi e la capacità invasiva del tumore**

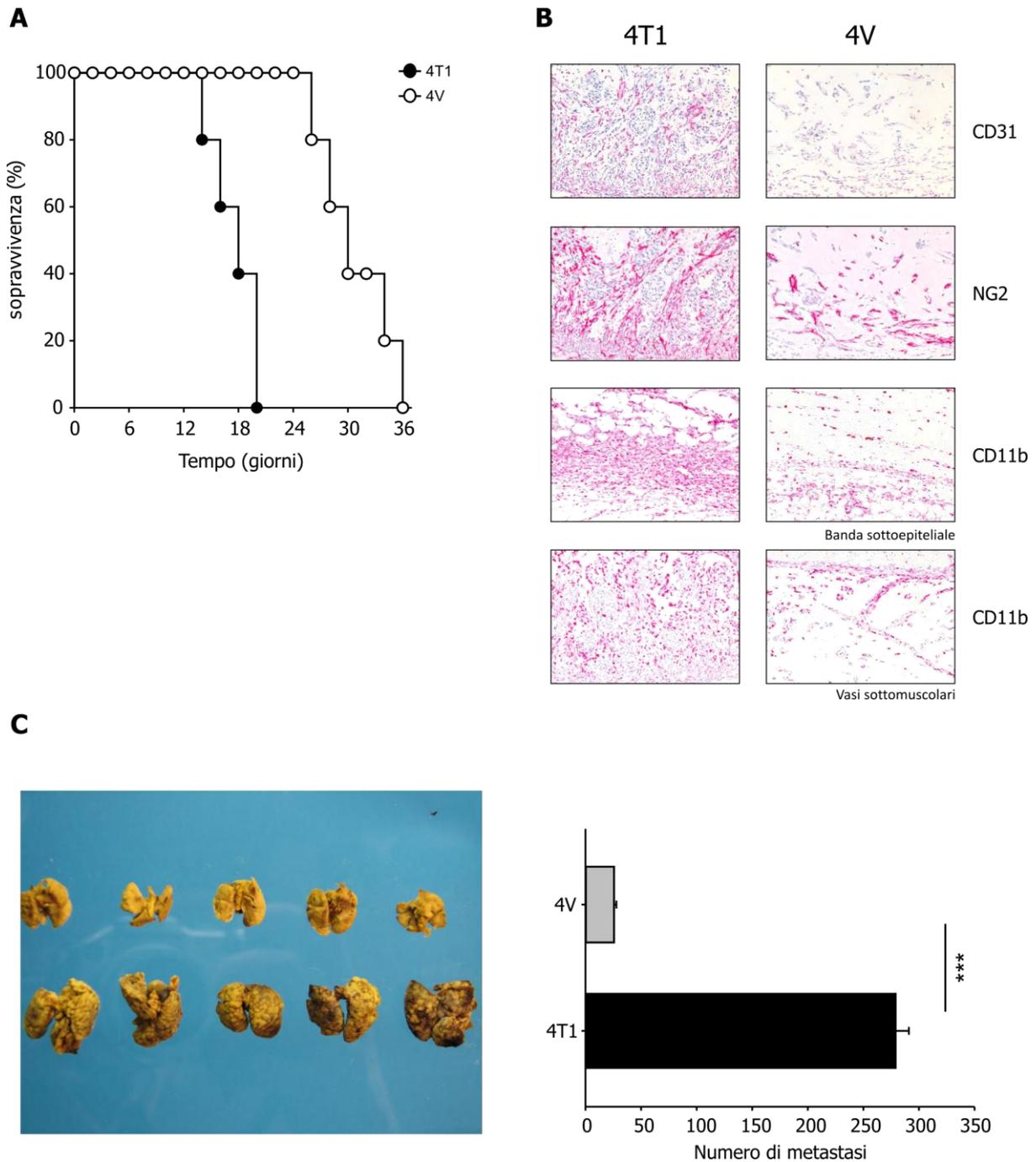
Dopo dieci giorni dall'inoculo del tumore, le curve di crescita dei due tumori 4T1 e 4V si separano e, sebbene il tumore non regredisca, il clone 4V mostra una crescita ridotta, raggiungendo la dimensione di 100 mm<sup>2</sup>, momento in cui l'animale viene sacrificato, circa 12 giorni dopo il tumore 4T1 (Figura 6A). Questo rallentamento nella crescita si mantiene per dosi di  $7 \times 10^3$ - $1 \times 10^5$  cellule tumorali inoculate. Abbiamo, quindi, indagato se esistessero altre differenze, oltre a quelle immunologiche sopra descritte, che potessero spiegare il comportamento *in vivo* di questo clone neoplastico. Per prima cosa, abbiamo pensato che il semplice clonaggio avesse potuto alterare le proprietà delle cellule tumorali favorendone il riconoscimento e il rigetto immunologico. L'inoculo *in vivo* di altri cloni ottenuti dopo la trasfezione con plasmide shRNA-GM-CSF, precedentemente citato, ci ha permesso di verificare come cloni che producono livelli simili di citochina mantengano un comportamento analogo, oltre che nello sviluppo neoplastico, anche nel fenotipo e nell'attività soppressiva delle MDSC *in vitro*, rafforzando l'idea che i fenomeni osservati siano attribuibili effettivamente a differenze nel rilascio in circolo di GM-CSF (dati non mostrati).

Dato che ci sono evidenze di un possibile ruolo del GM-CSF come fattore di crescita autocrino per le cellule tumorali (Mueller and Fusenig 1999; Obermueller, Vosseler et al. 2004), abbiamo indagato se vi fossero differenze di proliferazione tra la linea 4T1 e il clone silenziato 4V. La proliferazione *in vitro* delle linee tumorali è stata valutata mediante conta al microscopio con colorazione vitale, incorporazione di timidina triziata e diluizione di CFSE al citofluorimetro, ma nessuna differenza significativa è stata riscontrata, facendoci ipotizzare che la riduzione di GM-CSF non sia sufficiente ad alterare le proprietà di vitalità e proliferazione delle cellule neoplastiche in coltura monostrato *in vitro* (dati non mostrati).

Per poter studiare un modello di sviluppo neoplastico che mimasse meglio le fasi precoci di crescita *in vivo*, abbiamo confrontato la crescita dei due tumori in un "Matrigel plug assay". In breve,  $7.5 \times 10^4$  cellule tumorali sono state iniettate in Matrigel ad alta densità ed inoculate sottocute ai topi; dopo sei giorni i "plug" formati sono stati analizzati in immunistochemica. In figura 6B si nota che le cellule 4V

crescono meno, a giudicare dal minor numero di "isole" epiteliali presenti nei plug. Inoltre, si nota come la riduzione del GM-CSF provochi un minor sviluppo di vasi ed un ridotto afflusso sia di periciti (NG2<sup>+</sup>) che di cellule endoteliali (CD31<sup>+</sup>). L'infiltrato infiammatorio di cellule CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> nella massa tumorale, presente sia nella banda sottoepiteliale che lungo i vasi neo-formati, è notevolmente ridotto nei plug 4V rispetto a quelli 4T1. Non ci sono differenze, invece, nell'infiltrato linfocitario T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, che è scarso in entrambi i gruppi sperimentali e presente solo nella banda sottoepiteliale. Questi risultati ci fanno ipotizzare che la presenza di GM-CSF nel microambiente tumorale sia importante, oltre che per il reclutamento di cellule infiammatorie (tra cui le MDSC), probabilmente anche per la formazione di nuovi vasi sanguigni necessari alla progressione neoplastica.

Abbiamo, inoltre, osservato che anche l'inoculo endovenoso del clone 4V provoca un accumulo di MDSC significativamente inferiore nel gruppo con tumore 4V. Interessante è stato notare come il clone silenziato, con questa via di inoculo, dia origine ad un minor numero di metastasi polmonari, rispetto al tumore wild type, indotte 17 giorni dopo l'inoculo (Figura 6C). Questi risultati confermano perciò che il GM-CSF favorisce la diffusione neoplastica agendo a livello del microambiente tumorale e degli organi linfoidi, sia inibendo la risposta immunitaria anti-tumorale, mediante l'accumulo e l'attivazione di sottopopolazioni mieloidi soppressive, sia facilitando l'invasione e l'angiogenesi, forse in parte ad opera di queste stesse frazioni cellulari infiltranti il tumore.



**Figura 6. La riduzione nel rilascio di GM-CSF influenza lo sviluppo neoplastico in termini di rallentamento nella crescita tumorale *in vivo*, riduzione dell'angiogenesi e della capacità metastatica.**

**(A)** L'inoculo del tumore 4V provoca un rallentamento della crescita tumorale che risulta in un aumento della sopravvivenza degli animali di circa due settimane rispetto al tumore parentale. **(B)** Colorazione immunohistochemica della massa tumorale dopo inoculo *in vivo* di cellule tumorali in Matrigel. Le colorazioni evidenziano le strutture vascolari, nei primi due pannelli, in particolare le cellule endoteliali (CD31<sup>+</sup>), i periciti (NG2<sup>+</sup>) e l'infiltrato CD11b<sup>+</sup> (che co-localizza con quello Gr-1<sup>+</sup>, non mostrato) nella regione sottoepiteliale (terzo pannello) ed intorno ai vasi neoformati (quarto pannello). **(C)** Metastasi polmonari indotte dall'inoculo i.v. delle cellule 4T1 o 4V. Valori espressi come media ± errore standard di dieci animali per gruppo, in due esperimenti indipendenti. \*\*\* p<0.001.

## **MDSC originate *in vitro* da colture di midollo come modello per lo studio delle sottopopolazioni mieloidi**

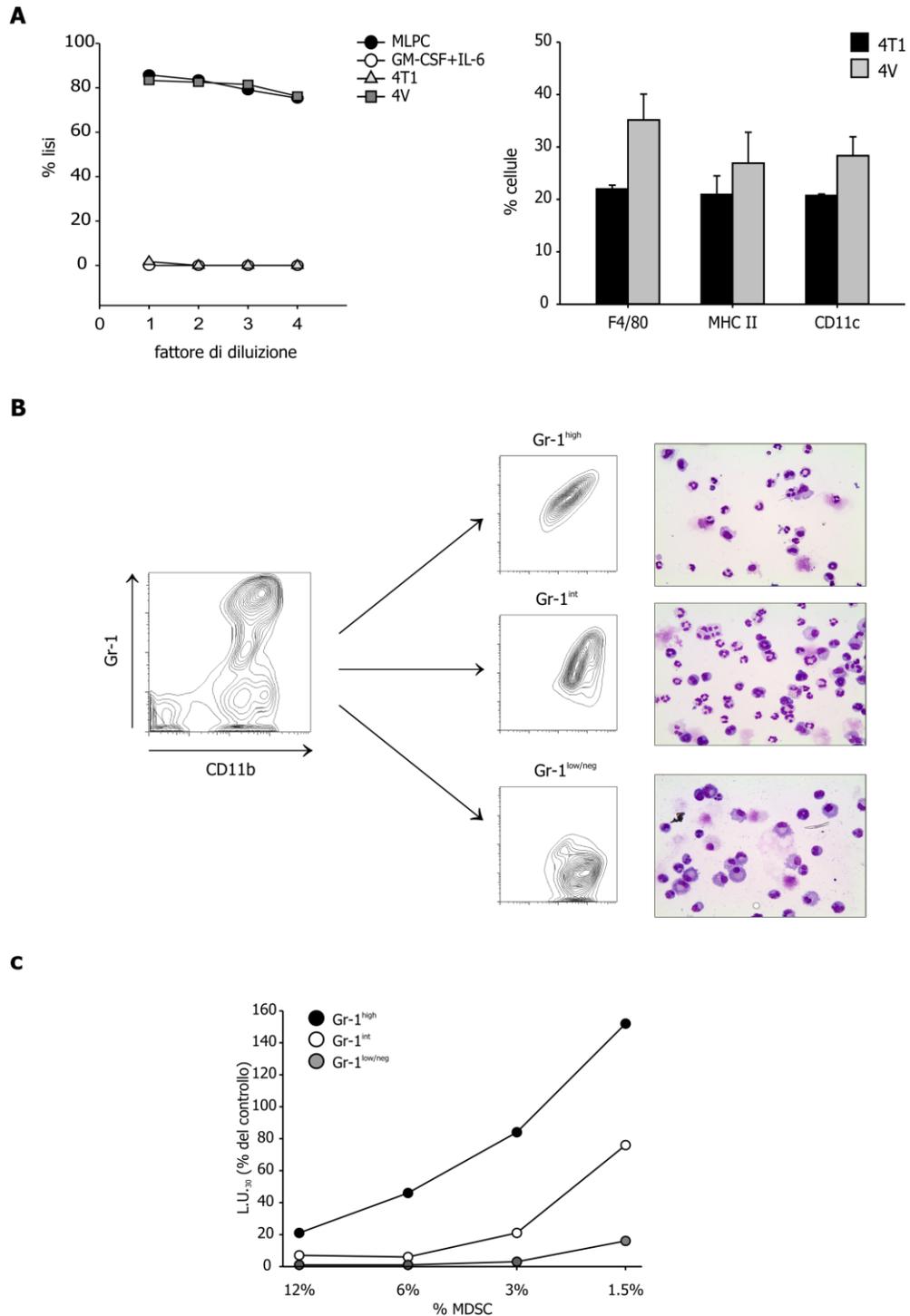
Al fine di studiare il differenziamento delle MDSC *in vitro* è possibile coltivare i precursori midollari con fattori solubili rilasciati dal tumore; questa strategia si rivela utile e comoda, ed è stata utilizzata da diversi gruppi (Young, Young et al. 1990; Nefedova, Huang et al. 2004; Morales, Kmiecik et al. 2009). Abbiamo, pertanto, generato delle MDSC utilizzando il surnatante delle linee 4T1 e 4V, ottenendo cellule in grado di mimare le caratteristiche delle cellule CD11b<sup>+</sup> analizzate *ex-vivo* negli esperimenti sopra riportati; le MDSC derivate *in vitro* da midollo col surnatante del tumore 4V, infatti, oltre a presentare una maggiore percentuale di cellule F4/80<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> e MHC II<sup>+</sup>, similmente alle MDSC indotte *in vivo* dal tumore non sono in grado di sopprimere l'attività citotossica dei linfociti T CD8<sup>+</sup> in colture MLPC (Figura 7A) .

Per ottenere un modello *in vitro* di differenziamento delle MDSC che fosse indipendente dalla variabilità biologica dei tumori, nel nostro laboratorio sono state messe a punto delle condizioni colturali basate sulla combinazione delle citochine GM-CSF, G-CSF e IL-6, fondamentali per la mielopoiesi, che risultano tra le più espresse nel microambiente di vari tumori finora analizzati (Marigo et al., manoscritto in revisione). Per capire quali fattori di crescita ematopoietici fossero importanti per riprodurre le sottopopolazioni con caratteristiche di MDSC, le colture di midollo così trattate sono state valutate fenotipicamente e funzionalmente a tempi diversi. Il GM-CSF aggiunto al midollo *in vitro*, dopo 4 giorni, induce una macropopolazione fenotipicamente e funzionalmente molto simile a quella che si ritrova nella milza dei topi portatori di tumore; le citochine G-CSF e IL-6 modulano poi ulteriormente le proprietà di queste cellule. Data la somiglianza di espressione genica, valutata tramite gene chip Affymetrix, delle MDSC derivate da midollo con GM-CSF e IL-6 (d'ora in avanti denominate BM-MDSC) con le MDSC indotte *in vivo* da tumore, e la loro capacità di indurre tolleranza nei confronti di antigeni di trapianto allogenico dopo trasferimento adottivo (Marigo et al., in revisione), abbiamo deciso di utilizzare le colture di midollo trattate con questa combinazione di citochine come modello *in vitro* per l'ulteriore studio del differenziamento e dell'attivazione delle MDSC. Come si può vedere in figura 7B, infatti, le BM-MDSC ottenute con questo trattamento assomigliano

fenotipicamente alle MDSC indotte da tumore (si confronti la figura 7B con le frazioni originali dei tre tumori in figura 1) e sono similmente suddivisibili in almeno tre frazioni sulla base dell'intensità di espressione del marcatore Gr-1 (Gr-1<sup>high</sup>, Gr-1<sup>int</sup> e Gr-1<sup>low/neg</sup>).

Seguendo il protocollo di isolamento magnetico precedentemente descritto, dopo quattro giorni di coltura del midollo con le citochine abbiamo separato le tre sottopopolazioni indicate, per esaminarle fenotipicamente e funzionalmente. Dalle colorazioni citologiche e citofluorimetriche eseguite, abbiamo osservato che, per quanto questo modello non permetta di riprodurre completamente le peculiarità delle MDSC indotte dai diversi tumori, ci sono forti analogie nella morfologia cellulare tra le frazioni isolate da midollo e quelle indotte da tumore; la popolazione Gr-1<sup>high</sup>, infatti, è prevalentemente costituita da granulociti maturi, la Gr-1<sup>int</sup> da cellule polimorfonucleate a diversi stadi maturativi, comprendenti cellule con nucleo ad anello, e le Gr-1<sup>low/neg</sup> da cellule mononucleate della linea monocito/macrofagica (Figura 7B, a destra) .

E' interessante notare, inoltre, come queste frazioni abbiano un comportamento funzionale simile a quello osservato per le MDSC spleniche, dato che anche in questo setting sperimentale la capacità soppressiva sembra inversamente correlata all'intensità di espressione del marcatore Gr-1 (Figura 7C).



**Figura 7. Da colture di midollo osseo trattate con GM-CSF e IL-6 si possono isolare tre sottopopolazioni di MDSC con diversa capacità immuno-modulatoria. (A)** Attività soppressiva (a sinistra, rilascio di  $^{51}\text{Cromo}$  di MLPC) e fenotipo (a destra) di midollo osseo trattato con i surnatanti dei tumori 4T1 e 4V. **(B)** Contour plot rappresentativo della marcatura con anti-CD11b e anti-Gr-1 di midollo trattato con GM-CSF e IL-6 dopo 4 giorni di coltura (a sinistra) e delle sottopopolazioni isolate mediante sorting immunomagnetico, con relativa colorazione May-Grünwald-Giemsa (a destra). **(C)** Capacità citolitica, valutata tramite rilascio di  $^{51}\text{Cromo}$ , di colture MLPC a cui sono state aggiunte, come terza parte, le frazioni di BM-MDSC in percentuali scalari, dal 12% all'1.5% della coltura. Valori espressi come L.U.<sub>30</sub> di un esperimento rappresentativo con colture in triplicato.

## **Studio di miRNA coinvolti nella generazione, maturazione e attivazione delle MDSC**

Data l'importanza dei microRNA (miRNA) nei processi di ematopoiesi, maturazione cellulare e regolazione del sistema immunitario (Baltimore, Boldin et al. 2008; Garzon and Croce 2008; Lodish, Zhou et al. 2008; Sonkoly, Stahle et al. 2008), abbiamo voluto indagare il loro possibile coinvolgimento nel differenziamento e nell'attivazione in senso soppressorio di cellule mieloidi.

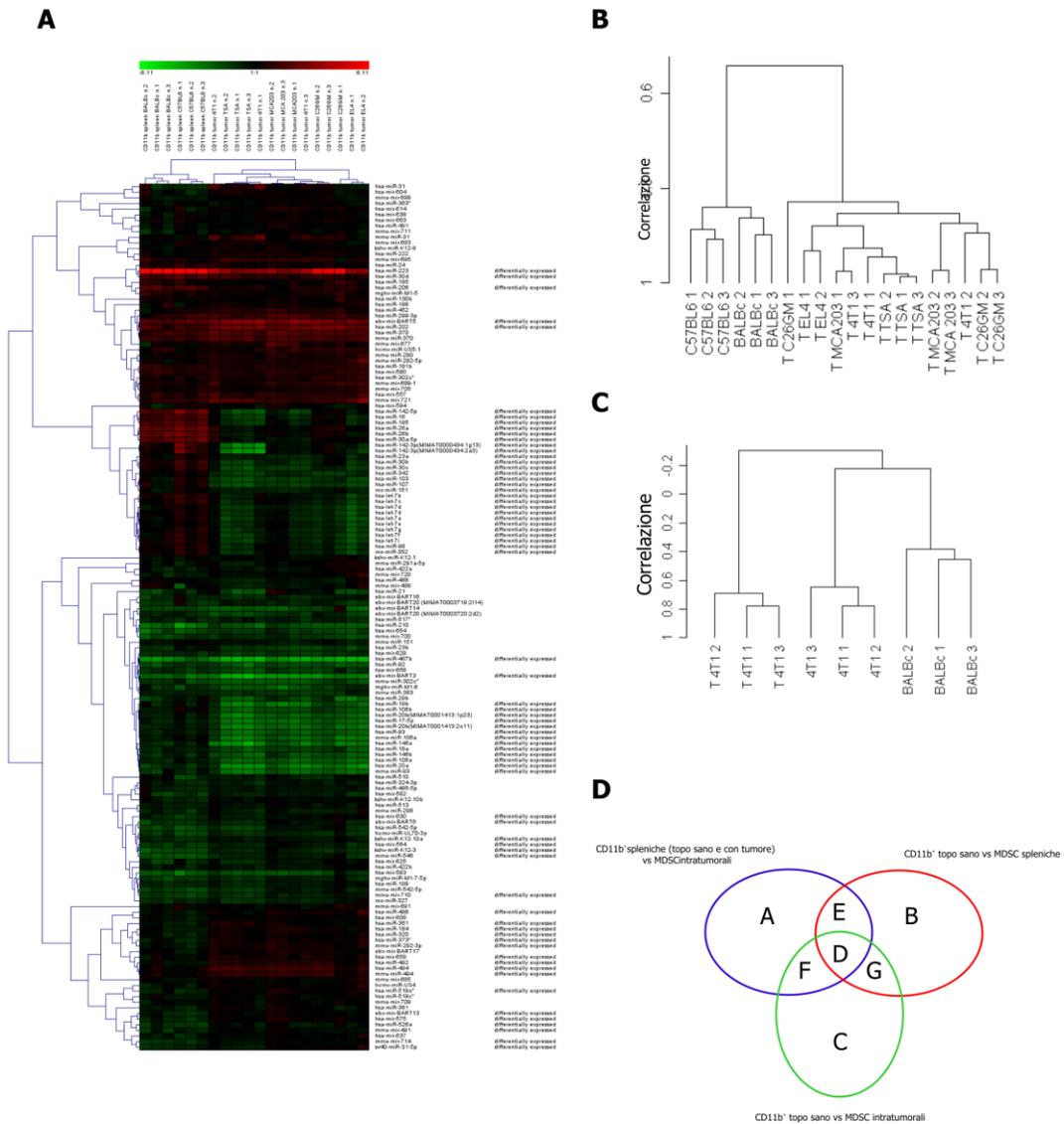
Abbiamo deciso di svolgere inizialmente un'analisi di espressione di miRNA ad ampio spettro, mediante chip, per valutare se esistessero miRNA differenzialmente espressi tra le MDSC e cellule mieloidi non soppressive. A tale scopo abbiamo isolato immunomagneticamente cellule CD11b<sup>+</sup> provenienti dalla milza di topi sani, sia di ceppo C57/BL6 che di ceppo BALB/c, funzionalmente non soppressive, e cellule CD11b<sup>+</sup>, soppressive, provenienti sia dalla milza che dall'infiltrato tumorale di animali inoculati con differenti linee tumorali. Abbiamo deciso di studiare cellule MDSC provenienti da tumori di diversa istologia e diverso background genetico al fine di poter analizzare profili di espressione dei miRNA sia tumore-specifici che comuni. I tumori scelti sono stati, nel ceppo BALB/c, gli adenocarcinomi mammari 4T1 e TS/A e il colon carcinoma geneticamente modificato C26-GM, mentre, in ceppo C57/BL6, il fibrosarcoma MCA203 e il timoma EL4. L'RNA totale di ciascun campione ibridizzato è stato isolato da cellule derivanti da un pool di 3 topi o, nel caso di topi sani, in cui le cellule CD11b<sup>+</sup> rappresentano solo circa il 5% degli splenociti, di 6 topi. Per ogni campione sono state preparate tre repliche biologiche distinte (tranne per il tumore EL-4, di cui abbiamo ottenuto solo due pool distinti). L'ibridizzazione dei chip è stata eseguita dal gruppo del Prof. Marincola presso l'NIH di Bethesda con una piattaforma non commerciale, costituita da sonde complementari a quelle depositate nel database Sanger mirBASE versione 9.1.

## **Cellule CD11b<sup>+</sup> isolate da animali portatori di tumore hanno un profilo di espressione di miRNA alterato rispetto alla controparte mieloide non soppressiva**

Come si vede dalla figura 8, i chip permettono di valutare l'espressione differenziale dei miRNA nei diversi campioni; questo viene rappresentato mediante grafici detti "heatmap" (un esempio, riguardante il confronto tra cellule CD11b<sup>+</sup> da milza di topi sani e MDSC intratumorali, è riportato in figura 8A), in cui a ciascuna tonalità di colore è associato un livello di espressione del miRNA. In base ai profili di espressione, si possono riunire sia i gruppi sperimentali che i miRNA, creando dei diagrammi di "clusterizzazione". Questa analisi ha permesso di osservare che i campioni di cellule CD11b<sup>+</sup> immunosoppressive, derivate sia dalla milza che dall'infiltrato di animali con tumore, si distaccano nettamente dalla controparte mieloide normale, indipendentemente dal tipo tumorale considerato (figura 8B, per i confronti tra cellule CD11b<sup>+</sup> da milza di topi sani e MDSC intratumorali). Inoltre, si è notata una buona correlazione tra le diverse repliche di MDSC ottenute per ciascun tumore, confermando la riproducibilità dei dati generati. Questi chip hanno permesso di individuare miRNA che risultano differenzialmente espressi sia nel confronto tra le MDSC intratumorali e le cellule CD11b<sup>+</sup> di topo sano, che in quello tra le MDSC spleniche e le cellule CD11b<sup>+</sup> di topo sano. Abbiamo ottenuto inoltre sia dei profili di espressione tumore-specifici, dai confronti con i campioni derivati dai singoli tipi tumorali, sia dei profili comuni a tutte le MDSC intratumorali, considerando globalmente le MDSC infiltranti il tumore in tutti i modelli utilizzati. Tra questi miRNA comuni, 43 risultano down-regolati e 25 up-regolati nelle MDSC intratumorali. Nelle comparazioni tra MDSC spleniche e cellule CD11b<sup>+</sup> di animale sano, invece, si riscontra un minor numero di miRNA differenzialmente espressi, in particolare 15 miRNA down-regolati e 11 up-regolati. Se si considerano poi, per ciascun tumore, i pattern di espressione di miRNA in tutti i tipi di cellule CD11b<sup>+</sup> (spleniche di topo sano, spleniche di topo portatore di tumore e intratumorali) si può vedere come questi permettano di distinguere chiaramente i tre gruppi sperimentali (un esempio di diagramma di clustering per il tumore 4T1 è riportato in figura 8C). Questo ci fa ipotizzare che le differenze nell'assetto dei miRNA rispecchino non solo differenze funzionali (MDSC spleniche e intratumorali condividono un'attività

immunosoppressiva, di cui sono invece prive le cellule CD11b<sup>+</sup> provenienti da animali sani), ma anche fenotipiche o di maturazione tra questi tipi cellulari, probabilmente indotte dal diverso microambiente. Il diagramma in figura 8D riassume i confronti eseguiti tra i diversi gruppi sperimentali: cellule CD11b<sup>+</sup> da milza di topo sano rispetto a MDSC infiltranti il tumore (parte inferiore della figura, in verde), cellule CD11b<sup>+</sup> da milza di topo sano rispetto a MDSC spleniche (parte destra della figura, in rosso) e MDSC infiltranti il tumore rispetto a tutte le cellule derivanti dalla milza, sia di topi sani che di topi con tumore (parte sinistra della figura, in blu). Per ogni confronto sono stati individuati dei miRNA differenzialmente espressi, alcuni dei quali comuni a due (E, F e G) o a tutte e tre (D) le comparazioni.

Per iniziare a studiare i miRNA che potessero essere rilevanti per il differenziamento delle cellule mieloidi in senso MDSC, ci siamo concentrati su quelli che risultassero differenzialmente espressi nelle MDSC intratumorali in tutti i tumori analizzati. Tra questi, abbiamo scelto i miRNA sotto-espressi rispetto alle cellule non soppressive, per poterli esaminare agevolmente mediante sovra-regolazione degli stessi con plasmidi o oligonucleotidi. Un altro criterio che ha guidato la nostra scelta è stato il confronto dei dati ottenuti tramite i chip con quelli ottenuti dall'analisi di librerie di miRNA, generate nel nostro laboratorio nell'ambito di un altro progetto di ricerca, su MDSC indotte in topo dalla crescita del tumore 4T1. Essendoci una buona correlazione tra i dati generati con i due sistemi per questo particolare tumore, sono stati scelti miRNA che risultassero downregolati in entrambi i casi, che avessero conte significative nelle librerie e che fossero tra i più varianti, rispetto al profilo delle cellule non soppressive, nei chip. La scelta è infine ricaduta su miRNA già noti in letteratura per la loro espressione in cellule ematopoietiche e per il loro coinvolgimento in processi di maturazione o attivazione mieloide, quali i miRNA appartenenti al cluster 17-92 (o ai cluster omologhi 106a-363 e 106b-25) e i miR-223, miR-142, miR-146a (Chen and Lodish 2005; Fazi, Rosa et al. 2005; Taganov, Boldin et al. 2006; Fontana, Pelosi et al. 2007; Sonkoly, Stahle et al. 2008). E' interessante notare come i miRNA selezionati ricadano nella regione G del diagramma in figura 8D, cioè siano differenzialmente espressi oltre che nelle MDSC intratumorali anche in quelle spleniche, facendoci ipotizzare una loro implicazione in processi comuni, probabilmente legati al fenotipo soppressorio, alle due popolazioni.



**Figura 8. Il profilo di espressione dei miRNA permette di distinguere cellule CD11b<sup>+</sup> prive di capacità immunosoppressive da MDSC spleniche o intratumorali.** (A) Esempio di grafico a heatmap in cui è rappresentato il profilo di espressione di cellule CD11b<sup>+</sup> isolate dalla milza di topi sani o dall'infiltrato tumorale di animali con i tumori C26-GM, 4T1, TS/A, MCA203 e EL4. A ciascuna tonalità di colore corrisponde un livello di espressione, da basso, verde, ad elevato, rosso, rispettivamente. L'espressione dei miRNA permette di raggruppare tra loro sia gli stessi miRNA (sulla sinistra della heatmap), che i gruppi sperimentali (in alto e (B)). (B) Diagramma di clustering dei gruppi sperimentali relativo alle comparazioni della heatmap in (A). (C) Diagramma di clustering esemplificativo per il tumore 4T1, che permette di suddividere cellule CD11b<sup>+</sup> dalla milza di topo sano, dalla milza e dall'infiltrato tumorale di animali con tumore 4T1 in base ai profili di espressione dei miRNA. (D) Diagramma di Venn che riassume i confronti eseguiti tra i gruppi sperimentali: cellule CD11b<sup>+</sup> da milza (di topo sano e con tumore) rispetto a CD11b<sup>+</sup> dell'infiltrato tumorale a sinistra, in blu; cellule CD11b<sup>+</sup> da milza di topo sano rispetto a CD11b<sup>+</sup> da milza di topo con tumore, a destra, in rosso; cellule CD11b<sup>+</sup> da milza di topo sano rispetto a CD11b<sup>+</sup> dall'infiltrato tumorale, in basso, in verde.

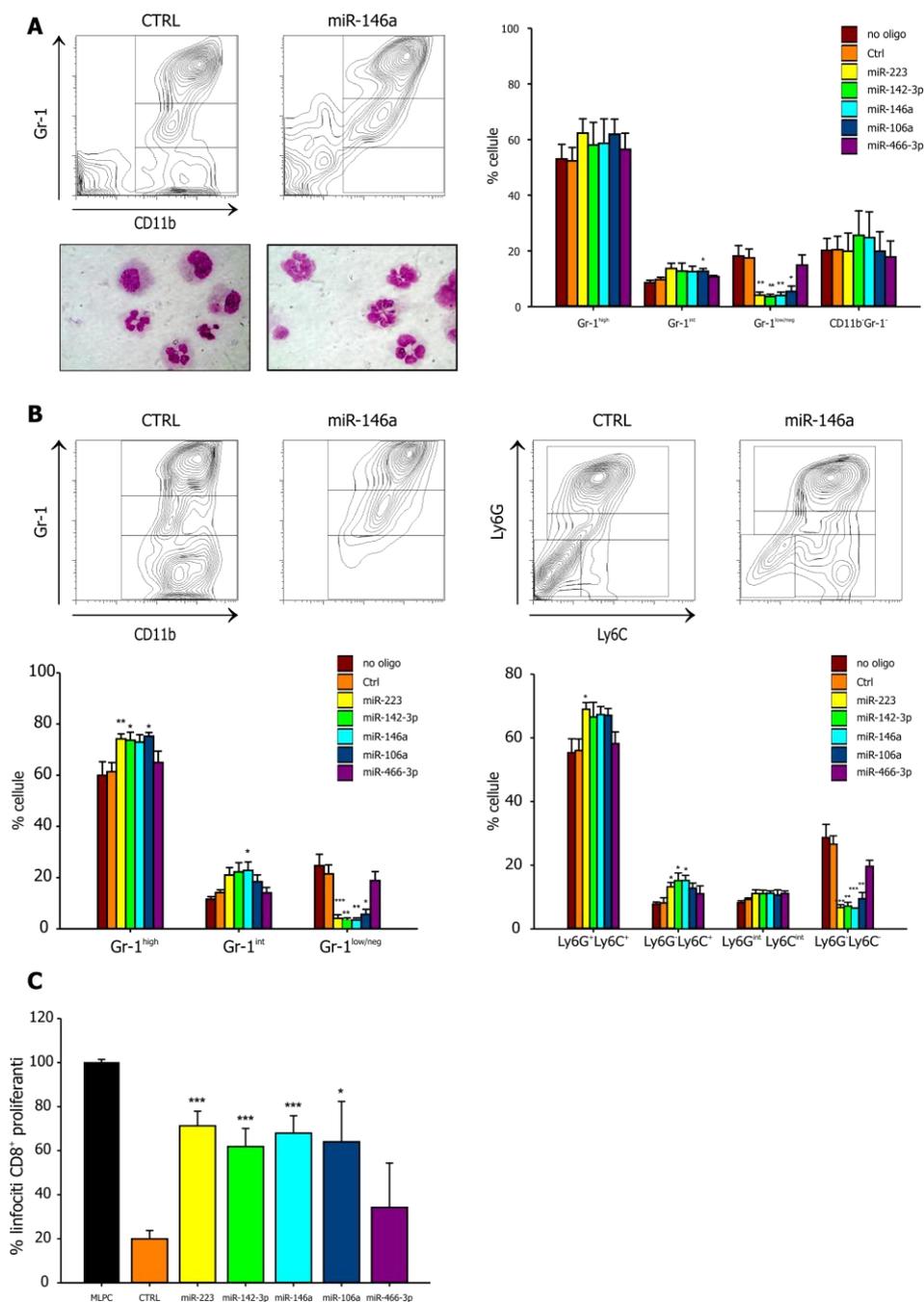
## **La modulazione di miRNA *in vitro* altera il differenziamento delle sottopopolazioni di BM-MDSC**

Per studiare l'effetto dei miRNA sulla maturazione di MDSC e l'acquisizione del fenotipo soppressorio, abbiamo deciso di utilizzare il modello sopra citato di generazione *in vitro* di MDSC a partire da midollo osseo. Questo sistema è stato impiegato sia perchè ci permette di ottenere quantità discrete di MDSC molto simili a quelle indotte da tumore in modo rapido e semplice, sia perchè il midollo osseo, nelle nostre condizioni sperimentali, si è rivelato facilmente trasfettabile con oligonucleotidi che mimano i miRNA maturi. La trasfezione con questi "miRNA mimics", infatti, garantisce una sovra-regolazione del miRNA di interesse superiore a cinquanta volte il livello basale oltre i quattro giorni, rendendo la procedura adatta alle tempistiche sperimentali. La strategia adottata è stata, pertanto, quella di trasfettare il midollo osseo di animali sani, isolato sterilmente mediante "flushing" delle cellule da tibia e femore e successiva lisi dei globuli rossi. Gli oligonucleotidi con sequenza identica ai miRNA maturi sono stati trasfettati mediante una formulazione di lipidi cationici e, dopo quattro ore dalla trasfezione, le citochine GM-CSF e IL-6 sono state aggiunte alla coltura. Le cellule sono state coltivate per quattro giorni e, al termine della coltura, sono state analizzate in citofluorimetria ed aggiunte come terza parte a colture MLPC per testarne la capacità soppressiva. Quello che si può notare in figura 9A è una drastica riduzione, sul totale delle cellule, della popolazione Gr-1<sup>low/neg</sup> nelle colture trattate con miR-223 (p=0.002), miR-142-3p (p=0.008), miR-146a (p=0.01), e miR-106a (p=0.013), rispetto a quelle trattate con l'oligonucleotide di controllo; tale alterazione non si osserva invece con il miR-466-3p (p=0.605), anch'esso downregolato nei chip, utilizzato negli esperimenti successivi come ulteriore controllo negativo. Questa alterazione corrisponde ad un aumento delle cellule che presentano un morfologia granulocitaria ed una tendenza alla ipersegmentazione nucleare in presenza di alcuni miRNA, come nel caso mostrato del miR-146a (figura 9A, in basso). Osservando solo la popolazione CD11b<sup>+</sup>, in figura 9B, la contrazione di questa frazione si accompagna ad un aumento delle altre due frazioni cellulari Gr-1<sup>int</sup> e Gr-1<sup>high</sup>, significativo per quest'ultima nel caso dei miR-223 (p=0.005), miR-142-3p (p=0.049) e miR-106a (p=0.004). Queste modificazioni nelle popolazioni mieloidi si riflettono anche in alterazioni dei marcatori Ly6C e Ly6G: come

atteso, si riduce in modo significativo la popolazione Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>-</sup>, compensata da un aumento di cellule Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> e, soprattutto, Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>. Queste alterazioni fenotipiche risultano dipendenti dalla dose di miRNA trasfettato e sono consistenti, per tutti i miRNA studiati, fino alla dose di 20 nM di oligonucleotide; al di sotto di questa dose l'effetto cala in modo diverso per ogni miRNA, con il miR-106a che mostra la diminuzione più rapida.

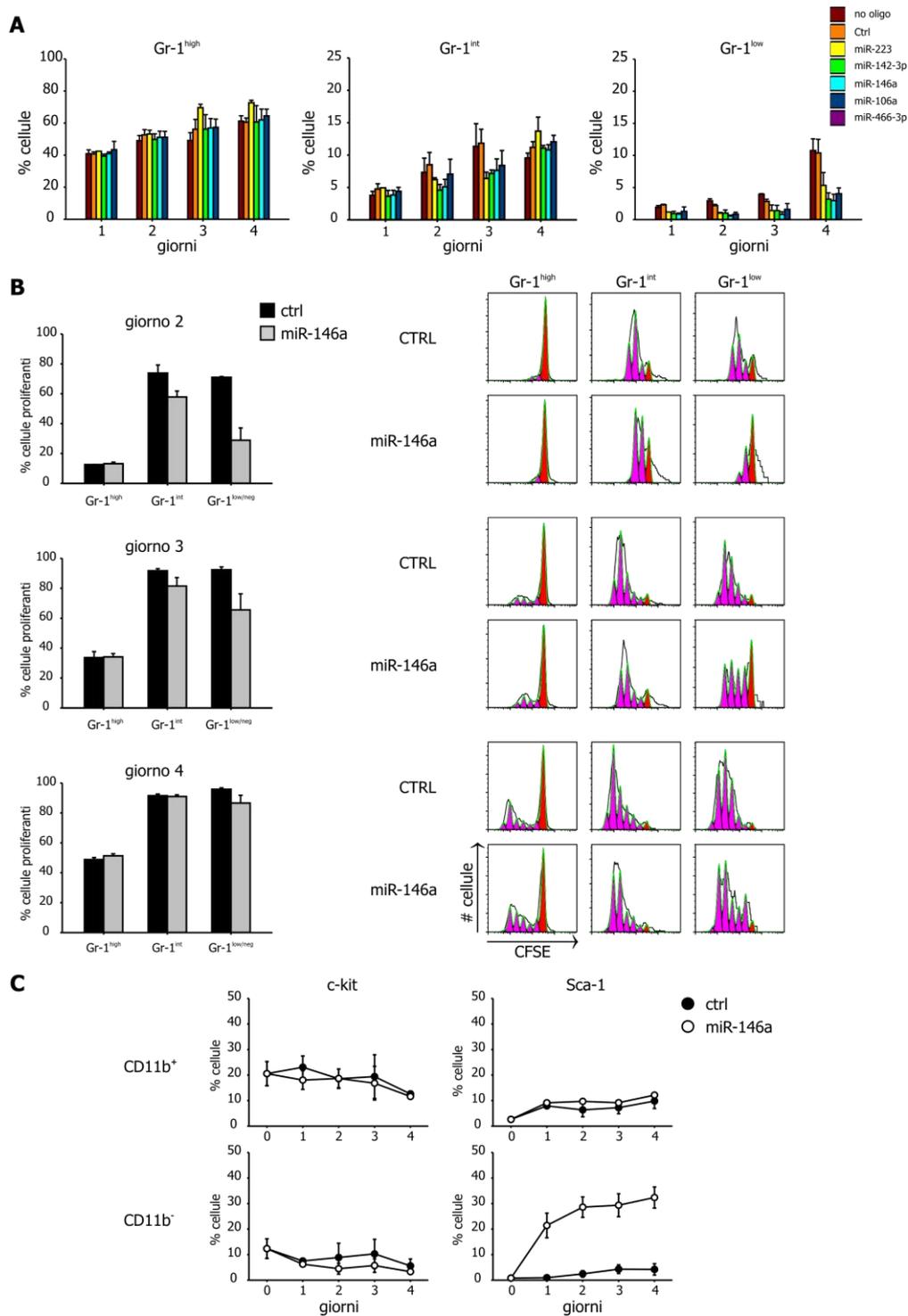
## **L'espressione forzata dei miRNA nelle BM-MDSC ne riduce la capacità di inibire la proliferazione dei linfociti T attivati**

Sapendo che la frazione Gr-1<sup>low/neg</sup> ottenuta da queste BM-MDSC è soppressiva *in vitro*, ci siamo chiesti se i midolli trattati con i miRNA fossero ancora in grado di svolgere la loro attività soppressiva sui linfociti T attivati. Dovendo testare diversi miRNA a diverse concentrazioni di BM-MDSC in coltura e utilizzando un sistema di trasfezione transiente, al fine di testare l'attivazione dei linfociti T CD8<sup>+</sup> abbiamo scelto un test di proliferazione, più agevole e rapido rispetto al test di citotossicità mediante rilascio di cromo. In particolare, abbiamo allestito colture MLPC come precedentemente illustrato, utilizzando linfociti T CD8<sup>+</sup> HA-specifici marcati con il colorante CFSE. Alle colture abbiamo aggiunto come terza parte le BM-MDSC, trattate o meno con i miRNA, in percentuali scalari dal 24% al 3% della coltura leucocitaria. Dopo tre giorni di coltura abbiamo valutato la diluizione del CFSE nei linfociti T CD8<sup>+</sup> in coltura, per determinarne la proliferazione, notando che la percentuale di linfociti T CD8<sup>+</sup> antigene-specifici proliferanti aumenta in modo significativo in presenza di BM-MDSC maturate con l'aggiunta dei miR-223 (p<0.001), miR-142-3p (p<0.001), miR-146a (p<0.001) e miR-106a (p=0.024), ma non del miR-466-3p (p=0.351), rispetto all'oligonucleotide scorrelato di controllo (figura 9C).



**Figura 9. La modulazione dei miR-146a, miR-223, miR-142-3p e miR-106a altera il differenziamento mieloido indotto da GM-CSF e IL-6. (A)** A sinistra, contour plot rappresentativo di midollo osseo trasfettato con sequenza scorrelata (ctrl) o miR-146a, trattato con GM-CSF e IL-6 per quattro giorni, e relativa colorazione con May-Grünwald-Giemsa (in basso). L'effetto è analogo a quello osservato con gli altri miRNA. A destra, istogramma in cui sono riportate le variazioni nelle tre frazioni Gr-1<sup>high</sup>, Gr-1<sup>int</sup> e Gr-1<sup>low/neg</sup>, identificate dai gate mostrati sul contour plot, sul totale della coltura. I dati rappresentano la media ± SE di sei esperimenti indipendenti. **(B)** Analisi di sottopopolazioni identificate dalle marcature con anti-CD11b e anti-Gr-1, a sinistra, o anti-Ly6C e anti-Ly6G, a destra, all'interno della regione di cellule CD11b<sup>+</sup>. **(C)** Inibizione della proliferazione di MLPC da parte delle BM-MDSC (BM-MDSC al 24% della coltura MLPC). I valori rappresentano la percentuale di linfociti proliferanti, in base a diluizione di CFSE, normalizzati rispetto alla coltura di controllo senza cellule soppressive. Media ± SE di cinque esperimenti indipendenti. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

Ci siamo quindi chiesti quale potesse essere il meccanismo di azione dei miRNA in questa alterazione della maturazione delle MDSC. Da un lato abbiamo deciso di indagare la vitalità e la proliferazione delle BM-MDSC trattate con i miRNA durante i quattro giorni di coltura, dall'altro abbiamo iniziato a cercare possibili bersagli molecolari, di uno o più tra i miRNA analizzati, che potessero spiegare l'effetto osservato. Guardando alla vitalità delle colture durante i quattro giorni di trattamento con le citochine, ci siamo accorti che la mortalità cellulare viene aumentata dai miR-223, miR-142-3p, miR-146a e miR-106a, a differenza di quanto avviene con l'oligonucleotide di controllo e con il miR-466-3p. Parte di questa mortalità cellulare è attribuibile a fenomeni apoptotici, come rivela la marcatura con annessina V, evidenziabili già dopo un giorno di coltura soprattutto a carico delle cellule CD11b<sup>+</sup>, ma il fenomeno è ancora da esplorare (dati non mostrati). Queste analisi in cinetica a tempi brevi hanno anche permesso di osservare che, parallelamente all'aumento di cellule apoptotiche in coltura, anche la riduzione della popolazione Gr-1<sup>low/neg</sup> ad opera dei miRNA è un evento precoce. Come si vede in figura 10A, infatti, questa frazione, già presente a bassi livelli nel midollo di partenza, rimane sotto il 5% delle cellule in coltura in tutte le fasi della cinetica; la frazione Gr-1<sup>int</sup> subisce una modesta riduzione, rispetto ai controlli, tra le 48 e le 72 ore, arrivando addirittura a superarli al quarto giorno di coltura, mentre la frazione Gr-1<sup>high</sup> sembra risentire meno dell'effetto dei miRNA. Questo comportamento correla con quanto abbiamo osservato seguendo la proliferazione delle frazioni durante la coltura. Marcando il midollo con CFSE prima della trasfezione con i miRNA e l'aggiunta di citochine, si può infatti seguire nel tempo la proliferazione delle sottopopolazioni in base all'espressione di Gr-1. Da questi esperimenti abbiamo notato come i miRNA inducano una riduzione della proliferazione nella popolazione Gr-1<sup>int</sup> tra il secondo e il terzo giorno e nella popolazione Gr-1<sup>low/neg</sup> dal primo al quarto giorno di coltura. La minore proliferazione si osserva sia in termini di percentuali di cellule proliferanti (Figura 10B, a sinistra), sia nella distribuzione delle generazioni cellulari (Figura 10B, a destra). Una riduzione nella proliferazione, meno marcata ma crescente, si osserva anche nelle cellule CD11b<sup>-</sup>.



**Figura 10. La sovraespressione dei miRNA ha un effetto precoce sulla proliferazione che colpisce in modo differente le sottopopolazioni di BM-MDSC. (A)** La riduzione della frazione Gr-1<sup>low/neg</sup> è visibile già dopo 24 ore e dura per tutto il corso della coltura, mentre l'effetto sulla popolazione Gr-1<sup>int</sup> è osservabile tra il secondo e terzo giorno. Dati espressi come media ± SE di tre esperimenti. **(B)** A sinistra, percentuale di cellule proliferanti nelle tre sottopopolazioni, determinato dalla diluzione di CFSE sui gate indicati in figura 9. A destra, grafico rappresentativo delle generazioni cellulari nelle tre frazioni. Risultati analoghi sono stati ottenuti con il miR-142-3p. **(C)** Espressione dei marcatori staminali c-kit (CD117) e Sca-1 in cellule CD11b<sup>+</sup> e CD11b<sup>-</sup> durante i quattro giorni di coltura (media ± SE di tre esperimenti). Dati simili sono stati ottenuti con il miR-142-3p.

Infine, abbiamo osservato come la trasfezione con almeno due dei miRNA in esame, miR-146a e miR-142-3p (gli altri miRNA saranno testati a breve), ma non con il relativo controllo, modifichi l'espressione del marcatore staminale Sca-1. Questa molecola, a differenza di c-kit, viene infatti sovraespressa nel corso della coltura e l'aumento riguarda soprattutto le cellule CD11b<sup>-</sup> (Figura 10C, grafico rappresentativo con miR-146a).

## **Ricerca di potenziali bersagli molecolari regolati dai miRNA**

Abbiamo iniziato ad indagare quali geni potessero essere bersagli molecolari dei miRNA studiati. Considerando i quattro miRNA con effetto di riduzione della popolazione Gr-1<sup>low/neg</sup>, cioè miR-223, miR-146a, miR-142-3p e miR-106a, abbiamo cercato dei potenziali candidati predetti bioinformaticamente. In base alla sequenza del miRNA e degli mRNA, infatti, ci sono diversi algoritmi in grado di predire appaiamenti plausibili che tengano conto, oltre che della complementarità del mRNA al "seed" del miRNA, anche della stabilità e della conservazione evolutiva di tali interazioni. Abbiamo, quindi, confrontato ed analizzato le predizioni on-line dei software a licenza libera più utilizzati in letteratura: miRANDA (recentemente rinnovato col nome MicroCosm, [www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v](http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v)), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de>), Targetscan ([http://www.targetscan.org/mmu\\_50](http://www.targetscan.org/mmu_50)) e PITA ([http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07\\_dyn\\_data.html](http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_dyn_data.html)). Con centinaia di target predetti da ogni algoritmo per ciascun miRNA abbiamo deciso di restringere le nostre valutazioni focalizzandoci su (a) bersagli che fossero predetti per ciascun miRNA da tutti i software a disposizione, (b) bersagli che avessero un ruolo noto nel differenziamento, nella proliferazione o nell'apoptosi di cellule mieloidi e loro precursori e (c) bersagli comuni a due o più miRNA studiati.

Per la prima analisi abbiamo sfruttato un altro software libero, miRecords, che permette in automatico di ottenere predizioni di bersagli comuni a più di un algoritmo, tra quelli disponibili. In questo modo siamo stati in grado di generare, per ciascun miRNA, una lista di bersagli molecolari predetti, oltre che dai quattro software sopracitati, anche da RNAhybrid e miRtarget2. Per la seconda analisi abbiamo creato, a partire da dati di letteratura, un elenco di geni, per lo più fattori di trascrizione,

coinvolti nella maturazione mielo-monocitaria. In particolare, sapendo che la frazione Gr-1<sup>low</sup> contiene elementi monocito/macrofagici, ci siamo concentrati sui geni che vengono normalmente attivati durante il differenziamento di precursori granulocito-macrofagici (GM-CFU) in precursori monocitari (M-CFU) e negli stadi successivi di maturazione in monoblasto, pro-monocita e monocita, o, viceversa, su geni che inibiscono la maturazione in senso granulocitario. Il bersaglio molecolare, infatti, in seguito a trasfezione del miRNA nella coltura di midollo in *vitro*, verrà downregolato: quindi, se è un attivatore della maturazione monocitaria, non sarà in grado di far differenziare le cellule verso quel lineage, e, viceversa, se è un inibitore della maturazione granulocitaria, favorirà questa via differenziativa. Per la terza analisi abbiamo considerato bersagli molecolari che potessero essere coinvolti in processi rilevanti per le cellule mieloidi (proliferazione, apoptosi, attivazione) e fossero regolati allo stesso tempo da almeno due miRNA di interesse. Per iniziare la validazione dei bersagli, abbiamo deciso di partire da nove geni, scelti tra i tre diversi tipi di analisi, illustrati in tabella 2.

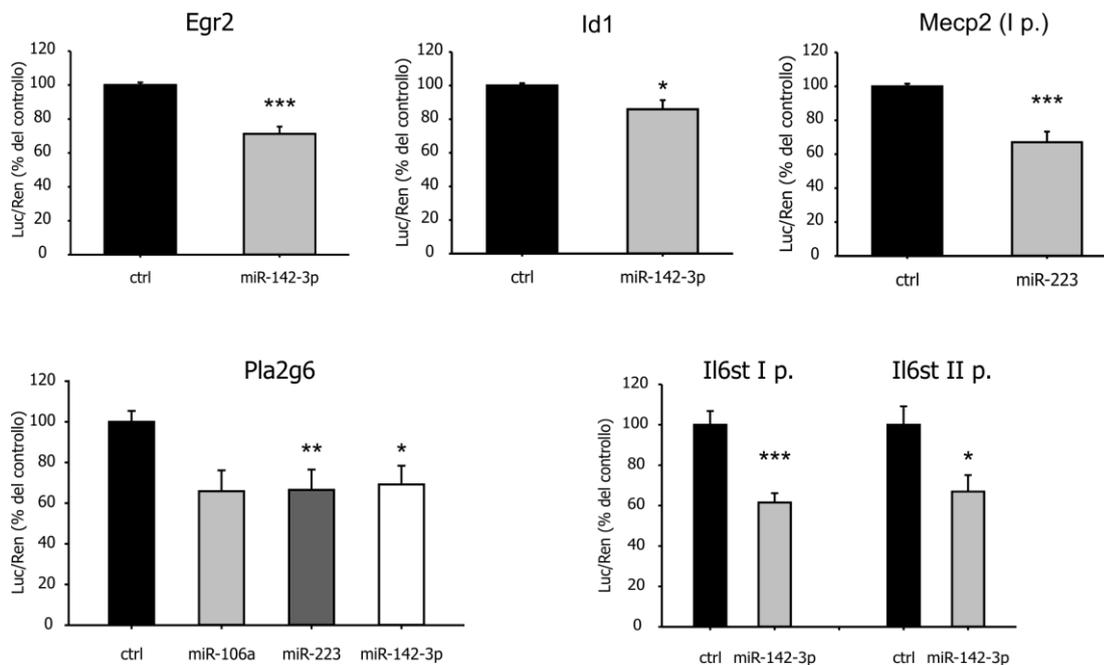
Per verificare l'interazione tra i miRNA in esame e gli mRNA dei geni selezionati abbiamo deciso di eseguire dei test di luminescenza con un plasmide codificante per il gene della *Firefly luciferase* con sito di policlonaggio nel 3' UTR (untranslated region) del gene stesso. Clonando la regione 3'UTR del gene di interesse in questa posizione, il gene della luciferasi viene a trovarsi sotto lo stesso potenziale controllo post-trascrizionale dei miRNA predetti. Se i miRNA influenzano l'espressione del gene, questo si rifletterà sull'espressione della luciferasi, che avrà un segnale inferiore a quello che si avrebbe in presenza di un miRNA scorrelato. Le regioni 3'UTR dei bersagli selezionati sono stati, quindi, clonati all'interno della regione di policlonaggio del vettore commerciale pMIR-REPORT; nei casi in cui la regione si è rivelata di dimensioni eccessive, come per i geni *Mecp2*, *Plagl2* e *Il6st*, abbiamo deciso di suddividere la sequenza in due o tre parti, ciascuna delle quali contenente almeno uno dei siti predetti (ottenendo così sette plasmidi: *Mecp2* I parte, *Mecp2* II parte, *Mecp2* III parte, *Plagl2* I parte, *Plagl2* II parte, *IL6st* I parte, *IL6st* II parte). Abbiamo, quindi, iniziato a saggiare i plasmidi in esperimenti di trasfezione transiente in cellule umane 293T, facilmente trasfettabili e di specie diversa rispetto ai miRNA in esame, in cui abbiamo introdotto il pMIR-REPORT-3'UTR insieme ad un plasmide di normalizzazione

(*Renilla luciferase*) e al miRNA di interesse. In ogni esperimento, come controlli, abbiamo valutato l'espressione della luciferasi in assenza di oligonucleotidi o con la sequenza di controllo non codificante per miRNA noti utilizzata in tutti gli esperimenti precedenti.

Target	MiR predetto	Algoritmo	Ruolo	Referenze
<b>Mecp2</b>	miR-223 (3 siti)	Targetscan, PITA, Pictar	Regolazione trascrizionale del differenziamento (interagisce con PU.1, EGR2, Id1)	(Suzuki, Yamada et al. 2003; Swanberg, Nagarajan et al. 2009)
	miR-106a (3 siti)	Targetscan, PITA, Pictar		
	miR-142-3p	Targetscan, PITA		
	miR-146a	Targetscan, PITA		
<b>Plagl2</b>	miR-223	Targetscan, PITA	Regolazione della proliferazione di precursori ematopoietici e di fattori pro-apoptotici	(Mizutani, Furukawa et al. 2002; Landrette, Kuo et al. 2005)
	miR-106a	Targetscan, PITA		
	miR-142-3p	Targetscan, PITA		
	miR-146a (2 siti)	Targetscan, PITA		
<b>Pla2g6</b>	miR-223	Targetscan, PITA, Mirbase	Produzione di ROS, PGE <sub>2</sub> , espressione di iNOS e induzione di apoptosi in macrofagi	(Moran, Buller et al. 2005; Bao, Li et al. 2007; Moon, Jenkins et al. 2008; Lee, Park et al. 2009)
	miR-142-3p	Targetscan, PITA, Mirbase		
	miR-106a	Targetscan, PITA, Mirbase		
<b>IL6st</b>	miR-142-3p	Targetscan, PITA	Signaling di IL-6/Lif/Osm, induzione di STAT3, omeostasi ematopoietica/espansione di precursori ematopoietici	(Jenkins, Quilici et al. 2002; Takizawa, Nobuhisa et al. 2003; Jenkins, Roberts et al. 2005; Yao, Yokota et al. 2005)
	miR-106a	Targetscan, PITA		
	miR-223	Targetscan		
<b>Id1</b>	miR-142-3p	Targetscan, PITA, Mirbase	Omeostasi cellule staminali ematopoietiche, maturazione monocitaria vs granulocitaria, regolazione effetto del VEGF su DC	(Laxmanan, Robertson et al. 2005; Leeanansaksiri, Wang et al. 2005; Jankovic, Ciarrocchi et al. 2007; Perry, Zhao et al. 2007; Chan, Jensen et al. 2009)
	miR-146a	Mirbase		
	miR-106a	Targetscan		
<b>Egr2</b>	miR-142-3p	Targetscan, PITA, Pictar	Maturazione macrofagica, induzione di proteine anti-apoptotiche, induzione di C/EBP $\beta$ , regolazione di Fas/FasL	(Droin, Pinkoski et al. 2003; Chen, Torrens et al. 2005; Laslo, Spooner et al. 2006; Bradley, Ruan et al. 2008)
	miR-106a	Targetscan, PITA, Pictar		
<b>Osm</b>	miR-106a	Targetscan, PITA	Omeostasi di progenitori ematopoietici, induzione di COX2	(Broxmeyer, Bruns et al. 2002; Holzer, Ryan et al. 2004)
	miR-223	Targetscan		
<b>Sp3</b>	miR-223	Targetscan, PITA, Pictar, Mirbase	Regolato da IL-6, differenziamento mieloide	(Van Loo, Bouwman et al. 2003; Canaff, Zhou et al. 2008)
<b>Dab2</b>	miR-106a	Targetscan, PITA, Pictar	Regolato da IFN- $\gamma$ , interazione con PU.1, regolazione dell'adesione macrofagica	(Rosenbauer, Kallies et al. 2002)

**Tabella 2. Bersagli molecolari predetti bioinformaticamente per i miRNA di interesse.**

Tra le diverse combinazioni target-miRNA finora testate, alcune interazioni si sono rivelate interessanti: il miR-142-3p, infatti, è in grado di inibire l'espressione della luciferasi quando interagisce con il 3'UTR dei geni Egr2, Id1, Pla2g6 e IL6st (in due siti distinti, uno sul plasmide IL6st I parte, uno su IL6st II parte), mentre il miR-223 riduce la luminescenza dei plasmidi con 3'UTR di Mecp2 e Pla2g6 (Figura 11). Nei prossimi mesi procederemo a validare queste interazioni sia mutagenizzando il sito di probabile appaiamento del miRNA nel 3'UTR, per verificare che l'effetto osservato sia specifico e coinvolga la sequenza predetta, sia analizzando l'espressione delle proteine in western blot, sia silenziando i geni target in colture di midollo al fine di osservarne l'effetto sul fenotipo delle BM-MDSC.



**Figura 11. Interazioni tra miRNA e 3' UTR di alcuni target predetti.** Istogrammi relativi alle differenze di luminescenza tra cellule trasfettate con plasmide pmiR-Report-3'UTR esprimente *firefly luciferase*, plasmide pRL-TK esprimente *renilla luciferase* ed oligonucleotidi (miRNA o sequenza scorrelata di controllo). I valori, espressi come rapporto tra segnale di *firefly luciferase* su *renilla luciferase* e normalizzati rispetto al controllo, rappresentano la media  $\pm$  errore standard di almeno quattro esperimenti. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Mecp2 I p.=Mecp2 I parte, IL6st I p.=IL6st I parte, IL6st II p.=IL6st II parte).

## DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi è stato studiato l'effetto del GM-CSF sull'espansione e la maturazione di sottopopolazioni di MDSC, utilizzando un modello tumorale geneticamente modificato per ridurre la produzione della citochina. Questo strumento ci ha permesso di confermare il ruolo centrale del GM-CSF nell'espansione delle MDSC, e di verificare che questa azione sia fondamentale soprattutto per le sottopopolazioni a maggiore potenziale soppressivo, ovvero le cellule CD11b<sup>high</sup> con intensità debole o intermedia del marcatore Gr-1. La riduzione del GM-CSF nelle cellule tumorali provoca un abbattimento *in vivo* della tolleranza antigene-specifica mediata dal tumore ed una minor capacità soppressiva delle MDSC *in vitro*. *In vivo* l'effetto potrebbe essere spiegato semplicemente dalla minore presenza di MDSC negli organi linfoidi degli animali, rispetto a quanto avviene col tumore parentale, sebbene la percentuale di cellule CD11b<sup>high</sup>Gr-1<sup>+</sup> sia comunque ben superiore a quella di un animale sano (30% rispetto a 5-10%). L'effetto *in vitro*, però, fa pensare che la riduzione del GM-CSF, oltre a diminuire la mielopoiesi indotta dal tumore, determini una diversa maturazione delle cellule mieloidi. All'interno della popolazione CD11b<sup>+</sup>, infatti, mentre la popolazione CD11b<sup>high</sup>Gr-1<sup>high</sup> rimane pressochè invariata, le popolazioni soppressive CD11b<sup>high</sup>Gr-1<sup>int</sup> e CD11b<sup>high</sup>Gr-1<sup>low</sup> vengono ridotte e mostrano un aumento percentuale di cellule F4/80<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>, ad indicare probabilmente un maggiore differenziamento verso tipi cellulari mielomonocitari più maturi; inoltre, si nota un incremento di cellule CD11b<sup>int</sup> che, sebbene ancora poco definite, contengono elementi cellulari con caratteristiche di macrofagi e cellule dendritiche. Anche se resta da indagare in modo sistematico l'espressione di marcatori funzionali quali le molecole co-stimolatorie CD80 e CD86 in associazione a MHC di classe II, si può ipotizzare che una diminuzione di GM-CSF nel microambiente tumorale da un lato riduca l'accumulo di MDSC e, dall'altro, favorisca il differenziamento mieloido in cellule APC mature, ripristinando una risposta immunitaria simile a quella di un animale sano. Dagli esperimenti qui presentati e da altri condotti in parallelo nel nostro laboratorio, siamo quindi stati in grado di definire, all'interno della macropopolazione CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>, due sottopopolazioni soppressive, Gr-1<sup>int</sup> e Gr-1<sup>low</sup>, indotte preferenzialmente da GM-CSF,

contenenti elementi monocitari e cellule con fenotipo meno maturo, ed una popolazione scarsamente inibitoria costituita da polimorfonucleati Gr-1<sup>high</sup>, che risentono invece dell'azione del G-CSF (Dolcetti, Peranzoni et al.). Inoltre, anche se i nostri dati in merito sono preliminari, il rilascio di GM-CSF da parte del tumore nel microambiente sembra avere un ruolo anche nel favorire le proprietà invasive della neoplasia stessa, quali l'angiogenesi e la metastasi, come avanzato da altri (Grote, Schuett et al.; Park, Zhang et al. 2007). Data la presenza di MDSC nell'infiltrato tumorale attorno ai vasi neoformati, la loro riduzione con il silenziamento del GM-CSF ed il ruolo già descritto per queste cellule nel sostenere la vascolarizzazione, possiamo ipotizzare che questa citochina favorisca l'angiogenesi grazie al reclutamento, oltre che di cellule endoteliali e periciti, anche di MDSC; sarebbe interessante capire se in questo processo le diverse frazioni cellulari identificate possano svolgere funzioni distinte.

La variabilità di sottopopolazioni, e l'immunosoppressione ad esse correlata, osservabili in tipi tumorali differenti dipende, quindi, dalla combinazione dei fattori solubili rilasciati dalle cellule neoplastiche, che determinano in primo luogo il grado di espansione dei precursori mieloidi e, in seguito, il mantenimento di un loro stato poco differenziato o la maturazione verso elementi prevalentemente monocitari o granulocitari. Per capire quali citochine e fattori di crescita siano in grado di reclutare e attivare sottopopolazioni di MDSC si è rivelata utile la generazione *in vitro* di queste cellule a partire da precursori midollari; similmente a quanto proposto da altri gruppi negli ultimi anni (Rossner, Voigtlander et al. 2005; Morales, Kmiecik et al. 2009), cellule di midollo osseo sono state trattate con combinazioni di citochine importanti per la mielopoiesi, come GM-CSF, G-CSF e IL-6, per generare delle cellule soppressorie con caratteristiche simili a quelle indotte *in vivo* dalla crescita del tumore (Marigo et al., in revisione). Per quanto riduttivo, perchè non tiene conto di altri fattori probabilmente rilevanti per la mielopoiesi, quali IL-3, SCF e M-CSF, questo modello permette però di ottenere in modo rapido, semplice e riproducibile, delle cellule che ricapitolano bene diversi aspetti fenotipici e funzionali delle MDSC descritte *in vivo* in animali portatori di tumore. Inoltre, questa procedura si rivela molto utile per poter studiare i meccanismi di espansione, maturazione ed attivazione delle MDSC in modo controllato.

Lo studio di sottopopolazioni mieloidi soppressive è iniziato già da anni, anche nel nostro gruppo, con la ricerca di marcatori di superficie che permettessero di

discriminare funzionalmente queste cellule. Finora, però, non sono state identificate molecole di superficie univocamente associate, in tutti i modelli tumorali, all'azione immunosoppressiva delle MDSC; inoltre, lo studio di recettori di superficie non risulta sempre agevole, se si considera il fatto che possono venire facilmente modulati dal microambiente o, *in vitro*, dalle condizioni di coltura. Abbiamo, quindi, deciso di provare un approccio diverso allo studio delle MDSC, che coinvolge la ricerca di fattori trascrizionali chiave in queste cellule. Se in precedenza è stato analizzato il profilo di espressione genica di queste cellule in diversi modelli tumorali (Gallina, Dolcetti et al. 2006), recentemente abbiamo deciso di valutare il profilo di espressione dei microRNA, dato l'interesse che queste molecole hanno suscitato nell'ultimo decennio per la loro regolazione di fondamentali processi biologici. L'analisi mediante chip è stata eseguita considerando, anche stavolta, cellule indotte da tumori con caratteristiche istologiche differenti, in modo da poter valutare fenomeni allo stesso tempo generalizzabili e tumore-specifici. Questo ci ha permesso di osservare che le modifiche subite dalle cellule CD11b<sup>+</sup> in un contesto di crescita neoplastica sono rispecchiate da cambiamenti nell'assetto di miRNA, e che questo permette anche di distinguere MDSC spleniche da MDSC intratumorali, facendoci ipotizzare che il tumore induca in queste cellule un programma genetico, poi ulteriormente variato dalla localizzazione anatomica e dal microambiente in cui si trovano. Considerando la semplicità con cui è possibile generare MDSC da colture di midollo e trasferirle con oligonucleotidi che mimano miRNA maturi, abbiamo deciso di studiarne l'effetto nel processo di differenziamento *in vitro*. La modulazione dei miR-146a, miR-142-3p, miR-223 e miR-106a all'inizio della coltura con GM-CSF e IL-6 provoca un minor accumulo della frazione soppressiva CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>low/neg</sup> rispetto a quanto avvenga con sequenze scorrelate o con altri miRNA, come il miR-466-3p. Questo effetto è già visibile dopo 24 ore dalla trasfezione, permane per tutto il corso della coltura, e coinvolge solo in modo marginale le altre frazioni CD11b<sup>+</sup>, ma è sufficiente a ridurre in modo significativo l'inibizione della proliferazione dei linfociti T indotta dalle BM-MDSC. Abbiamo finora osservato che almeno due dei miRNA in questione, i miR-146a e miR-142-3p, sono in grado di rallentare l'espansione della frazione Gr-1<sup>int</sup>, solo temporaneamente, e Gr-1<sup>low/neg</sup>, in modo più duraturo. Un'inibizione della replicazione si osserva, inoltre, in cellule CD11b<sup>-</sup>, in cui si nota anche un notevole aumento dell'espressione di Sca-1<sup>+</sup> (ma non di c-kit).

Anche se non sappiamo se e come i due fenomeni siano collegati, ci sono evidenze che una sovraespressione di Sca-1 correli con un'inibizione proliferativa in diversi tipi cellulari (Stanford, Haque et al. 1997; Mitchell, Mills et al. 2005) e con una ridotta capacità di generare colonie mieloidi in progenitori midollari umani e murini (Bradfute, Graubert et al. 2005). E' inoltre da chiarire quale possa essere la relazione tra la mortalità, parzialmente mediata da apoptosi, che si osserva nelle colture con i miRNA e queste alterazioni nella proliferazione cellulare. Stiamo attualmente cercando di capire quali possano essere i bersagli molecolari regolati dai miRNA in questione e responsabili delle alterazioni maturative osservate in coltura. Gli esperimenti finora svolti con i costrutti esprimenti i 3' UTR di questi geni sotto il controllo del gene per la luciferasi ci hanno permesso di evidenziare alcune possibili interazioni, che procederemo a validare nei prossimi mesi, soprattutto a carico del miR-142-3p. Questa molecola, infatti, sembra regolare i geni *Pla2g6*, *Egr2*, *Id1* e *IL6st*, che oltre ad essere coinvolti in processi di apoptosi, proliferazione omeostatica e differenziamento di cellule mieloidi o dei loro precursori (Takizawa, Nobuhisa et al. 2003; Jenkins, Roberts et al. 2005; Leeanansaksiri, Wang et al. 2005; Laslo, Spooner et al. 2006; Jankovic, Ciarrocchi et al. 2007; Perry, Zhao et al. 2007; Bradley, Ruan et al. 2008), potrebbero interagire con molecole rilevanti per la biologia delle MDSC, come iNOS/NOS2 (Moran, Buller et al. 2005) o il fattore trascrizionale C/EBP $\beta$  (Chen, Torrens et al. 2005), che regola ARG1 e NOS2 ed è cruciale per l'espansione e la funzionalità delle MDSC (Marigo et al., in revisione). Dati preliminari recentemente ottenuti in laboratorio suggeriscono che i miR-142-3p, miR-146a e miR-223 siano in grado di inibire l'espressione di due isoforme di C/EBP $\beta$ , anche se, non essendo questo un bersaglio molecolare predetto bioinformaticamente, rimane da capire se l'effetto sia diretto o mediato da geni che si trovano a monte del fattore trascrizionale.

Con questo lavoro di tesi si è cercato di indagare alcuni meccanismi di regolazione riguardanti sottopopolazioni mieloidi soppressorie. Distinguere frazioni cellulari con attività inibitoria diversa, e capire come ne vengono modulati l'accumulo, il differenziamento e la funzione a livello molecolare, è importante al fine di studiare terapie mirate, che permettano l'eliminazione selettiva di queste popolazioni, il blocco della loro espansione o il ripristino di una normale maturazione in senso non soppressivo, risparmiando altri sottotipi mieloidi cruciali per la risposta innata.

## BIBLIOGRAFIA

- Almand, B., J. I. Clark, et al. (2001). "Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer." *J Immunol* **166**(1): 678-89.
- Angulo, I., F. G. de las Heras, et al. (2000). "Nitric oxide-producing CD11b(+)Ly-6G(Gr-1)(+)CD31(ER-MP12)(+) cells in the spleen of cyclophosphamide-treated mice: implications for T-cell responses in immunosuppressed mice." *Blood* **95**(1): 212-20.
- Archimbaud, E., P. Fenaux, et al. (1993). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in association to timed-sequential chemotherapy with mitoxantrone, etoposide, and cytarabine for refractory acute myelogenous leukemia." *Leukemia* **7**(3): 372-7.
- Balkwill, F. and L. M. Coussens (2004). "Cancer: an inflammatory link." *Nature* **431**(7007): 405-6.
- Baltimore, D., M. P. Boldin, et al. (2008). "MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function." *Nat Immunol* **9**(8): 839-45.
- Baniyash, M. (2004). "TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response." *Nat Rev Immunol* **4**(9): 675-87.
- Bao, S., Y. Li, et al. (2007). "Attenuated free cholesterol loading-induced apoptosis but preserved phospholipid composition of peritoneal macrophages from mice that do not express group VIA phospholipase A2." *J Biol Chem* **282**(37): 27100-14.
- Bartel, D. P. and C. Z. Chen (2004). "Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs." *Nat Rev Genet* **5**(5): 396-400.
- Bazzoni, F., M. Rossato, et al. (2009). "Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(13): 5282-7.
- Belting, M., L. Borsig, et al. (2002). "Tumor attenuation by combined heparan sulfate and polyamine depletion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 371-6.
- Ben-Baruch, A. (2006). "The multifaceted roles of chemokines in malignancy." *Cancer Metastasis Rev* **25**(3): 357-71.
- Bettelheim, P., P. Valent, et al. (1991). "Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in combination with standard induction chemotherapy in de novo acute myeloid leukemia." *Blood* **77**(4): 700-11.
- Biermann, H., B. Pietz, et al. (1999). "Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors." *J Leukoc Biol* **65**(2): 217-31.
- Billiau, A. D., S. Fevery, et al. (2003). "Transient expansion of Mac1+Ly6-G+Ly6-C+ early myeloid cells with suppressor activity in spleens of murine radiation marrow chimeras: possible implications for the graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactivity of donor lymphocyte infusions." *Blood* **102**(2): 740-8.
- Bingisser, R. M., P. A. Tilbrook, et al. (1998). "Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway." *J Immunol* **160**(12): 5729-34.
- Bobe, P., K. Benihoud, et al. (1999). "Nitric oxide mediation of active immunosuppression associated with graft-versus-host reaction." *Blood* **94**(3): 1028-37.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the immune response." *Nat Immunol* **2**(10): 907-16.
- Boulland, M. L., J. Marquet, et al. (2007). "Human IL411 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation." *Blood* **110**(1): 220-7.
- Boutard, V., R. Havouis, et al. (1995). "Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity." *J Immunol* **155**(4): 2077-84.
- Bradfute, S. B., T. A. Graubert, et al. (2005). "Roles of Sca-1 in hematopoietic stem/progenitor cell function." *Exp Hematol* **33**(7): 836-43.

- Bradley, E. W., M. M. Ruan, et al. (2008). "Novel pro-survival functions of the Kruppel-like transcription factor Egr2 in promotion of macrophage colony-stimulating factor-mediated osteoclast survival downstream of the MEK/ERK pathway." *J Biol Chem* **283**(12): 8055-64.
- Brito, C., M. Naviliat, et al. (1999). "Peroxyntirite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxyntirite-driven apoptotic death." *J Immunol* **162**(6): 3356-66.
- Bronte, V., E. Apolloni, et al. (2000). "Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells." *Blood* **96**(12): 3838-46.
- Bronte, V., D. B. Chappell, et al. (1999). "Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation." *J Immunol* **162**(10): 5728-37.
- Bronte, V., T. Kasic, et al. (2005). "Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers." *J Exp Med* **201**(8): 1257-68.
- Bronte, V., P. Serafini, et al. (2003). "IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice." *J Immunol* **170**(1): 270-8.
- Bronte, V., M. Wang, et al. (1998). "Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells." *J Immunol* **161**(10): 5313-20.
- Bronte, V. and P. Zanovello (2005). "Regulation of immune responses by L-arginine metabolism." *Nat Rev Immunol* **5**(8): 641-54.
- Broxmeyer, H. E., H. A. Bruns, et al. (2002). "Th1 cells regulate hematopoietic progenitor cell homeostasis by production of oncostatin M." *Immunity* **16**(6): 815-25.
- Bunt, S. K., P. Sinha, et al. (2006). "Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression." *J Immunol* **176**(1): 284-90.
- Bunt, S. K., L. Yang, et al. (2007). "Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression." *Cancer Res* **67**(20): 10019-26.
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." *Prog Exp Tumor Res* **13**: 1-27.
- Burnet, M. (1964). "Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis." *Br Med Bull* **20**: 154-8.
- Calin, G. A. and C. M. Croce (2006). "MicroRNA signatures in human cancers." *Nat Rev Cancer* **6**(11): 857-66.
- Canaff, L., X. Zhou, et al. (2008). "The proinflammatory cytokine, interleukin-6, up-regulates calcium-sensing receptor gene transcription via Stat1/3 and Sp1/3." *J Biol Chem* **283**(20): 13586-600.
- Cauley, L. S., E. E. Miller, et al. (2000). "Superantigen-induced CD4 T cell tolerance mediated by myeloid cells and IFN-gamma." *J Immunol* **165**(11): 6056-66.
- Chan, A. S., K. K. Jensen, et al. (2009). "Id1 represses osteoclast-dependent transcription and affects bone formation and hematopoiesis." *PLoS One* **4**(11): e7955.
- Chang, C. I., J. C. Liao, et al. (2001). "Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity." *Cancer Res* **61**(3): 1100-6.
- Chen, C. Z., L. Li, et al. (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." *Science* **303**(5654): 83-6.
- Chen, C. Z. and H. F. Lodish (2005). "MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis." *Semin Immunol* **17**(2): 155-65.
- Chen, Z., J. I. Torrens, et al. (2005). "Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms." *Cell Metab* **1**(2): 93-106.
- Cheng, P., C. A. Corzo, et al. (2008). "Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein." *J Exp Med* **205**(10): 2235-49.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* **420**(6917): 860-7.
- De Palma, M., C. Murdoch, et al. (2007). "Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications." *Trends Immunol* **28**(12): 519-24.

- De Santo, C., P. Serafini, et al. (2005). "Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 4185-90.
- Diaz-Montero, C. M., M. L. Salem, et al. (2009). "Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy." Cancer Immunol Immunother **58**(1): 49-59.
- Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." Blood **87**(6): 2095-147.
- Dolcetti, L., I. Marigo, et al. (2008). "Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation." Cancer Lett **267**(2): 216-25.
- Dolcetti, L., E. Peranzoni, et al. "Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF." Eur J Immunol **40**(1): 22-35.
- Dranoff, G. (2002). "GM-CSF-based cancer vaccines." Immunol Rev **188**: 147-54.
- Dranoff, G. (2003). "GM-CSF-secreting melanoma vaccines." Oncogene **22**(20): 3188-92.
- Droin, N. M., M. J. Pinkoski, et al. (2003). "Egr family members regulate nonlymphoid expression of Fas ligand, TRAIL, and tumor necrosis factor during immune responses." Mol Cell Biol **23**(21): 7638-47.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-8.
- Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." Immunity **21**(2): 137-48.
- El Kasm, K. C., J. E. Qualls, et al. (2008). "Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens." Nat Immunol **9**(12): 1399-406.
- Ezernitchi, A. V., I. Vaknin, et al. (2006). "TCR zeta down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs." J Immunol **177**(7): 4763-72.
- Fazi, F., A. Rosa, et al. (2005). "A microcircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis." Cell **123**(5): 819-31.
- Fichtner-Feigl, S., M. Terabe, et al. (2008). "Restoration of tumor immunosurveillance via targeting of interleukin-13 receptor-alpha 2." Cancer Res **68**(9): 3467-75.
- Filipazzi, P., R. Valenti, et al. (2007). "Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine." J Clin Oncol **25**(18): 2546-53.
- Fischer, T. A., A. Palmethofer, et al. (2001). "Activation of cGMP-dependent protein kinase Ibeta inhibits interleukin 2 release and proliferation of T cell receptor-stimulated human peripheral T cells." J Biol Chem **276**(8): 5967-74.
- Fleming, T. J., M. L. Fleming, et al. (1993). "Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family." J Immunol **151**(5): 2399-408.
- Fontana, L., E. Pelosi, et al. (2007). "MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopenia through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation." Nat Cell Biol **9**(7): 775-87.
- Fricke, I., N. Mirza, et al. (2007). "Vascular endothelial growth factor-trap overcomes defects in dendritic cell differentiation but does not improve antigen-specific immune responses." Clin Cancer Res **13**(16): 4840-8.
- Gabrilovich, D., T. Ishida, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo." Blood **92**(11): 4150-66.
- Gabrilovich, D. I., V. Bronte, et al. (2007). "The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells." Cancer Res **67**(1): 425; author reply 426.
- Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, et al. (1996). "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells." Nat Med **2**(10): 1096-103.
- Gabrilovich, D. I. and S. Nagaraj (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." Nat Rev Immunol **9**(3): 162-74.

- Gabrilovich, D. I., M. P. Velders, et al. (2001). "Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells." *J Immunol* **166**(9): 5398-406.
- Gallina, G., L. Dolcetti, et al. (2006). "Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells." *J Clin Invest* **116**(10): 2777-90.
- Ganster, R. W., B. S. Taylor, et al. (2001). "Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15): 8638-43.
- Garzon, R. and C. M. Croce (2008). "MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis." *Curr Opin Hematol* **15**(4): 352-8.
- Garzon, R., M. Garofalo, et al. (2008). "Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(10): 3945-50.
- Gazitt, Y. (2002). "Comparison between granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the mobilization of peripheral blood stem cells." *Curr Opin Hematol* **9**(3): 190-8.
- Gebhardt, C., J. Nemeth, et al. (2006). "S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer." *Biochem Pharmacol* **72**(11): 1622-31.
- Georgantas, R. W., 3rd, R. Hildreth, et al. (2007). "CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(8): 2750-5.
- Giordanengo, L., N. Guinazu, et al. (2002). "Cruzipain, a major Trypanosoma cruzi antigen, conditions the host immune response in favor of parasite." *Eur J Immunol* **32**(4): 1003-11.
- Goni, O., P. Alcaide, et al. (2002). "Immunosuppression during acute Trypanosoma cruzi infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells." *Int Immunol* **14**(10): 1125-34.
- Gray, M. J., M. Poljakovic, et al. (2005). "Induction of arginase I transcription by IL-4 requires a composite DNA response element for STAT6 and C/EBPbeta." *Gene* **353**(1): 98-106.
- Greifengberg, V., E. Ribechini, et al. (2009). "Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development." *Eur J Immunol* **39**(10): 2865-76.
- Grote, K., H. Schuett, et al. "Toll-like receptor 2/6 stimulation promotes angiogenesis via GM-CSF as a potential strategy for immune defense and tissue regeneration." *Blood*.
- Haile, L. A., R. von Wasielewski, et al. (2008). "Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway." *Gastroenterology* **135**(3): 871-81, 881 e1-5.
- He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." *Nat Rev Genet* **5**(7): 522-31.
- Hiddemann, W., B. Wormann, et al. (1994). "New perspectives in the treatment of acute myeloid leukemia by hematopoietic growth factors." *Semin Oncol* **21**(6 Suppl 16): 33-8.
- Hildeman, D. A., T. Mitchell, et al. (2003). "Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 15035-40.
- Hoechst, B., L. A. Ormandy, et al. (2008). "A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells." *Gastroenterology* **135**(1): 234-43.
- Hoechst, B., T. Voigtlaender, et al. (2009). "Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor." *Hepatology* **50**(3): 799-807.
- Holzer, R. G., R. E. Ryan, et al. (2004). "Oncostatin M stimulates the detachment of a reservoir of invasive mammary carcinoma cells: role of cyclooxygenase-2." *Clin Exp Metastasis* **21**(2): 167-76.
- Hou, J., P. Wang, et al. (2009). "MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2." *J Immunol* **183**(3): 2150-8.
- Huang, B., Z. Lei, et al. (2007). "CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers." *Cancer Lett* **252**(1): 86-92.
- Huang, B., P. Y. Pan, et al. (2006). "Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host." *Cancer Res* **66**(2): 1123-31.

- Jankovic, V., A. Ciarrocchi, et al. (2007). "Id1 restrains myeloid commitment, maintaining the self-renewal capacity of hematopoietic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(4): 1260-5.
- Jenkins, B. J., C. Quilici, et al. (2002). "Hematopoietic abnormalities in mice deficient in gp130-mediated STAT signaling." *Exp Hematol* **30**(11): 1248-56.
- Jenkins, B. J., A. W. Roberts, et al. (2005). "The threshold of gp130-dependent STAT3 signaling is critical for normal regulation of hematopoiesis." *Blood* **105**(9): 3512-20.
- Jinushi, M., F. S. Hodi, et al. (2008). "Enhancing the clinical activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor cell vaccines." *Immunol Rev* **222**: 287-98.
- Johnnidis, J. B., M. H. Harris, et al. (2008). "Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223." *Nature* **451**(7182): 1125-9.
- Johnson, B. D., C. A. Hanke, et al. (1998). "Sca1(+)/Mac1(+) nitric oxide-producing cells in the spleens of recipients early following bone marrow transplant suppress T cell responses in vitro." *Cell Immunol* **189**(2): 149-59.
- Jost, M. M., E. Ninci, et al. (2003). "Divergent effects of GM-CSF and TGFbeta1 on bone marrow-derived macrophage arginase-1 activity, MCP-1 expression, and matrix metalloproteinase-12: a potential role during arteriogenesis." *FASEB J* **17**(15): 2281-3.
- Kerr, E. C., B. J. Raveney, et al. (2008). "Analysis of retinal cellular infiltrate in experimental autoimmune uveoretinitis reveals multiple regulatory cell populations." *J Autoimmun* **31**(4): 354-61.
- Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." *Nat Immunol* **3**(11): 999-1005.
- Ko, J. S., A. H. Zea, et al. (2009). "Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients." *Clin Cancer Res* **15**(6): 2148-57.
- Kortylewski, M., M. Kujawski, et al. (2005). "Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity." *Nat Med* **11**(12): 1314-21.
- Kujawski, M., M. Kortylewski, et al. (2008). "Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice." *J Clin Invest* **118**(10): 3367-77.
- Kusmartsev, S., F. Cheng, et al. (2003). "All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination." *Cancer Res* **63**(15): 4441-9.
- Kusmartsev, S. and D. I. Gabrilovich (2003). "Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species." *J Leukoc Biol* **74**(2): 186-96.
- Kusmartsev, S. and D. I. Gabrilovich (2005). "STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion." *J Immunol* **174**(8): 4880-91.
- Kusmartsev, S., S. Nagaraj, et al. (2005). "Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells." *J Immunol* **175**(7): 4583-92.
- Kusmartsev, S., Y. Nefedova, et al. (2004). "Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species." *J Immunol* **172**(2): 989-99.
- Kusmartsev, S., Z. Su, et al. (2008). "Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma." *Clin Cancer Res* **14**(24): 8270-8.
- Kusmartsev, S. A., Y. Li, et al. (2000). "Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation." *J Immunol* **165**(2): 779-85.
- Landrette, S. F., Y. H. Kuo, et al. (2005). "Plag1 and Plag2 are oncogenes that induce acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfb-MYH11." *Blood* **105**(7): 2900-7.
- Larrivee, B., I. Pollet, et al. (2005). "Activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 in bone marrow leads to accumulation of myeloid cells: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *J Immunol* **175**(5): 3015-24.
- Laslo, P., C. J. Spooner, et al. (2006). "Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates." *Cell* **126**(4): 755-66.
- Lathers, D. M., J. I. Clark, et al. (2004). "Phase 1B study to improve immune responses in head and neck cancer patients using escalating doses of 25-hydroxyvitamin D3." *Cancer Immunol Immunother* **53**(5): 422-30.

- Laxmanan, S., S. W. Robertson, et al. (2005). "Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways." *Biochem Biophys Res Commun* **334**(1): 193-8.
- Lee, S. H., D. W. Park, et al. (2009). "Calcium-independent phospholipase A2beta-Akt signaling is involved in lipopolysaccharide-induced NADPH oxidase 1 expression and foam cell formation." *J Immunol* **183**(11): 7497-504.
- Leeanansaksiri, W., H. Wang, et al. (2005). "IL-3 induces inhibitor of DNA-binding protein-1 in hemopoietic progenitor cells and promotes myeloid cell development." *J Immunol* **174**(11): 7014-21.
- Li, H., Y. Han, et al. (2009). "Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1." *J Immunol* **182**(1): 240-9.
- Liu, C., S. Yu, et al. (2007). "Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host." *Blood* **109**(10): 4336-42.
- Liu, C. Y., Y. M. Wang, et al. (2009). "Population alterations of L: -arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b(+)/CD14 (-)/CD15 (+)/CD33 (+) myeloid-derived suppressor cells and CD8 (+) T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer." *J Cancer Res Clin Oncol*.
- Liu, Y., J. A. Van Ginderachter, et al. (2003). "Nitric oxide-independent CTL suppression during tumor progression: association with arginase-producing (M2) myeloid cells." *J Immunol* **170**(10): 5064-74.
- Lodish, H. F., B. Zhou, et al. (2008). "Micromanagement of the immune system by microRNAs." *Nat Rev Immunol* **8**(2): 120-30.
- Lutz, M. B., N. A. Kukulski, et al. (2000). "Culture of bone marrow cells in GM-CSF plus high doses of lipopolysaccharide generates exclusively immature dendritic cells which induce alloantigen-specific CD4 T cell anergy in vitro." *Eur J Immunol* **30**(4): 1048-52.
- Macphail, S. E., C. A. Gibney, et al. (2003). "Nitric oxide regulation of human peripheral blood mononuclear cells: critical time dependence and selectivity for cytokine versus chemokine expression." *J Immunol* **171**(9): 4809-15.
- Makarenkova, V. P., V. Bansal, et al. (2006). "CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress." *J Immunol* **176**(4): 2085-94.
- Mandruzato, S., S. Solito, et al. (2009). "IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients." *J Immunol* **182**(10): 6562-8.
- Mannick, J. B., A. Hausladen, et al. (1999). "Fas-induced caspase denitrosylation." *Science* **284**(5414): 651-4.
- Marhaba, R., M. Vitacolonna, et al. (2007). "The importance of myeloid-derived suppressor cells in the regulation of autoimmune effector cells by a chronic contact eczema." *J Immunol* **179**(8): 5071-81.
- Marigo, I., L. Dolcetti, et al. (2008). "Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells." *Immunol Rev* **222**: 162-79.
- Markiewski, M. M., R. A. DeAngelis, et al. (2008). "Modulation of the antitumor immune response by complement." *Nat Immunol* **9**(11): 1225-35.
- Marshall, M. A., D. Jankovic, et al. (2001). "Mice infected with *Schistosoma mansoni* develop a novel non-T-lymphocyte suppressor population which inhibits virus-specific CTL induction via a soluble factor." *Microbes Infect* **3**(13): 1051-61.
- Mazzoni, A., V. Bronte, et al. (2002). "Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism." *J Immunol* **168**(2): 689-95.
- Melani, C., C. Chiodoni, et al. (2003). "Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity." *Blood* **102**(6): 2138-45.
- Melani, C., S. Sangaletti, et al. (2007). "Amino-biphosphonate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma." *Cancer Res* **67**(23): 11438-46.

- Mencacci, A., C. Montagnoli, et al. (2002). "CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis." *J Immunol* **169**(6): 3180-90.
- Menetrier-Caux, C., G. Montmain, et al. (1998). "Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor." *Blood* **92**(12): 4778-91.
- Mitchell, P. O., T. Mills, et al. (2005). "Sca-1 negatively regulates proliferation and differentiation of muscle cells." *Dev Biol* **283**(1): 240-52.
- Mizutani, A., T. Furukawa, et al. (2002). "A zinc-finger protein, PLAGL2, induces the expression of a proapoptotic protein Nip3, leading to cellular apoptosis." *J Biol Chem* **277**(18): 15851-8.
- Monticelli, S., K. M. Ansel, et al. (2005). "MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system." *Genome Biol* **6**(8): R71.
- Moon, S. H., C. M. Jenkins, et al. (2008). "Smooth muscle cell arachidonic acid release, migration, and proliferation are markedly attenuated in mice null for calcium-independent phospholipase A2beta." *J Biol Chem* **283**(49): 33975-87.
- Morales, J. K., M. Kmiecik, et al. (2009). "GM-CSF is one of the main breast tumor-derived soluble factors involved in the differentiation of CD11b-Gr1- bone marrow progenitor cells into myeloid-derived suppressor cells." *Breast Cancer Res Treat.*
- Moran, J. M., R. M. Buller, et al. (2005). "Genetic and pharmacologic evidence that calcium-independent phospholipase A2beta regulates virus-induced inducible nitric-oxide synthase expression by macrophages." *J Biol Chem* **280**(30): 28162-8.
- Movahedi, K., M. Guillems, et al. (2008). "Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity." *Blood* **111**(8): 4233-44.
- Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (1999). "Constitutive expression of G-CSF and GM-CSF in human skin carcinoma cells with functional consequence for tumor progression." *Int J Cancer* **83**(6): 780-9.
- Muljo, S. A., K. M. Ansel, et al. (2005). "Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer." *J Exp Med* **202**(2): 261-9.
- Munder, M., K. Eichmann, et al. (1999). "Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells." *J Immunol* **163**(7): 3771-7.
- Munera, V., P. J. Popovic, et al. "Stat 6-dependent induction of myeloid derived suppressor cells after physical injury regulates nitric oxide response to endotoxin." *Ann Surg* **251**(1): 120-6.
- Munn, D. H. and A. L. Mellor (2007). "Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance." *J Clin Invest* **117**(5): 1147-54.
- Murdoch, C., M. Muthana, et al. (2008). "The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis." *Nat Rev Cancer* **8**(8): 618-31.
- Nagaraj, S., K. Gupta, et al. (2007). "Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer." *Nat Med* **13**(7): 828-35.
- Nagendra, S. and A. J. Schlueter (2004). "Absence of cross-reactivity between murine Ly-6C and Ly-6G." *Cytometry A* **58**(2): 195-200.
- Nefedova, Y., M. Huang, et al. (2004). "Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer." *J Immunol* **172**(1): 464-74.
- Nefedova, Y., S. Nagaraj, et al. (2005). "Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway." *Cancer Res* **65**(20): 9525-35.
- Neilson, J. R., G. X. Zheng, et al. (2007). "Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development." *Genes Dev* **21**(5): 578-89.
- O'Carroll, D., I. Mecklenbrauker, et al. (2007). "A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway." *Genes Dev* **21**(16): 1999-2004.
- O'Connell, R. M., D. S. Rao, et al. (2008). "Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder." *J Exp Med* **205**(3): 585-94.
- O'Connell, R. M., K. D. Taganov, et al. (2007). "MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(5): 1604-9.

- Obermueller, E., S. Vosseler, et al. (2004). "Cooperative autocrine and paracrine functions of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the progression of skin carcinoma cells." Cancer Res **64**(21): 7801-12.
- Ostrand-Rosenberg, S. and P. Sinha (2009). "Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer." J Immunol **182**(8): 4499-506.
- Otsuji, M., Y. Kimura, et al. (1996). "Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13119-24.
- Overwijk, W. W., M. R. Theoret, et al. (2003). "Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells." J Exp Med **198**(4): 569-80.
- Pan, P. Y., G. Ma, et al. "Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer." Cancer Res **70**(1): 99-108.
- Pan, P. Y., G. X. Wang, et al. (2007). "Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid derived suppressor cell development by blockade of SCF function." Blood.
- Park, B. K., H. Zhang, et al. (2007). "NF-kappaB in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF." Nat Med **13**(1): 62-9.
- Park, S. J., T. Nakagawa, et al. (2004). "IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation." J Immunol **173**(6): 3844-54.
- Parmiani, G., C. Castelli, et al. (2007). "Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients." Ann Oncol **18**(2): 226-32.
- Pelaez, B., J. A. Campillo, et al. (2001). "Cyclophosphamide induces the development of early myeloid cells suppressing tumor cell growth by a nitric oxide-dependent mechanism." J Immunol **166**(11): 6608-15.
- Pericle, F., R. A. Kirken, et al. (1997). "Immunocompromised tumor-bearing mice show a selective loss of STAT5a/b expression in T and B lymphocytes." J Immunol **159**(6): 2580-5.
- Perry, S. S., Y. Zhao, et al. (2007). "Id1, but not Id3, directs long-term repopulating hematopoietic stem-cell maintenance." Blood **110**(7): 2351-60.
- Peters, W. P., G. Rosner, et al. (1993). "Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy." Blood **81**(7): 1709-19.
- Radi, R. (2004). "Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4003-8.
- Ramkissoon, S. H., L. A. Mainwaring, et al. (2006). "Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells." Leuk Res **30**(5): 643-7.
- Reiman, J. M., M. Kmiecik, et al. (2007). "Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression." Semin Cancer Biol **17**(4): 275-87.
- Roca, H., Z. S. Varsos, et al. (2009). "CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization." J Biol Chem **284**(49): 34342-54.
- Rodriguez, A., E. Vigorito, et al. (2007). "Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function." Science **316**(5824): 608-11.
- Rodriguez, P. C., M. S. Ernstoff, et al. (2009). "Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes." Cancer Res **69**(4): 1553-60.
- Rodriguez, P. C., C. P. Hernandez, et al. (2005). "Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma." J Exp Med **202**(7): 931-9.
- Rodriguez, P. C., D. G. Quiceno, et al. (2007). "L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression." Blood **109**(4): 1568-73.

- Rodriguez, P. C., D. G. Quiceno, et al. (2004). "Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses." Cancer Res **64**(16): 5839-49.
- Rodriguez, P. C., A. H. Zea, et al. (2003). "L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes." J Immunol **171**(3): 1232-9.
- Rosenbauer, F., A. Kallies, et al. (2002). "Disabled-2 is transcriptionally regulated by ICSBP and augments macrophage spreading and adhesion." EMBO J **21**(3): 211-20.
- Rossner, S., C. Voigtlander, et al. (2005). "Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro." Eur J Immunol **35**(12): 3533-44.
- Rubinstein, N., M. Alvarez, et al. (2004). "Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege." Cancer Cell **5**(3): 241-51.
- Ryckman, C., K. Vandal, et al. (2003). "Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion." J Immunol **170**(6): 3233-42.
- Salvadori, S., G. Martinelli, et al. (2000). "Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity." J Immunol **164**(4): 2214-20.
- Schmielau, J. and O. J. Finn (2001). "Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients." Cancer Res **61**(12): 4756-60.
- Schopfer, F. J., P. R. Baker, et al. (2003). "NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response?" Trends Biochem Sci **28**(12): 646-54.
- Serafini, P., R. Carbley, et al. (2004). "High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells." Cancer Res **64**(17): 6337-43.
- Serafini, P., K. Meckel, et al. (2006). "Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function." J Exp Med **203**(12): 2691-702.
- Serafini, P., S. Mgebhoff, et al. (2008). "Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells." Cancer Res **68**(13): 5439-49.
- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-11.
- Shivdasani, R. A. (2006). "MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation." Blood **108**(12): 3646-53.
- Shojaei, F., X. Wu, et al. (2007). "Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells." Nat Biotechnol **25**(8): 911-20.
- Shojaei, F., X. Wu, et al. (2007). "Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis." Nature **450**(7171): 825-31.
- Sica, A. and V. Bronte (2007). "Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development." J Clin Invest **117**(5): 1155-66.
- Sinha, P., V. K. Clements, et al. (2007). "Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response." J Immunol **179**(2): 977-83.
- Sinha, P., V. K. Clements, et al. (2007). "Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells." Cancer Res **67**(9): 4507-13.
- Sinha, P., V. K. Clements, et al. (2005). "Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis." Cancer Res **65**(24): 11743-51.
- Sinha, P., V. K. Clements, et al. (2005). "Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease." J Immunol **174**(2): 636-45.
- Sinha, P., C. Okoro, et al. (2008). "Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells." J Immunol **181**(7): 4666-75.

- Smyth, M. J., G. P. Dunn, et al. (2006). "Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity." Adv Immunol **90**: 1-50.
- Sohn, S. K., J. G. Kim, et al. (2002). "GM-CSF-based mobilization effect in normal healthy donors for allogeneic peripheral blood stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **30**(2): 81-6.
- Song, X., Y. Krelin, et al. (2005). "CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells." J Immunol **175**(12): 8200-8.
- Sonkoly, E., M. Stahle, et al. (2008). "MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation." Semin Cancer Biol **18**(2): 131-40.
- Soria, G. and A. Ben-Baruch (2008). "The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer." Cancer Lett **267**(2): 271-85.
- Srivastava, M. K., P. Sinha, et al. "Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine." Cancer Res **70**(1): 68-77.
- Stanford, W. L., S. Haque, et al. (1997). "Altered proliferative response by T lymphocytes of Ly-6A (Sca-1) null mice." J Exp Med **186**(5): 705-17.
- Sunderkotter, C., T. Nikolic, et al. (2004). "Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response." J Immunol **172**(7): 4410-7.
- Suzuki, E., V. Kapoor, et al. (2005). "Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity." Clin Cancer Res **11**(18): 6713-21.
- Suzuki, M., T. Yamada, et al. (2003). "Direct association between PU.1 and MeCP2 that recruits mSin3A-HDAC complex for PU.1-mediated transcriptional repression." Oncogene **22**(54): 8688-98.
- Swanberg, S. E., R. P. Nagarajan, et al. (2009). "Reciprocal co-regulation of EGR2 and MECP2 is disrupted in Rett syndrome and autism." Hum Mol Genet **18**(3): 525-34.
- Taganov, K. D., M. P. Boldin, et al. (2006). "NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12481-6.
- Takizawa, M., I. Nobuhisa, et al. (2003). "Requirement of gp130 signaling for the AGM hematopoiesis." Exp Hematol **31**(4): 283-9.
- Talmadge, J. E., K. C. Hood, et al. (2007). "Chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibition reduces immature myeloid suppressor cell expansion." Int Immunopharmacol **7**(2): 140-51.
- Terabe, M., S. Matsui, et al. (2003). "Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence." J Exp Med **198**(11): 1741-52.
- Terrazas, L. I., K. L. Walsh, et al. (2001). "The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections." J Immunol **167**(9): 5294-303.
- Thomas, L. (1959). Discussion. In cellular and humoral aspect of the hypersensitive states, H.S. Lawrence, ed. (New York: Hoeber-Harper).
- Tusher, V. G., R. Tibshirani, et al. (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5116-21.
- Ueda, Y., M. Kondo, et al. (2005). "Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow." J Exp Med **201**(11): 1771-80.
- Umemura, N., M. Saio, et al. (2008). "Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics." J Leukoc Biol **83**(5): 1136-44.
- Uyttenhove, C., L. Pilotte, et al. (2003). "Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase." Nat Med **9**(10): 1269-74.

- Valenti, R., V. Huber, et al. (2006). "Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes." *Cancer Res* **66**(18): 9290-8.
- Van Ginderachter, J. A., S. Meerschaut, et al. (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands reverse CTL suppression by alternatively activated (M2) macrophages in cancer." *Blood* **108**(2): 525-35.
- Van Loo, P. F., P. Bouwman, et al. (2003). "Impaired hematopoiesis in mice lacking the transcription factor Sp3." *Blood* **102**(3): 858-66.
- Vuk-Pavlovic, S., P. A. Bulur, et al. (2009). "Immunosuppressive CD14(+)HLA-DR(low/-) monocytes in prostate cancer." *Prostate*.
- Wu, H., J. R. Neilson, et al. (2007). "miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells." *PLoS ONE* **2**(10): e1020.
- Xia, Y., L. J. Roman, et al. (1998). "Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain." *J Biol Chem* **273**(35): 22635-9.
- Xia, Y. and J. L. Zweier (1997). "Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6954-8.
- Xiang, X., A. Poliakov, et al. (2009). "Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes." *Int J Cancer* **124**(11): 2621-33.
- Yanagisawa, K., M. A. Exley, et al. (2006). "Hyporesponsiveness to natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide in cancer-bearing state mediated by CD11b+ Gr-1+ cells producing nitric oxide." *Cancer Res* **66**(23): 11441-6.
- Yang, L., L. M. DeBusk, et al. (2004). "Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis." *Cancer Cell* **6**(4): 409-21.
- Yang, L., J. Huang, et al. (2008). "Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis." *Cancer Cell* **13**(1): 23-35.
- Yang, R., Z. Cai, et al. (2006). "CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells." *Cancer Res* **66**(13): 6807-15.
- Yao, L., T. Yokota, et al. (2005). "Bone marrow dysfunction in mice lacking the cytokine receptor gp130 in endothelial cells." *Blood* **106**(13): 4093-101.
- Youn, J. I., S. Nagaraj, et al. (2008). "Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." *J Immunol* **181**(8): 5791-802.
- Young, M. R., J. Halpin, et al. (1993). "1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 plus gamma-interferon blocks lung tumor production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and induction of immunosuppressor cells." *Cancer Res* **53**(24): 6006-10.
- Young, M. R., M. A. Wright, et al. (1997). "Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells." *Int J Cancer* **74**(1): 69-74.
- Young, M. R., M. A. Wright, et al. (1996). "Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide." *J Immunol* **156**(5): 1916-22.
- Young, M. R., M. A. Wright, et al. (1991). "Antibodies to colony-stimulating factors block Lewis lung carcinoma cell stimulation of immune-suppressive bone marrow cells." *Cancer Immunol Immunother* **33**(3): 146-52.
- Young, M. R., M. E. Young, et al. (1990). "Stimulation of immune-suppressive bone marrow cells by colony-stimulating factors." *Exp Hematol* **18**(7): 806-11.
- Yu, S., C. Liu, et al. (2007). "Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells." *J Immunol* **178**(11): 6867-75.
- Zea, A. H., P. C. Rodriguez, et al. (2005). "Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion." *Cancer Res* **65**(8): 3044-8.
- Zea, A. H., P. C. Rodriguez, et al. (2004). "L-Arginine modulates CD3zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes." *Cell Immunol* **232**(1-2): 21-31.

- Zhang, M., L. V. Borovikova, et al. (1999). "Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation." Mol Med **5**(9): 595-605.
- Zhang, M., T. Caragine, et al. (1997). "Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response." J Exp Med **185**(10): 1759-68.
- Zhang, Y., Q. Liu, et al. (2009). "Fas signal promotes lung cancer growth by recruiting myeloid-derived suppressor cells via cancer cell-derived PGE2." J Immunol **182**(6): 3801-8.
- Zhu, B., Y. Bando, et al. (2007). "CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **179**(8): 5228-37.

## PUBBLICAZIONI

**Peranzoni E**, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, and Bronte V. *Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition*. Curr Opin Immun. 2010 (in press). Review.

Dolcetti L\*, **Peranzoni E\***, Ugel S, Marigo I, Fernandez A, Mesa C, Geilich M, Winkels G, Traggiati E, Casati A, Grassi F and Bronte V. *Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF*. Eur J Immunol. 2010 Jan;40(1):22-35.

Ugel S, Scarselli E, Iezzi M, Mennuni C, Pannellini T, Calvaruso F, Cipriani B, De Palma R, Ricci-Vitiani L, **Peranzoni E**, Musiani P, Zanovello P, Bronte V. *Autoimmune B cell lymphopenia following successful adoptive therapy with telomerase-specific T lymphocytes*. Blood. 2009 Nov 10.

Dolcetti L, Marigo I, Mantelli B, **Peranzoni E**, Zanovello P, Bronte V. *Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation*. Cancer Lett. 2008 Aug 28;267(2):216-25. Review.

**Peranzoni E**, Marigo I, Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, Taschin E, Mantelli B, Bronte V, Zanovello P. *Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology*. Immunobiology. 2007;212(9-10):795-812. Review.

Bronte V, Cingarlini S, Marigo I, De Santo C, Gallina G, Dolcetti L, Ugel S, **Peranzoni E**, Mandruzzato S, Zanovello P. *Leukocyte infiltration in cancer creates an unfavorable environment for antitumor immune responses: a novel target for therapeutic intervention*. Immunol Invest. 2006;35(3-4):327-57. Review.

### Pubblicazioni previste:

"5-fluorouracil induces a long-term elimination of a MDSC suppressive subpopulation and improves the effect of adoptive immunotherapy"

"miRNA involvement in MDSC differentiation and function"

